

CURSO AVANZADO DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO **LÁSER**

Responsables docentes:

Dr. Ramiro Rodriguez y la Dra. Lía Pietrasanta

Docentes:

Dr. Ramiro Rodriguez (IBR, CONICET-UNR; FBioyF y CEI, UNR)

Dra. Lía Pietrasanta, IFIBA (CONICET-UBA) y CMA (FCEN-UBA)

Dra. Lorena Sigaut, IFIBA (CONICET-UBA)

Dra. Catalina von Bilderling, IFIBA (CONICET-UBA)

Tec. Rodrigo Vena (IBR, CONICET-UNR)

Dr. Enrique Morales (IBR, CONICET-UNR)

1. *Fundamentación*

La microscopía confocal de fluorescencia es una de las herramientas principales para el estudio de moléculas en células. En el curso se discutirán aspectos teóricos y prácticos de técnicas avanzadas en el estudio de biomoléculas por microscopía confocal de fluorescencia.

2. *Contenidos teóricos*

2.1. Conceptos fundamentales de Microscopía Confocal de Barrido Laser

Conceptos fundamentales de microscopía óptica: interferencia, difracción, profundidad de campo, fuentes de luz y detectores, sondas para el marcado y la preparación de muestras. Principios básicos de la microscopía confocal. Resolución axial y lateral. Imagen. Evaluación de los parámetros para la adquisición de imágenes. Microscopio confocal LSM880: funcionamiento, técnicas disponibles y aplicaciones en biología celular.

2.2. Colocalización cuantitativa

Colocalización cuantitativa. Definición. Colocalización vs interacción. Fluoróforos para colocalización. Detección de colocalización. Colocalización cuantitativa: coeficientes de Pearson, Manders, m_1 y m_2 . Definición de píxeles colocalizantes. Algoritmos automáticos de detección de colocalización: algoritmo de Costes, algoritmo de Villalba. Software de aplicación de algoritmos. Aplicaciones de colocalización. Deconvolución espectral.

2.3. Transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET)

Colocalización vs interacción. Principio y definición de dador y aceptor. Pre-requisitos para FRET. Eficiencia de FRET. Qué se mide en FRET. Pares de fluoróforos para FRET. FRET para Ratio Imaging: ventajas y limitaciones. FRET por fotoblanqueo del aceptor: ventajas y limitaciones. Configuración del microscopio para la detección del par dador/aceptor correspondiente. Evaluación del sangrado y la excitación directa del aceptor. Protocolos de adquisición de imágenes para FRET. Aplicaciones de FRET.

2.4. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP)

Definición. Ventajas y limitaciones. Protocolo de adquisición para FRAP. Consideraciones: ruido de fondo, fotoblanqueo por adquisición. Corrección por fotoblanqueo por adquisición. Análisis de los datos. Modelos. Aplicaciones de FRAP.

2.5. Espectroscopía por correlación de fluorescencia (FCS)

Origen de las fluctuaciones de la fluorescencia. Adquisición de secuencias temporales. Cálculo de auto-correlaciones. Determinación de tiempos característicos. Consideración de modelos teóricos para el ajuste de los datos. Análisis e interpretación de curvas de auto-correlación. Aplicaciones de FCS.

3. Contenidos prácticos

3.1. Adquisición, procesamiento y análisis de datos en experimentos de FRET y de FCS

3.2. Análisis y procesamiento de imágenes: experimentos de colocalización de fluoróforos, deconvolución espectral, de FRAP.

Horas totales del curso: 45 hs

4. Bibliografía:

1. Wilson and Sheppard C. J. R.. *Theory and practice of scanning optical microscopy*. Academic Press (1984). Pawley J. B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed). Springer (2006).
2. Elizabeth A. Jares-Erijman and Thomas M. Jovin, *Reflections on FRET imaging: Formalism, probes, and implementation*. In T. W. J. Gadella, editor, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 33, Burlington: Academic Press, 2009, pp.475-517. ISBN: 978-0-08-054958-3 © Copyright 2009 Elsevier B.V. Academic Press.
3. Hernan E. Grecco, Philippe Bastians. *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*, Second Edition. Edited By Robert D. Goldman, Feinberg School of Medicine Northwestern University; Jason R. Swedlow, The University of Dundee; David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG. *Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching*. *Biophys J*. 2004 Jun; 86(6):3473-95.
5. P. Schwille, E. Haustein *Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications* (2006), doi:10.1002/lpor.200910041