

Boisko pod mikroskopem



REMIGIUSZ WORCH

Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa
remiwo@ifpan.edu.pl

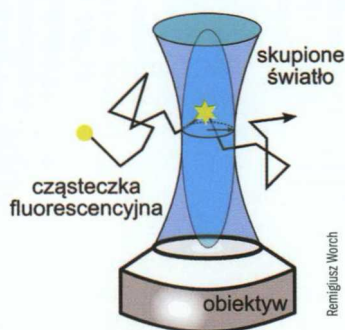
Dr Remigiusz Worch interesuje się dynamiką i oddziaływaniami biomolekuł oraz technikami fluorescencyjnymi, współpracuje z Festiwalem Nauki w Warszawie.

Dzięki technikom optycznym możemy badać zjawiska fizyczne na poziomie pojedynczych molekuł

„Wszystko się porusza” – tak właśnie według Platona brzmiała sławna maksyma *Panta rei* Heraklita. Od zarania dziejów ruch fascynował zarówno filozofów, badaczy natury, jak i artystów. Wojciech Kilar dla uczczenia obchodów Światowego Roku Fizyki w 2005 roku skomponował „Symfonię o ruchu” (*Sinfonia de motu*). Szkockiego botanika Roberta Browna w zdumienie wprawiły ruchy pyłku roślinnego w zawieszynie wodnej, jakie zaobserwował pod mikroskopem w latach dwudziestych XIX wieku.

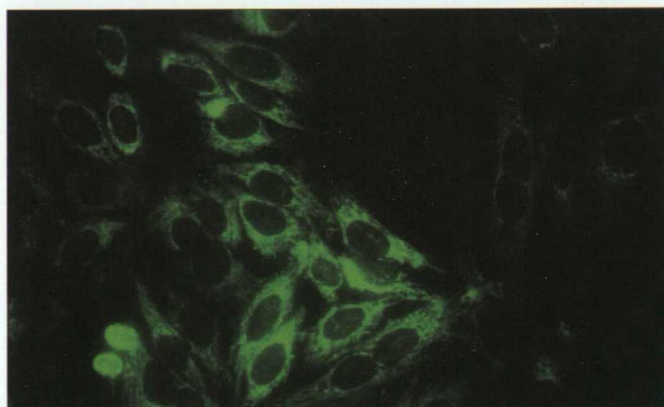
Niewiarygodne wydawało mu się to, że poruszanie się drobin występuje bez żadnego wyraźnego źródła – sądził, że ruch ten związany jest z procesami życiowymi. Ciekawość popchnęła go do eksperymentów z materiałem nieorganicznym – zdecydował się zresztą na wyrafinowaną próbkę w postaci sproszkowanych kawałków Wielkiego Sfinksa w Gizie. I ku swojemu zaskoczeniu zobaczył ten sam efekt.

Dziś wiemy, że źródłem obserwowanego w ten sposób ruchu jest energia termiczna, dostatecznie duża w skali molekularnej, a widoczny ruch większych obiektów to skutek ciągłych zderzeń z cząsteczkami rozpuszczalnika (wody). Teorię ruchów Browna wyjaśnili w swoich pracach z początków XX wieku Albert Einstein i Marian Smoluchowski.

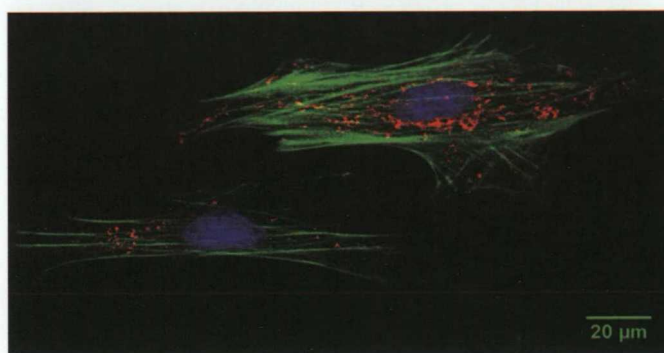


Mikroskopowa technika FCS. Skupione przez obiektyw światło laserowe stanowi tu „koło” na środku boiska, przez które dyfundują fluorescencyjne cząsteczki. Strzałką zaznaczono krótszą półoś elipsoidy. Jeżeli są w środku, rejestrowany jest pochodzący od nich sygnał fluorescencji *F*. Zarejestrowany w czasie *t* jest analizowany przez obliczenie krzywej autokorelacji $G(\tau)$, która, tak samo jak w przypadku koszykarzy, daje informacje o średnim stężeniu molekuł oraz średnim czasie przebywania w ognisku

Mimo że Brown usilnie szukał przykładu jak najdalego od żywej materii (stąd wykorzystanie owego pyłu z egipskiego posągu), to wiadomo, że wszystkie jej składniki, łącznie z tymi najmniejszymi, również znajdują się w ruchu (można to łatwo zaobserwować np. w kropli mleka, gdzie widoczny jest ruch pojedynczych kropelek tłuszczu o rozmiarze kilkuset nanometrów). Skoro wszystkie procesy fizjologiczne można opisywać na poziomie molekularnym, to warto wiedzieć, jak wygląda dynamika molekuł w ich naturalnym środowisku.



Najbardziej wyrafinowane techniki mikroskopii optycznej pozwalają obrazować ze zdolnością rozdzielczą co najwyżej kilkudziesięciu nanometrów, co nadal nie pozwala na bezpośrednią obserwację molekuł. Na zdjęciu preparat fluorescencyjny



Obraz komórki rejestrowany za pomocą mikroskopu konfokalnego (preparat firmy Invitrogen, nr kat.: F-36925). Technika ta pozwala obrazować ze zdolnością rozdzielczą co najwyżej kilkudziesięciu nanometrów (w przypadku tzw. technik superrozdzielczych), co nadal nie umożliwia bezpośredniej obserwacji molekuł. Obraz zarejestrowano za pomocą aparatury zakupionej dzięki Krajowemu Laboratorium Multidyscyplinarnych Nanomateriałów Funkcjonalnych NanoFun współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka POIG.02.02.00-00-025/09/

Zastosowanie technik fluorescencyjnych w badaniach molekularnych

Komórkowy zgiełk

Gdybyśmy tylko mogli skurczyć się do rozmiarów mikrometra i wejść do wnętrza komórki, zobaczylibyśmy mnóstwo rozmaitych cząsteczek poruszających się w różne strony. Niektóre łączyłyby się ze sobą, a potem odłączały; jedne „wpływałyby” do swoistych przedziałów, jakimi są organelle, inne z nich się wydostawały. Zobaczylibyśmy wielki tłok i poruszenie, całkiem jak w centrum dużego miasta. Ale z pewnością nie znaleźlibyśmy żadnego małego człowieczka z długą, siwą brodą, jak symbolicznie przedstawiano to w popularnym filmie „Było sobie życie”. Nikt nie zasiada za sterami i nie decyduje o tym, co się dzieje we wnętrzu komórek – to opisują prawa fizyki i chemii.

W dzisiejszym świecie, żeby rozumieć procesy życiowe, powstawanie i przebieg chorób, znaleźć nowe leki, trzeba zrozumieć jak działają molekuly w komórce. Ale czy można zaobserwować ich ruch w tak złożonym środowisku, biorąc pod uwagę to, że mówimy o rozmiarach kilku nanometrów, czyli znacznie mniejszych niż krople tłuszczu w mleku? Nikt przecież nie wejdzie do wnętrza komórek. Najbardziej wyrafinowane techniki mikroskopii optycznej pozwalają obrazować ze zdolnością rozdzielczą co najwyżej kilkudziesięciu nanometrów, co nadal nie pozwala na bezpośrednią obserwację molekuł. Czy można zatem użyć mikroskopu optycznego do badania procesów molekularnych, leżących u podstaw wszelkich procesów życiowych?

Molekularne boisko

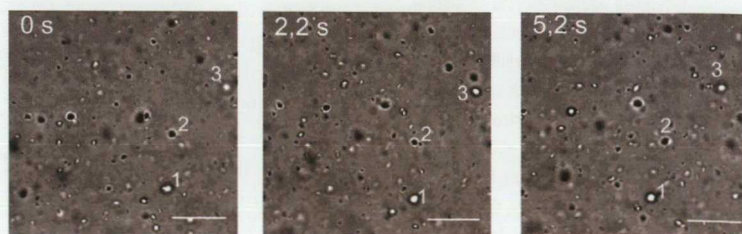
Żeby odpowiedzieć na to pytanie, najłatwiej wyjść – przynajmniej myślowo – na... boisko i przeprowadzić swojego rodzaju eksperyment. Ustalmy, że będzie to boisko do koszykówki o wymiarach 15 x 28 m. Jednak naszą uwagę skupimy nie na samej grze, ale na obserwacji graczy przebiegających przez koło na środku, mające promień 1,8 m. Założmy, że ruch graczy jest określony zasadami błędzenia przypadkowego w dwóch wymiarach. Są one bardzo proste: dla każdego zawodnika rzucamy dwiema monetami. Umówmy się, że orzeł na pierwszej z nich oznacza krok w lewo, reszka w prawo, a na drugiej orzeł to krok w górę, reszka w dół. W przypadku dojścia do linii bocznych zawodnik „odbija się” od nich. A teraz powiedzmy, że ktoś będzie przekazywać informacje o liczbie graczy w środku koła w nieco wyrafinowany sposób – kiedy zawodnik znajdzie się w środku, zapala jedną żarówkę, kiedy zaś wyjdzie z tego obszaru – gasi ją. Oczywiście dysponuje on dostateczną liczbą żarówek i dobrym refleksem. W danym momencie liczba zapalonych żarówek będzie taka jak liczba koszykarzy w środku boiska. Czy gdyby ktoś inny nie mógł obserwować bezpośrednio naszego myślowego meczu, a miał do dyspozycji jedynie zapis sygnału, jakim byłoby natężenie światła zarejestrowane w czasie, czy mógłby zrobić z niego użytek? Czy mógłby dowiedzieć się czegoś np. o liczbie graczy na boisku oraz o tempie gry?

Spróbujmy. Jeżeli przez n oznaczymy liczbę graczy w kole, a k będzie pewną stałą tłumaczącą natężenie światła zapalonych żarówek, nasz sygnał, nazwijmy go F , zapisalibyśmy jako $F=k \cdot n$. Jak łatwo sobie wyobrazić oraz jak widać na rys. 4, sygnał F zmienia się w czasie w sposób bardzo nieregularny. Chcąc opisać te nieregularności, możemy użyć prostych narzędzi statystyki matematycznej, np. z wartości F dla każdej chwili obliczyć średnią (oznaczoną $\langle F \rangle$), jak również tzw. wariancję (oznaczoną $Var(F)$), będącą miarą tego, jak poszczególne wartości odbiegają od średniej. Oblicza się, odejmując od każdej z poszczególnych wartości F ich średnią, a następnie oblicza średnią takich odchyleń, podnosząc je do kwadratu, dla pozbycia się problemów z ich znakiem. Czyli $Var(F) = \langle (F - \langle F \rangle)^2 \rangle$. Okazuje się, że gdy gracze poruszają się przypadkowo, to ich liczba w kole w danym przedziale czasu – a tym samym nasz sygnał F – podlega tzw. rozkładowi Poissona. Rozkład ten ma szczególną cechę, ponieważ średnia wartości jest równa wariancji ($\langle F \rangle = Var(F)$).

No dobrze, ale jakie to ma znaczenie w naszym koszykarsko-świetlnym problemie? Okazuje się, że gdyby policzyć stosunek $Var(F)$ do $\langle F \rangle^2$, okazałoby się, że jest on po prostu równy odwrotności średniej liczby graczy w kole ($1/\langle n \rangle$). Proszę zauważyć, że wynik ten jest zupełnie niezależny od k ! Czyli nieważne, czy do przekazania informacji o graczach użylibyśmy żarówek, diod LED, czy jakichkolwiek innych źródeł światła. Ważne, żeby był to sygnał proporcjonalny do n , który możemy wykryć. Wtedy analizując jedynie taki szum jak na rys. 4, możemy w prosty sposób uzyskać informację o średniej liczbie graczy w środku pola.

Gra pod mikroskopem

Czy to rzeczywiście działa? Możemy to łatwo sprawdzić, wykonując symulację komputerową. Jeżeli z analizy naszego sygnału dostaję średnią liczbę graczy w kole, to po przeskalowaniu przez czynnik odpowiadający polu powierzchni koła ($\Pi \cdot (1,8 \text{ m})^2$) do pola boiska (28 m \cdot 15 m) powinniśmy dostać liczbę koszykarzy na boisku. Średnia z moich przeprowadzonych dziesięciu symulacji wyniosła $10,1 \pm 2,3$, co w zupełności się zgadza. Co więcej, taki sygnał zawiera także informacje o dynamice naszej gry. W tym celu można dokonać tzw. analizy autokorelacji sygnału. Formalny opis tej procedury jest nieco złożony, ale intuicyjnie chodzi o zbadanie, jak sygnał jest podobny do samego siebie w kolejnych krokach, jakie robią nasi gracze. Analiza taka umożliwi wy-



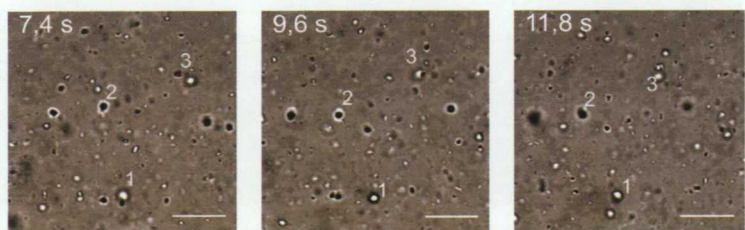
Klatki filmu z mikroskopu konfokalnego obrazujące ruchy Browna kropel tłuszczu w mleku.

lowienie charakterystycznego czasu, jaki zawodnik spędza w kole. Znając promień koła, możemy łatwo dostać informację o tzw. współczynniku dyfuzji, który jest swojego rodzaju odpowiednikiem prędkości dla ruchów przypadkowych, takich jak ruch Browna naszych koszykarzy.

Ruch i stężenie molekuł badamy dokładnie tak samo. Ta boiskowa gra to makroskopowa ilustracja mikroskopowej techniki nazywanej spektroskopią korelacji fluorescencji (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS). Tu funkcję koła na boisku spełnia skupione przez obiektyw mikroskopu światło laserowe, które efektywnie „wycina” w przestrzeni elipsoidę o krótszej półosi rzędu 200 nm. Jak pamiętamy z początku artykułu, to nadal dużo w skali molekuł. Natomiast mimo że samych znakowanych fluorescencyjnie molekuł nie możemy obserwować bezpośrednio, to okazuje się, że analiza, taka sama jak w przypadku boiska, dostarczy nam informacji o liczbie molekuł (zatem ich stężeniu) oraz o dynamice ich ruchu. A ponieważ ta technika jest techniką mikroskopową, ruch taki możemy badać zarówno w roztworach, jak i we wnętrzu żywych komórek, w błonach komórkowych lub sztucznych układach imitujących te struktury. Technika FCS ma także swojego rodzaju rozszerzenie na dwa kolory: gdyby chcieliśmy badać zdolność znakowanych molekuł – powiedzmy zielonych i czerwonych – do oddziaływania ze sobą, można użyć drugiego lasera, wzbudzającego, czyli „widzącego” drugi rodzaj molekuł. Jeżeli molekuły występują jako czerwono-zielony kompleks, będą się poruszać jako jeden obiekt, w przeciwnym przypadku będzie to ruch niezależny. Będzie to widać w rejestrowanych sygnałach. To z kolei jakby patrzeć z góry na ruch kogoś spacerującego po parku. Ktoś chodzi, przysiadł na ławce, potem znów spaceruje. Dla nas to sygnał zielony. W parku pojawia się pies – sygnał czerwony. Jeśli nie jest to nasz własny czworonożny przyjaciel, wyprowadzany na smyczy (ten tworzy z nami „kompleks”), sygnał zielony nie będzie podobny do czerwonego i da niską tzw. korelację krzyżową (między dwoma sygnałami). W drugim przypadku podobieństwo sygnałów będzie duże. Na tym polega spektroskopia krzyżowej korelacji fluorescencji (*fluorescence cross-correlation spectroscopy*, FCCS).

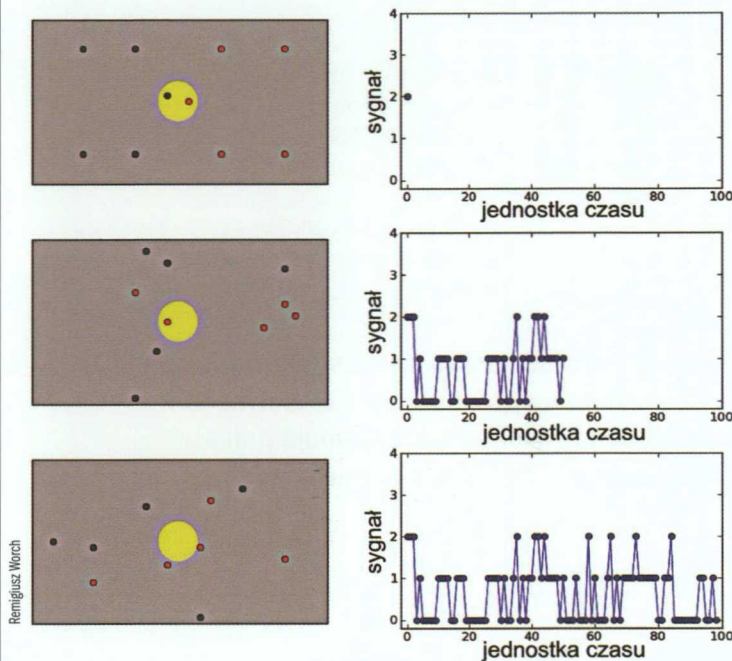
Za granicami nanoświata

O technikach tych dowiedziałem się w 2005 roku i od razu wiedziałem, że w przyszłości chcę się nimi zajmować. W dotychczasowych pracach zastosowałem



Przykłady „siedzących” pojedynczych kropelek oznaczono przez 1, 2, 3. Pasek skali odpowiada 10 μ m

je m.in. do badania oddziaływań fragmentów białek przechodzących przez błonę komórkową (tzw. helis transbłonowych), jak również do badania ruchliwości lipidów i białek w sztucznie utworzonych strukturach imitujących te występujące naturalnie. Dzięki wynikom



Remigiusz Worch

Klatki animacji przedstawiającej opisywaną grę na boisku koszykowym. Rejestrowany sygnał jest proporcjonalny do liczby graczy znajdujących się w kole na środku boiska

można wnioskować o wpływie struktury błony komórek na ruch i oddziaływania elementów je tworzących. W szczególności okazało się, że obecność cytoszkieletu, swobodnego rusztowania we wnętrzu komórki, w inny sposób wpływa na mobilność białek w błonie, a w inny na mobilność lipidów. Stosując metodę FCS w wersji dwukolorowej, udało nam się także pokazać – wbrew istniejącym schematom – że kompleksy pewnego typu receptorów (interleukiny-4) wcale nie są tworzone na powierzchni komórki, tylko w ich wnętrzu. Moim celem na najbliższe lata jest stworzenie warsztatu badawczego do badań dynamiki i oddziaływań biomolekuł zaangażowanych w różne procesy, takie jak: wczesne etapy inwazji wirusa grypy, modelowe reakcje chemiczne zachodzące w warunkach komórkowych, zmiana struktury i dynamiki błon lipidowych w obecności białek, które się w niej kotwiczą. Również w nanoświecie molekuł wszystko się porusza! ■

Chcesz wiedzieć więcej?

Worch R., Bokel Ch., Hofinger S., Schwille P., Weidemann T. (2010). Focus on composition and interaction potential of single-pass transmembrane domains *Proteomics*, 10: 4196-4208.