

КАК ИЗМЕРЯЮТ ПОДВИЖНОСТЬ МАКРОМОЛЕКУЛ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

А. С. СОБОЛЕВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

HOW MOBILITY OF MACROMOLECULES IN LIVING CELLS CAN BE MEASURED

A. S. SOBOLEV

Problems, where a solution requires the measurement of intracellular macromolecular movement, are briefly described; among them: nucleo-cytoplasmic transport and lateral mobility of membrane receptors. Principles of two main methods are outlined: 1) Fluorescence Recovery after Photobleaching; and 2) Fluorescent Confocal Laser Scanning Microscopy. Main results obtained with the use of these methods are listed.

Описаны проблемы, решение которых требует измерения внутриклеточной подвижности макромолекул, в том числе цитоплазмально-ядерного транспорта и латеральной подвижности мембранных рецепторов. Охарактеризованы принципы двух основных методов: восстановления флуоресценции после фотоотбеливания и лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. Перечислены основные результаты, полученные с их помощью.

www.issep.rssi.ru

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Представим себе живую клетку в стадии G_0 , то есть когда она вышла из митотического цикла, не делится, но активно функционирует. Таких клеток большинство в нашем организме. Во многих из них идет активный синтез различных белков либо “на экспорт” (секреторные белки), либо для собственных нужд. Если вспомнить, что синтез белка происходит в цитоплазме, точнее, на рибосомах, то можно задаться вопросом: как попадают вновь синтезированные белки в свои места назначения, отличные от места их синтеза? Невольно напрашивается мысль, что должны существовать какие-то механизмы доставки этих белков по соответствующим адресам (то есть доставка происходит не случайно), причем, возможно, эти адреса “написаны” на самих белках. Эта мысль о существовании специальных транспортных систем для доставки белков по адресам и о существовании самих адресов подтверждена за последние 10–15 лет широкими экспериментальными исследованиями. В статье нет возможности входить в подробности этого чрезвычайно увлекательного, по мнению автора, раздела молекулярной биологии и биофизики клетки, рассмотрим лишь один, достаточно хорошо изученный пример цитоплазмально-ядерного транспорта как иллюстрацию основных принципов транспорта. Как следует из названия, это транспорт из цитоплазмы в ядро клетки (и обратно).

Около 15 лет назад элегантными опытами Кальдерона и др. (1984 год) был обнаружен первый адрес, записываемый на белке, направляемом в ядро, — сигнал ядерной локализации, или кариофильная последовательность (имеется в виду последовательность аминокислот). Объектом исследований был белок вируса SV40 — большой ядерный Т-антиген, синтезируемый вскоре после проникновения вируса в клетку и нужный вирусу, чтобы эффективно использовать ядерный аппарат клетки для собственной репликации. Этот белок, как оказалось, содержит сигнал ядерной локализации из семи аминокислот (начиная со 124-й аминокислоты

с N-конца Т-антигена): пролин¹²⁴-лизин-лизин-лизин-аргинин-лизин-валин. Утрата этого участка или даже простая замена лизина¹²⁶ на треонин¹²⁶ драматически сказывается на внутриклеточной локализации измененного таким образом белка: введенный в цитоплазму измененный белок вместо того, чтобы накапливаться в ядре, как это делает нормальный Т-антиген, продолжает оставаться в цитоплазме. В последующие годы были выявлены многие десятки белков с сигналами ядерной локализации. Понятно, что сигналом ядерной локализации не исчерпывается весь механизм доставки белка из цитоплазмы в ядро, как написанием адреса на конверте с письмом не исчерпывается процесс доставки письма адресату. Как в последнем случае нужна деятельность почты, так и в первом — работа белков, участвующих в цитоплазматическом транспорте, большинство этих белков сосредоточено в порах ядерной мембраны. Даже если не вдаваться в какие-либо детали этой большой проблемы, то все равно напрашивается мысль, что понимание механизмов регуляции процессов цитоплазматического транспорта, а затем управление ими должны иметь существенное значение.

По каким параметрам мы судим об эффективности работы почты? Среди прочих для нас большое значение имеет скорость доставки. То же и для транспорта из цитоплазмы в ядро. Экспериментатор, изменяя “текст” сигнала ядерной локализации, окружающий его “контекст”, воздействуя на компоненты, участвующие в доставке ядерного белка, и т.д., должен иметь возможность следить за процессом транспорта и не просто следить, а измерять его скорости и сопоставлять их при разных условиях опыта. Отсюда возникает задача иметь метод определения количественных характеристик транспорта белков (и вообще макромолекул) из цитоплазмы живой клетки в ее ядро. Здесь не напрасно сказано о живой клетке: выяснилось, что во внутриклеточном транспорте участвует множество компонентов клетки (белков, надмолекулярных комплексов и пр.), причем немалое их число, по-видимому, еще предстоит открыть. Следовательно, чтобы не утратить какие-либо из компонентов-участников, нередко желательно исследования проводить на целой живой функционирующей клетке, а не на ее фрагментах.

Представим себе плазматическую мембрану клетки. В ней помимо других мембранных белков находятся рецепторы, осуществляющие первые этапы передачи сигнала от гормона вовнутрь клетки. Рецепторы могут взаимодействовать с другими белками плазматической мембраны, например с G-белками или адаптинами (белками так называемых покрытых ямок) и т.д. Около 20 лет тому назад была высказана гипотеза (П. Кватрекасас, 1976 год) “мобильного рецептора”, согласно которой взаимодействие рецепторов с уда-

ленными от них другими белками или структурами мембраны возможно после их сближения (эффективного столкновения), осуществляемого за счет диффузии в мембране, то есть латеральной диффузии. Отсюда следовало также, что латеральная диффузия макромолекул в мембране может стать узким местом, стадией, лимитирующей скорость их взаимодействия. Поэтому непосредственное измерение коэффициента латеральной диффузии (D_L) белков в нативных мембранах или даже плазматических мембранах живых клеток должно было стать необходимой задачей, решение которой привело бы к пониманию механизмов взаимодействия белков в мембранах. Мы снова приходим, но уже исходя из другой отправной точки, к постановке задачи измерения подвижности макромолекул в живых клетках.

Несколько слов об основных требованиях к методам измерения этой подвижности. Во-первых, так как подход требует, чтобы объектами были либо целые живые клетки (см. выше о цитоплазматическом транспорте), либо по крайней мере нативные мембраны (в некоторых случаях измерения D_L), то имеет смысл применение таких методов, которые позволяют проникнуть внутрь клетки или мембраны. Во-вторых, методы, конечно, не должны повреждать объект исследования. В-третьих, поскольку объекты имеют микроскопические размеры, то целесообразно использование микроскопии. Эти требования, таким образом, выводят на первый план оптические методы исследования.

Рассмотрим два наиболее широко применяемых метода измерения подвижности макромолекул в живых клетках: 1) метод восстановления флуоресценции после фотоотбеливания, или метод флуоресцентного микрофотолиза, и 2) количественную флуоресцентную лазерную конфокальную сканирующую микроскопию.

МЕТОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОСЛЕ ФОТООТБЕЛИВАНИЯ (ВФПФ)

Исторически этот метод более ранний и вначале использовался для измерения коэффициентов латеральной диффузии белков D_L в плазматических мембранах клеток.

Пометим интересные нас белки плазматической мембраны клетки флуоресцентной меткой, например производным флуоресцеина. Поместим клетки с флуоресцентно мечеными белками под объектив люминесцентного микроскопа (рис. 1), у которого свет, возбуждающий флуоресценцию, идет не от осветительной лампы, а представляет собой сфокусированный объективом луч лазера (для флуоресцеиновой метки, имеющей максимум поглощения при 490 нм, можно

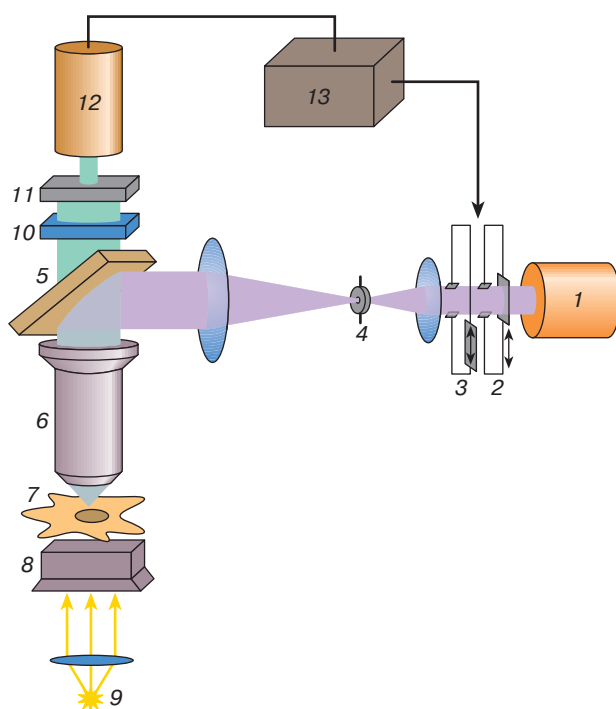


Рис. 1. Упрощенная схема установки для исследования ВФПФ: 1 – лазер, 2 и 3 – аттенюаторы (ослабители луча), 4 – диафрагма, 5 – дихроичное зеркало, отражающее падающий свет и пропускающее свет возбужденной флуоресценции, 6 – объектив микроскопа, 7 – исследуемая клетка, 8 – конденсор микроскопа, 9 – осветитель, 10 – отсекающий светофильтр, 11 – “зонд” – узкая диафрагма, выделяющая флуоресценцию с исследуемого участка, 12 – ФЭУ, 13 – блок регистрации и управления установкой

использовать аргоновый лазер с $\lambda = 488$ нм). Интенсивность флуоресценции метки (при $\lambda = 520$ нм) регистрируется фотоэлектронным умножителем (ФЭУ), эти данные поступают в компьютер, который не только их обрабатывает, строит графики, рассчитывает D_L и другие параметры, но и управляет всей установкой. Возбуждающий флуоресценцию луч лазера фокусируется на маленький участок плазматической мембраны (порядка нескольких мкм²). Этот луч должен быть ослаблен аттенюаторами (рис. 1, 2, 3) настолько, чтобы вызывать лишь флуоресценцию метки, но не фотоокислять ее сколько-нибудь заметно. При этом установкой регистрируется какая-то интенсивность флуоресценции $I(t < 0)$, исходящей из этого маленького участка мембраны (рис. 2).

Затем в момент времени $t = 0$ интенсивность возбуждающего луча на краткий промежуток времени (обычно десятки миллисекунд) возрастает настолько (аттенюаторы 2 и 3 перестают ослаблять луч, см. рис. 1),

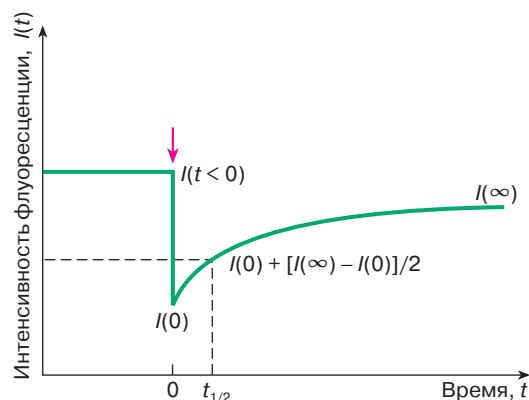


Рис. 2. Восстановление интенсивности флуоресценции после фотоотбеливания; метод расчета данных ВФПФ по трем точкам: $I(t < 0)$ – интенсивности флуоресценции до фотоотбеливания, $I(0)$ – интенсивности флуоресценции непосредственно после фотоотбеливания, $I(\infty)$ – предельного значения интенсивности флуоресценции после ее восстановления. Стрелкой отмечен момент фотоотбеливания

чтобы вызвать фотоокисление флуоресцентной метки (иными словами, вызвать фотоотбеливание, то есть потерю способности флуоресцировать). Вслед за этим установка возвращает интенсивность возбуждающего света к исходному уровню и начинает опять регистрировать интенсивность флуоресценции с отбеленного участка. Так как продукт, образующийся в результате фотоотбеливания флуоресцентной метки, не флуоресцирует, то общая интенсивность флуоресценции, регистрируемая с этого участка, $I(0)$, падает. Если меченые белки способны перемещаться в мембране, то, конечно, они “заплывут” и в отбеленный участок и тогда интенсивность флуоресценции, регистрируемой с этого участка, $I(t)$, будет возрастать, достигая, в конечном итоге, предельного значения $I(\infty)$.

По кривой восстановления флуоресценции после фотоотбеливания (см. рис. 2) можно определить время полувосстановления, $t_{1/2}$ (в точке, где интенсивность флуоресценции равна $I(0) + \frac{I(\infty) - I(0)}{2}$).

Один из способов расчета коэффициента латеральной диффузии меченых белков состоит в следующем. Известно, что перемещение каких-то молекул в мембране, которое удобнее характеризовать величиной среднего квадратичного перемещения $\langle x^2 \rangle$, за время t описывается формулой Эйнштейна $\langle x^2 \rangle = 4D_L \cdot t$, откуда

$$D_L = \frac{\langle x^2 \rangle}{4t}.$$

Применительно к методу ВФПФ эта формула может быть преобразована к виду

$$D_L = \frac{w^2}{4t_{1/2}} \gamma_D,$$

где w — радиус отбеливаемого участка, а γ_D — рассчитываемая константа, зависящая от профиля луча и степени фотоотбеливания. Отсюда, зная время полувосстановления $t_{1/2}$, можно вычислить D_L и таким образом количественно охарактеризовать подвижность белков в мембране живой клетки.

Метод ВФПФ (такая же установка, как на рис. 1) используют также и для количественной характеристики цитоплазмнно-ядерного транспорта. В этом случае подбирают такой объектив микроскопа, чтобы фокальный объем сфокусированного луча лазера совпал с объемом ядра исследуемой клетки, чтобы отбеливался весь объем ядра (но не больше). В клетку микроинъектируют флуоресцентно меченный исследуемый белок, а далее все происходит так же, как описано выше (см. рис. 2). То есть сначала при низкой интенсивности луча регистрируется $I(t < 0)$, при $t = 0$ происходит фотоотбеливание того флуоресцентно меченного белка, который успел попасть в ядро, затем происходит возвращение интенсивности возбуждающего света к исходному уровню и регистрация флуоресценции из отбеленного ядра. Если меченые белки способны транспортироваться в ядро из цитоплазмы, то они проникнут и в отбеленный объем — ядро. Тогда интенсивность регистрируемой флуоресценции будет расти до $I(\infty)$. В целом кинетика этого процесса обычно описывается уравнением

$$\frac{I(t < 0) - I(t)}{I(t < 0) - I(0)} = e^{-kt},$$

где k — константа скорости цитоплазмнно-ядерного транспорта; остальные обозначения даны на рис. 2 и в пояснениях к нему в тексте. Измеряя восстановление флуоресценции и рассчитав k , исследователь получает возможность количественно охарактеризовать процесс цитоплазмнно-ядерного транспорта и сравнить различные факторы, воздействующие на него.

КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ (КЛСМ)

Этот метод создан позже, чем метод ВФПФ: теоретические его основы были разработаны в 1977 году, а первые установки были сконструированы спустя еще два года. Схема установки для КЛСМ дана на рис. 3. В чем суть метода и почему он так называется? Условие конфокальности, совпадение фокусов, состоит в том, чтобы диафрагма детектора (рис. 3, 5) находилась в таком месте, что если ее спроецировать на объект, то ее изображение точно совпало бы с фокусом освещающего объект света.

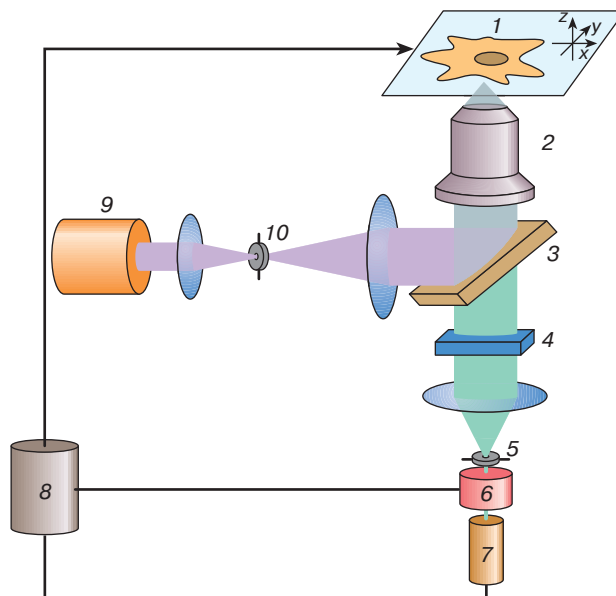


Рис. 3. Упрощенная схема установки для флуоресцентной КЛСМ: 1 — сканируемый в трех направлениях предметный столик, 2 — объектив микроскопа (инвертированный), 3 — дихроичное зеркало, 4 — отсекающий фильтр, 5 — диафрагма детектора, 6 — спектрограф (для выделения нужной полосы флуоресценции), 7 — ФЭУ, 8 — блок регистрации и управления установкой, 9 — лазер, 10 — диафрагма осветителя

Если один и тот же объектив используется и для освещения объекта, и для детекции изображения, как на рис. 3, то это условие может быть выполнено. Существенным моментом является также как можно меньший диаметр диафрагмы детектора. Это достижимо при использовании достаточно мощных источников освещения, какими являются лазеры. Сочетание этих особенностей позволяет значительно увеличить разрешение (до 100–200 нм) и контрастность по сравнению с обычной световой микроскопией. Кроме того, в случае флуоресцентной КЛСМ, которую мы и рассматриваем, лишь только та флуоресценция, которая возникает в той части образца, на которую сфокусирован объектив, достигает детектора и регистрируется. В обычной же световой люминесцентной микроскопии детектируется флуоресценция из всей освещенной части образца, хотя те части, которые находятся вне фокуса, видны не контрастно. Благодаря этим особенностям КЛСМ появляется возможность послойно просматривать живые клетки (наподобие томографии) и количественно характеризовать их флуоресцентные изображения. Для этого необходим прецизионно перемещаемый в трех направлениях, или сканируемый предметный столик (деталь 1 на рис. 3). Предметный столик передвигается

в плоскости xy , а также по оси z . Каждое полученное изображение запоминается компьютером, по этим изображениям компьютер воссоздает изображение каждого оптического среза, а также, при необходимости, любого вертикального среза (например, в плоскости zx), что совершенно невозможно для обычной световой микроскопии. В остальном установка для КЛСМ сходна с установкой, изображенной на рис. 1. Количественные характеристики можно получать определяя интенсивность флуоресценции с помощью ФЭУ из выделенных окон на изображении. Например, можно выделить квадратное окно размером 5×5 мкм в интересующей части получаемого флуоресцентного изображения и определить интенсивность флуоресценции, испускаемой клеткой только из этого окна. Если исследователя интересует распределение макромолекул данного типа между, скажем, ядром и цитоплазмой, то окно можно поместить в оптический срез ядра, определить интенсивность флуоресценции из него (F_n), вычтя, конечно, автофлуоресценцию, затем поместить такое же окно в участок цитоплазмы на том же оптическом срезе и определить интенсивность флуоресценции из этого окна (F_c), тоже без автофлуоресценции. Тогда отношение

$$F_n/c = \frac{F_n}{F_c}$$

будет характеризовать распределение интересующих нас флуоресцентно меченных макромолекул между ядром и цитоплазмой на данном оптическом срезе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ЧТО ЖЕ УДАЕТСЯ СДЕЛАТЬ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ВФПФ и КЛСМ?

Результаты экспериментальных исследований, проведенных в лабораториях, создавших подобные установки, оказались весьма интригующими. В рамках статьи трудно подробно проанализировать их, назовем лишь некоторые (каждый из приводимых примеров достоин написания отдельной статьи).

С использованием обоих методов (конечно, наряду с биохимическими и генно-инженерными) были качественно и количественно описаны процессы внутриклеточного транспорта, особенно цитоплазматическо-ядерного. Выяснилось, что сигнал ядерной локализации — необходимый, но не единственный фактор, определяющий скорость цитоплазматическо-ядерного транспорта белков (например, уже упомянутого большого ядерного Т-антигена вируса SV40). Методом количественной флуоресцентной КЛСМ исследовали и сравнивали ки-

нетики накопления в ядре клетки разных вариантов этого белка, содержащих замены разных аминокислот, фосфорилирование которых, как предполагалось, должно сказываться на скорости транспорта белка в ядро. Оказалось, что фосфорилирование одних аминокислот, расположенных ближе к N-концу от сигнала ядерной локализации, резко ускоряло транспорт в ядро, других замедляло. Таким образом, выявились новые механизмы регуляции цитоплазматическо-ядерного транспорта.

Этот же метод оказался незаменимым подспорьем для экспериментального подтверждения внутриклеточной локализации лекарств при разработке путей направленной внутриклеточной доставки противоопухолевых препаратов.

Удалось экспериментально подтвердить гипотезу “подвижного рецептора”, высказанную в 1976 году П. Кватреказасом. Оказалось, что многие рецепторы подвижны в плазматической мембране живых клеток, их коэффициенты латеральной диффузии обычно варьируют в пределах 10^{-11} – $5 \cdot 10^{-10}$ см²/с (метод ВФПФ). Эти величины оказались значительно (на три-четыре порядка) меньше, чем D_L для белков, встроенных в искусственные мембраны. Данные различия побудили исследователей искать их причины, что привело к выявлению новых, ранее неизвестных механизмов регуляции активности мембранных белков (метод ВФПФ и исследования функциональной активности белков).

ЛИТЕРАТУРА

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 2. Гл. 8, 12.

Рецензент статьи А.Н. Тихонов

* * *

Александр Сергеевич Соболев, доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ, зав. лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена РАН, член-корреспондент Американской ассоциации по исследованию рака, действительный член Международной фотодинамической ассоциации. Область научных интересов – биофизика внутриклеточного транспорта, медицинская биофизика, направленная внутриклеточная доставка лекарств и генетического материала для биотехнологических и медицинских целей. Автор более 160 научных работ, в том числе одной монографии, трех российских и шести иностранных патентов.