

УДК 591

АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ *in vivo* ИЛИПОЧЕМУ МАЛЕНЬКАЯ РЫБКА ЛУЧШЕ БОЛЬШОГО ТАРАКАНА

© 2012 г. Владимир Корж^{1,2}, Торстен Воланд³

¹Институт Молекулярной и Клеточной Биологии, Сингапур

E-mail: vlad@imcb.a-star.edu.sg

²Департамент Биологических Наук и

³Департамент Химии, Национальный Университет Сингапура, Сингапур

Поступила в редакцию 17.01.11 г.

Окончательный вариант получен 30.03.11 г.

Ключевые слова: методы изучения одиночных молекул, флуоресцентная корреляционная спектроскопия, флуоресценция полного внутреннего отражения, резонансный перенос энергии флуоресценции, микроскопия при освещении выбранной плоскости, данио, медака, *C. elegans*.

Вместо предисловия

До недавнего времени исследования биологических свойств белка были ограничены анализом свойств белковых молекул в комплексах. Рассмотрим в качестве примера методы кристаллографии или электронной микроскопии используемые для исследования поведения молекул в кристаллах и растворах или после фиксации биологического материала. Они незаменимы для изучения деталей структуры белковых молекул в статическом состоянии. Что же касается кинетических или динамических свойств молекул живой материи, то в силу фиксации молекул в определенной конформации эти свойства приносятся в жертву высокой степени разрешения достигаемой при исследовании структуры молекулы в статическом состоянии (Сердюк, 2002). И все же недавний прогресс в разработке новых методов исследования одиночных молекул (МИОМ) позволяет изучать свойства отдельных молекул с достаточно высоким разрешением в пространстве и времени. В биологии исходно МИОМ использовали для исследования клеток *in vitro*. Что же касается применения МИОМ *in vivo* то такие попытки были предприняты совсем недавно.

Но прежде чем начать обсуждение преимуществ и недостатков МИОМ, надо установить что подразумевается под условиями *in vitro* или *in vivo*. Некая путаница в эти понятия внесена как узкой специализацией биологов в разных областях исследования так и сравнительно недавней массовой миграцией в биологию специалистов небиологических профессий – химиков, физиков, математиков. Именно поэтому исследование клеток в культуре, что для биолога развития происходит *in vitro*, для кристаллографа происходит *in vivo* в широком смысле этого определения, т.е. в живом веществе, в то время как для биолога развития *in vitro* означает

содержание клеток в культуре. В этом контексте *in vivo*, в его узком понимании в биологии развития, предполагает исследование непосредственно в целостном живом организме. Поскольку в этом обзоре речь пойдет в основном о исследованиях на стыке оптики и биологии развития, эти термины будут применяться в их узком значении, а именно как это принято в биологии развития.

В данный момент полный потенциал МИОМ для исследований в живых организмах остается далеко не востребован. Одна из причин тому – междисциплинарная пропасть все еще разделяющая физиков и биологов. Ведь именно физики разрабатывают методы и инструменты для исследования одиночных молекул, но в силу специализации им, как правило, недостает понимания биологических процессов. В свою очередь биологи накопили значительный опыт в поддержании клеток в культуре и знают как правильно расположить клетки и животных под микроскопом. Однако большинство биологов не знакомы со сложными инструментами и тем более с моделями на стадии их разработки. А уж что касается эффективной эксплуатации этого оборудования или обработки результатов предполагающей отсутствие страха перед математическими формулами это, как говорится в Одессе, “две большие разницы”. Но поскольку с развитием биоинформатики и внедрением коммерчески доступных специализированных микроскопов с хорошо знакомыми наклейками “Zeiss” и “Leica” междисциплинарная пропасть начала сужаться, появились реальные возможности измерять свойства и поведение биологических молекул *in vivo*. И также как “на всякую рыбку свой едок есть” так для разных потребностей разработаны различные МИОМ. А поскольку многие из этих методов основаны на флуоресценции, это

делает их особенно привлекательными для исследования живых организмов.

Подобно миру Птолемея, что покоился на трех китах, МИОМ покоятся на достижениях в нескольких областях исследования. Начало было положено фундаментальными исследованиями в кинетике релаксации и динамическом светорассеянии, а более позднее распространение МИОМ произошло благодаря внедрению конфокальной микроскопии и высокочувствительных светодетекторов. Еще в 1970е годы детекция одиночной флуоресцентной молекулы в растворе показала реальную возможность этих методов (Hirschfeld, 1976). Тем же из читателей кого интересует история развития МИОМ, следует обратиться к специальным обзорам (Rigler, 1995; Elson, 2004). По мере развития МИОМ происходило осознание их возможностей и появлялись все более новые приложения этих методов. В частности, флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС), которую разрабатывали исходно для измерения кинетики химических реакций, в настоящее время успешно используется для измерения молекулярной агрегации, динамики фотофизических процессов, изменения конформации молекул и т.д.

Параллельно происходило изучение природных флуоресцентных белков (ФБ) открытие которых предвосхитило первые разработки в области МИОМ (Shimomura et al., 1962). В течение длительного времени ФБ не находили широкого применения пожалуй только за исключением акворина (aequorin), которым пользовались в качестве детектора внутриклеточного Ca^{2+} (Shimomura et al., 1990; Webb and Miller, 2003). И только клонирование гена кодирующего зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ) в 1994 году (Chalfie et al., 1994; Ormo et al., 1996) инициировало лавину статей с применением этого маркера и навсегда изменило методологию исследований в нейробиологии, биологии клетки, биологии развития и многих других разделах биологии. Вскоре стала ясна полезность флуоресцентных белков для МИОМ и прежде всего для ФКС (Terry et al., 1995). И поэтому клонирование новых генов ФБ (прежде всего из кораллов) и их модификация явились двигателем прогресса в этой области исследований (Campbell et al., 2002; Labas et al., 2002; Shaner et al., 2004). Здесь уместно отметить, что в этом процессе важную роль сыграло сотрудничество ученых Института биоорганической химии и Московского Университета, которые и в настоящее время продолжают диктовать моду в разработке новых типов ФБ и их применения (Shcherbo et al., 2007, 2010).

Принято считать, что даже генетически идентичные клетки в культуре тем не менее существенно отличаются между собой. В этой связи кажется очевидным то обстоятельство, что биологическая активность клеток различных органов и тканей

многоклеточного организма существенно отличается и меняется в зависимости от окружающей среды. Однако остается неясным отличаются ли основные свойства биологических макромолекул *in vitro* и *in vivo* в той же степени, что и биологическая активность клеток в культуре и в живом организме. Такое сравнительное исследование можно провести используя МИОМ основанные на флуоресценции для анализа биологических процессов в клетках в культуре или в прозрачных животных, таких как например круглые черви *C. elegans* или прозрачные эмбрионы модельных позвоночных — данио (*Danio rerio*) и медаки (*Oryzeas latipes*). Как и ожидалось, первые исследования такого рода в основном имели целью доказать их практическую возможность *in vivo* и потому лишь приоткрыли завесу скрывающую сложность биологических процессов на уровне отдельных молекул в клетках многоклеточных животных.

Применение МИОМ для анализа процесса развития *in vivo*

Введение в флуоресцентную корреляционную спектроскопию (ФКС)

Будучи разработан почти 40 лет тому назад (Magde et al., 1972) ФКС представляет собой очень чувствительный метод основанный на статистическом анализе колебаний флуоресценции измеряемых в ограниченном наблюдаемом объеме (рис. 1). Такие колебания содержат информацию о динамическом поведении флуоресцирующих молекул. Любой молекулярный процесс изменяющий флуоресценцию в наблюдаемом объеме может быть зарегистрирован и анализирован посредством корреляционной функции. Нормализованная автокорреляционная функция (АКФ) определяется как:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2},$$

где $\langle \dots \rangle$ определяет среднее время и $F(t)$ представляет собой интенсивность флуоресценции за время t . По выполнению автокорреляционного анализа экспериментальные кривые АКФ сравнивают с соответствующей моделью исследуемого процесса. Таким образом можно регистрировать и оценивать любое влияние на коэффициент диффузии за счет изменений среды окружающей флуоресцирующую частицу или ее взаимодействие с компонентами среды.

Измерение изменения флуоресценции позволяет описать динамическое поведение флуоресцирующих молекул и таким образом измерить их концентрацию и коэффициент диффузии. Эти параметры содержат достаточно информации для

вычисления констант диссоциации и стехиометрии связывания (Rauer et al., 1996; Van Craenenbroeck and Engelborghs, 1999; Wohland et al., 1999), агрегации и периода временного связывания (Starchev et al., 1998; Eggeling et al., 2009), взаимодействия белков с компонентами мембраны и в частности с ее липидами (Первошикова, 2009; Первошикова и др., 2009; Pramanik and Rigler, 2001; Kahya et al., 2004; Vacía et al., 2004; Briddon and Hill, 2007) и т.д.

Введение в флуоресценцию полного внутреннего отражения (ФПВО)

В микроскопах основанных на принципе полного внутреннего отражения (ПВО) свет покидает объектив микроскопа в виде параллельного пучка световых лучей (рис. 2). Когда луч достигает предметное стекло, а с ним и границу раздела стекла и воды весь луч может быть отражен при условии, если угол падения превышает критический угол q_c , который зависит от коэффициентов рефракции воды и стекла ($\sin q_c = n_{\text{воды}}/n_{\text{стекла}}$). При этом на границе воды и стекла освещается тонкий слой среды прилегающий к стеклу. ФПВО применяется для освещения и возбуждения флуоресцентных веществ находящихся на или вблизи границы раздела стекла и воды. В применении к биологическим образцам это выражается в освещении пограничного слоя среды толщиной менее 100 нм над поверхностью стекла в котором и располагают биологический образец, который может быть представлен клеточной мембраной и прилегающий к ней тонким слоем цитоплазмы. Это позволяет изучать перемещение в клеточной мембране или вблизи ее отдельных флуоресцирующих молекул и их взаимодействие с другими молекулами (www.inauka.ru/science/article85409.html).

Введение в резонансный перенос энергии флуоресценции (РПЭФ) одиночными молекулам

РПЭФ происходит при взаимодействии диполей представленных двумя флуорофорами – донором и акцептором возбуждаемых светом разной длины волны (рис. 3). Если донор и акцептор расположены на расстоянии не более 10 нм, то возбуждение донора приводит не только к свечению донора, но и к переносу энергии на акцептор и его возбуждению, что вызывает появление сигнала флуоресценции с характерным для акцептора спектром. При этом даже небольшие изменения расстояния между этими молекулами существенно влияют на эффективность переноса энергии. Это позволяет регистрировать динамические изменения поведения молекул, как то изменение расстояния между молекулами либо их конформации. В биологии широкое применение нашли РПЭФ биосенсоры представляющие собой как правило одну из пар ФБ соответствующих требованиям

РПЭФ (ЕСFP и EYFP или EGFP и mRFP) соединенных с доменом детектора. При изменении конформация этого домена в зависимости от изменения определенных клеточных свойств происходят изменения сигнала РПЭФ.

Введение в микроскопию при освещении выбранной плоскости (МОВП)

Этот новый метод микроскопии был разработан и применен для прижизненного трехмерного анализа распределения специфического сигнала каковым является экспрессия флуоресцентного белка в относительно прозрачных и довольно толстых объектах какими являются эмбрионы костистых рыб (данио или медаки, Huisken et al., 2004; Keller et al., 2008, 2010; <http://www.scientific.ru/journal/news/0904/n130904.html>). При традиционной микроскопии такие попытки часто заканчиваются нарастанием фона до уровня специфического сигнала что делает невозможным точные измерения или наблюдение специфического сигнала в толстых или не полностью прозрачных образцах.

При МОВП возбуждение и регистрация флуоресценции разделены и осуществляются независимо друг от друга посредством разнесения оптических осей освещения и детекции сигнала. Здесь для освещения образца используется отдельный целевой источник света освещающий фокальную плоскость микроскопа. Этот источник светит перпендикулярно оси детекции флуоресценции для чего используется оптика микроскопа. Одно из преимуществ МОВП состоит в том, что поскольку наблюдаются все освещенные участки образца доза света необходимая для наблюдения всего образца снижается. Это приводит к повышению скорости измерения флуоресценции в каждом образце и снижению их выгорания. Наличие быстродействующей камеры в микроскопической системе основанной на МООП делает возможным ее применение для ФКС и других МИОМ (рис. 4; Wohland et al., 2010).

Применение МИОМ для исследования *in vivo*

Недавно ФКС нашла применение *in vivo* для анализа различных проблем в области биологии развития. Первая публикация на эту тему была “вынужденной”. Исходный вариант статьи описывал исследование потока жидкости в искусственных капиллярах с помощью ФКС в режиме линейного сканирования в пределах 3 мкм. И как частенько бывает этот первый вариант особого энтузиазма у рецензентов не вызвал. Однако к тому времени авторы уже освоили использование конфокальной микроскопии в комбинация с ФКС и проводили наблюдение развивающихся эмбрионов данио (*zebrafish, Danio rerio*) параллельно с измерениями динамического поведения отдельных молекул. Поэтому в качестве дополнительного ар-

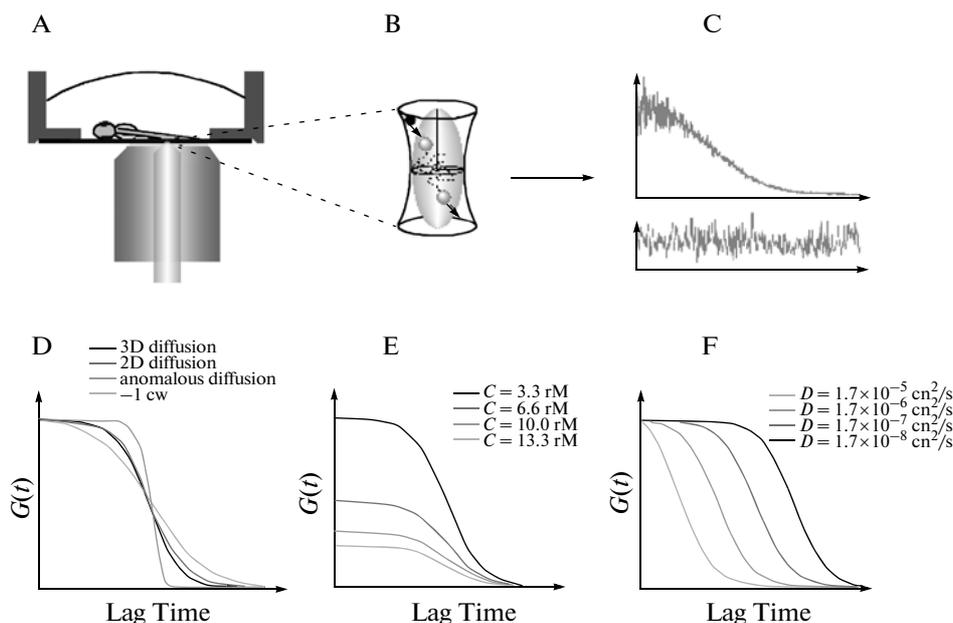


Рис. 1. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС).

A – фокус лазера конфокального микроскопа расположен в определенном участке образца. При однофотонном возбуждении глубина проникновения света не превышает 50–100 мкм.

B – при перемещении флуоресцирующих молекул в конфокальном объеме возникают флуктуации интенсивности флуоресценции. В идеале сигнал флуоресценции содержит информацию о количестве молекул и их движении.

C – автокорреляционная функция (АКФ) интенсивности сигнала представляет собой статистически усредненное значение выражающее поведение молекул. Ширина АКФ представляет информацию о движении молекул, а ее амплитуда – о их концентрации. При сравнении полученной кривой автокорреляции с соответствующей модельной функцией могут быть рассчитаны характерная временная шкала и концентрация молекул.

D–F – типичные изменения АКФ при изменении различных параметров. D – различные варианты движения молекул, в том числе различные варианты диффузии или потока молекул приводят к характерным изменениям формы АКФ. E – изменение концентрации приводит к изменению амплитуды АКФ; чем выше концентрация, тем ниже амплитуда. F – изменение скорости движения молекул меняет ширину АКФ; чем медленнее скорость движения, тем шире АКФ.

гумента в новый вариант статьи были введены результаты полученные при исследовании динамики поведения молекул на ранних стадиях развития кровеносных сосудов у данио и в том числе при анализе направления кровотока и его скорости. К счастью этого оказалось более чем достаточно, чтобы убедить рецензентов и одновременно подтвердить старую истину, которая гласит что “маленькая рыбка лучше большого таракана”. А ведь в то время возможность применения ФКС для исследований *in vivo* далеко не всем казалась очевидной. Но после первой статьи описавшей применение ФКС *in vivo* и доказавшей перспективность этого направления (Pan et al., 2007) эти споры были забыты.

Вскоре ФКС и РПЭФ использовали для изучения динамических свойств белков в характерном для первичных половых клеток образовании “nuage” (франц. “облако”). При этом эмбрионы медаки (medakafish, *Oryzias latipes*) были препарированы для максимального приближения образца к объективу, так что исследование производили в условиях хоть и приближенных к *in vivo*, но определяемых строго как “ex vivo”, т.е. “вне живого” (Na-

gao et al., 2008). Примерно в это же время МИОМ использовали для изучения локализации и распределения ЗФП-меченных белков NMY-2 and PAR-2 при первом асимметричном делении дробления эмбрионов *C. elegans* (Petrasek et al., 2008) и для исследования динамики белков хроматина в развитии дрозофилы (Bhattacharya et al., 2009).

Параллельно с этим конфокальная микроскопия в комбинация с ФКС была использована для измерения появления кровотока и его скорости при формировании капилляров печени у данио (Korzht et al., 2008; Pan et al., 2009). Позже был достигнут еще более высокий уровень разрешения и этот подход был использован для изучения коэффициента диффузии белков цитозоля и белков связанных с клеточной мембраной в мышцах и нейронах живых эмбрионов данио (Shi et al., 2009a).

И наконец ФКС использовали для исследования взаимодействия белков в двух различных экспериментах. В первом эксперименте одноволновая ФКС была применена для измерения взаимодействия малой ГТФазы Cdc42 и актин-

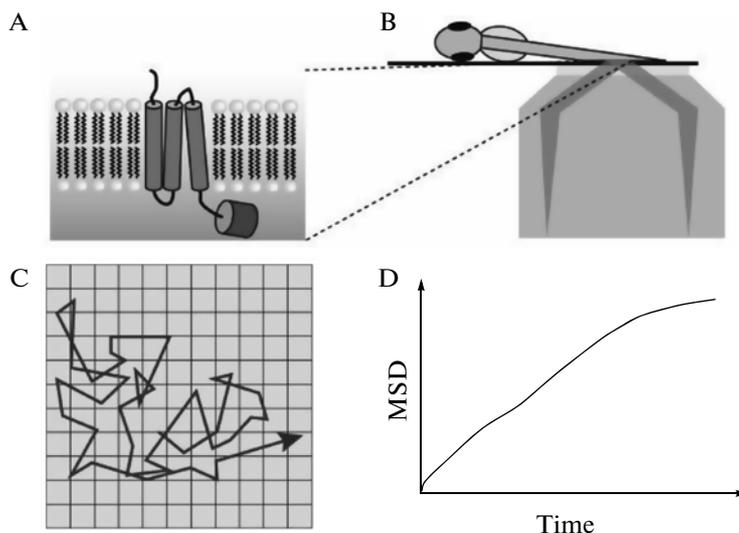


Рис. 2. Микроскопия с использованием флуоресценции полного внутреннего отражения (ФПВО).

A — используется для наблюдения молекул на границе раздела стекла и образца благодаря освещенности тонкого (не более 100 нм) слоя прилегающего к стеклу. При этом происходит возбуждение молекул только в пределах этого слоя в результате чего наблюдение проводится при очень выгодном соотношении сигнал—шум.

B — Schaaf et al. (2008) наблюдали апикальную мембрану клеток поверхностного слоя в живом эмбрионе.

C — таким образом можно наблюдать траекторию движения одиночных флуоресцентных молекул в живом эмбрионе.

D — анализ последовательных изображений позволяет определить направление и скорость движения молекул, а следовательно оценить их подвижность и изменение этого параметра в различных субклеточных доменах или в зависимости от функционального состояния клеток, например, их дифференцировки.

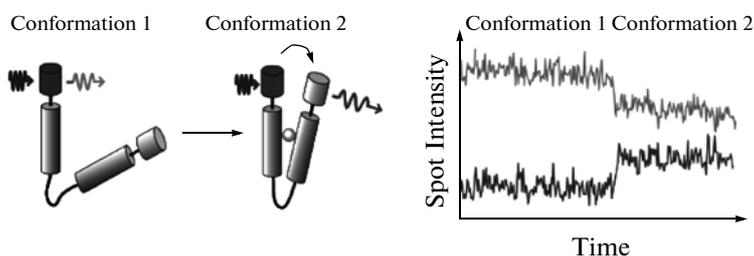


Рис. 3. Биосенсор основанный на резонансном переносе энергии флуоресценции (РПЭФ).

РПЭФ основан на переносе неизлучаемой энергии с флуорофора-донора на флуорофор-акцептор посредством дипольного взаимодействия. При этом необходимо чтобы спектр излучения донора перекрывался со спектром поглощения флуорофора-акцептора. Дипольное взаимодействие строго зависит от расстояния между молекулами и их ориентации и поэтому взаимодействие пар флуорофоров используемых для РПЭФ позволяет выявлять изменение конформации молекул с высокой (до ангстрема) чувствительностью. Эта чувствительность может быть использована для выявления взаимодействия флуоресцентно-меченных белков. В биосенсорах основанных на принципе РПЭФ взаимодействие с лигандом меняет конформацию рецептора или же ориентацию или расстояние между двумя белками мечеными флуорофорами (донор и акцептор) связанных с сенсорным доменом. Часто в качестве пары донор-акцептор используют пару флуоресцентных белков, например голубой и желтый белки (CFP and YFP), которые преобразуют события происходящие на молекулярном уровне в изменение эффективности РПЭФ, которые и детектируются.

связывающего белка IQGAP1 в клетках в культуре и в эмбрионах данио. Результаты исследования одного и того же процесса в клетках и эмбрионах существенно отличались подтвердив старую истину о том, что молекулярные взаимодействия зависят от того в какой из систем (*in vitro* или *in vivo*) проводятся измерения. Следовательно, для получения результатов отражающих ситуацию в живом организме такие измерения должны проводиться в нормальных физиологических условиях, т.е. *in vivo*.

Во втором эксперименте проведенном благодаря сотрудничеству двух лабораторий в Дрездене, в одной из которых изучали биологию развития данио (Михаэл Бранд), а во второй разрабатывали новые применения МИОМ (Петра Швилле), двухволновая ФКС в статическом объеме была использована для анализа взаимодействия подвижности рецепторов Fgfr1 и Fgfr4 в клеточной мембране живых эмбрионов данио и определения констант их связывания. Было показано, что в пе-

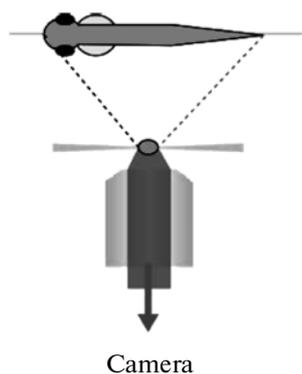


Рис. 4. Микроскопия при освещении выбранной плоскости (МОВП).

При этом подходе возбуждение и регистрация флуоресценции разобщены и происходят в независимых оптических путях, где ось освещения (образца с помощью отдельного шелевого источника света в фокальной плоскости микроскопа) перпендикулярна оси детекции флуоресценции с помощью линз и оптики микроскопа.

риод эпиволии (гастроляции) свободно диффундирующий морфоген FGF8 распределяется в сложной многоклеточной среде по градиенту концентрации кривизна которого определяется как скоростью секрецией белка так и скоростью его поглощения клетками-мишенями (Ries et al., 2009; Yu et al., 2009). Подобные идеи о механизмах распределения морфогенов были развиты при наблюдении и анализе с использованием более традиционных методов при изучении миграции зачатка латеральной линии у данио, где клетки мигрирующие на переднем краю зачатка экспрессируют рецептор *Sxcr4* связывающий лиганд *Sdf1* (*Cxcl12*) представленный на горизонтальной миосепте сомитов. Сам зачаток относительно невелик (около 100 клеток) и для увеличения крутизны градиента концентрации и повышения таким образом степени надежности направленной миграции клетки расположенные в задней части зачатка экспрессируют второй рецептор — *Sxcr7*, обеспечивающий поглощение лиганда (Chong et al., 2001; Lecaudey et al., 2008; Valentin et al., 2008).

Измерения с помощью ФКС проведенные в Дрездене показали, что лиганд (FGF8) распространяется от секретирующих клеток на расстояние не более 50 мкм. Параллельно с этими измерениями РПЭФ был использован учеными Гарвардского университета (лаборатория Алекса Шира) для изучения распределения двух лигандов (*Squint* и *Cyclops*) представляющих *Nodal* данио (Schier et al., unpublished). Было показано, что *Squint* хоть и распространяется значительно дальше чем *Cyclops*, но не столь далеко по сравнению с FGF8. В настоящее время более эффективное по сравнению со *Squint* перемещение FGF8 в биологической ткани является предметом дискуссии имею-

щей целью определить преимущества и недостатки различных МИОМ для исследования биологических процессов *in vivo*. Но даже не дожидаясь завершения этой дискуссии можно заключить, что поскольку статьи Брандта и Швилле были опубликованы в *Nature* и одном из ее клонов, применение МИОМ *in vivo* станет более популярным в самое ближайшее время.

Метод ФПВО был недавно использован при изучении распределение белка Ras меченного флуоресцентным белком на мембране клеток данио в культуре, в первичных эмбриональных стволовых клетках и в клетках эпителия двухдневного эмбриона данио для определения размеров микродоменов (липидных плотиков) (Schaaf et al., 2009). Этим была показана принципиальная возможность использования ФПВО для *in vivo* исследования самых различных мембранных белков. Один из вариантов ФПВО основанный на использовании еще большего угла отражения (Tokunaga et al., 2008) вероятно позволит увеличить толщину приграничного слоя в пределах которого могут проводиться измерения. Таким образом для анализа с помощью ФПВО станут доступны как более глубокие слои цитоплазмы так и ядерная оболочка, а может даже и белки клеточного ядра.

Этот подход также использовался для изучения *in vivo* и *ex vivo* биологических процессов с участием различных сигнальных молекул, например, цАМФ (Lissandron et al., 2007; Shafer et al., 2008), определения места и времени активации каспаз у дрозофилы (Takemoto et al., 2007), наблюдения динамических изменения внутриклеточного Ca^{2+} в процессе гастроляции данио (Tsuruwaka et al., 2007), наблюдения активации катионных каналов у данио (Richler et al., 2008) и анализа активности ГТФаз у ксенопуса (Matthews et al., 2008). РПЭФ также использовали для изучения взаимодействия белков *in vivo* в *C. elegans* (Wagner et al., 2009) и наблюдения конформационных изменений Na^+/Ca^{2+} канала у данио (Xie et al., 2008).

В качестве метода исследования РПЭФ применим для анализа изменения конформации биологических молекул. Но данные полученные с помощью РПЭФ усреднены поскольку конформационные изменения измеряются одновременно во многих молекулах. В принципе модификация этого метода для измерения событий на уровне отдельных молекул может предоставить более разнообразную и, следовательно, более полную информацию о поведении смешанной популяции таких молекул или выявить скрытые промежуточные состояния. Недавний прогресс в развитии новых источников облучения и средств детекции позволяет наблюдение этих процессов на уровне отдельных молекул (РПЭФом). Этот подход позволяет изучать внутримолекулярные взаимодействия, как то динамические конформационные изменения

ДНК, РНК и белка и внутриклеточные взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами и т.д. Но большая часть этих исследований проводится на очищенных биологических молекулах в растворе и поэтому они вероятно не отражают реальной ситуации. Применение РПЭФом *in vivo* является решением проблемы, но такой универсальный подход был достигнут впервые только недавно. Для этого РПЭФом объединили со слежением за одиночной частицей в живой клетке с целью изучения конформационных изменений в молекуле пользуясь ФПВО с разрешением по спектру (Sakon and Weninger, 2010). Этот подход позволил продемонстрировать как отдельные молекулы белков, принимающие участие в транспорте внутриклеточных белков, меченные флуоресцентной парой маркеров (донор—акцептор) для РПЭФ, которые быстро встраиваются в складчатые комплексы на клеточной мембране. Подобный подход был также продемонстрирован для наблюдения стабильности укладки белка и его конформационных изменений в культуре клеток в реальных условиях взаимодействия со многими молекулами ближайшего клеточного окружения (Ebbinghaus et al., 2010). Логически следующим шагом стало использование этого подхода для исследования прозрачных эмбрионов данио, что и было сделано в лаборатории Алекса Ширы в Гарварде.

Quo vadis?

Некоторые из методов относящихся к МИОМ (электронная микроскопия или микроскопия атомных взаимодействий) предполагают фиксацию биологических образцов и по сему в принципе не применимы для исследований *in vivo*. Что же касается иных неоптических методов как например сканирующая микроскопия ионной проводимости (СМИП) то эти методы вероятно еще долгое время будут применяться для исследования в клетках в культуре прежде всего из-за пространственных ограничений налагаемых анализом в условиях *in vivo* (Korchev et al., 2000; Novak et al., 2009).

Что же касается других методов основанных на флуоресценции и в том числе флуоресцентной микроскопии с точностью до одного нанометра, оптических ножниц, движения связанных частиц и т.д., то адаптация этих методов для исследований в области биологии развития не должна представлять непреодолимых трудностей.

Модельные животные и МИОМ

До сих пор выбор животных для исследований с применением МИОМ был довольно ограниченным. В основном использовались представители беспозвоночных — свободно живущие нематоды *C. elegans* и представители позвоночных костистые рыбы *Danio rerio*. И если *C. elegans* остаются про-

зрачными в течение всей жизни, то личинки данио по мере развития, роста тканей, повышения их плотности и появления костей становятся все менее и менее прозрачными. И все же поверхностные ткани взрослых животных и в том числе эпителий и его производные (плавники и чешуя) могут быть использованы для исследований основанных на МИОМ. Более того некоторые из внутренних органов прилежащих к поверхности тела взрослых рыб и в том числе клетки поверхностных слоев печени и поджелудочной железы расположенные вблизи поверхности тела тоже вероятно могут быть использованы для анализа с помощью МИОМ. Хотя наблюдение этих органов у взрослых трангенных данио под флуоресцентным микроскопом делает это предположение весьма правдоподобным (Korzh et al., 2008) оно до сих пор не подтверждено в эксперименте. Однако значительная часть органов взрослых данио и в том числе головной и спинной мозг заключенные в непрозрачные костные и иные оболочки останутся недостижимыми для МИОМ.

МИОМ уже применяли для исследования еще одного из видов костистых рыб, а именно медаки. Вдобавок наличие мутантов данио и медаки со сниженной пигментацией (каспер, альбинос) предоставляют еще один козырь сторонникам использования этих видов в качестве модельных позвоночных в исследованиях основанных на МИОМ (White et al., 2008).

Какие виды позвоночных животных могут быть идеальной моделью для МИОМ?

Идеальным видом беспозвоночных для МИОМ является *C. elegans*. Поэтому исходя из свойств этого вида несложно представить идеальный с точки зрения МИОМ вид позвоночных. Только будучи сравнительно небольшим по размерам и прозрачным на стадии взрослого организма этот вид позвоночных животных может сравниться с *C. elegans*. Такой вид животных должен быть применим в генетике и биологии развития, отличаться легкостью содержания в лаборатории и приносить в этих условиях значительное количество потомства посредством внешнего отлодотворения яйцеклеток в естественных условиях. Выше уже упоминалось что в качестве модели исследования с помощью МИОМ даже данио имеет ряд ограничений в частности еще и потому, что как известно “без костей рыбы не бывает”. Эта ситуация несколько улучшилась ввиду внедрения в лабораторную практику сложных мутантов данио не имеющих пигментации. Казалось бы этим достигнут предел прозрачности позвоночных животных. Но это не так... С учетом большого разнообразия костистых рыб некоторые из которых меньше данио можно предположить, что на взрослых стадиях развития эти животные могут быть еще более прозрачны

чем мутанты данио. Они и могут соответствовать критериям позвоночного животного идеального для МИОМ.

Например, самое миниатюрное позвоночное животное найденное в болотах Суматры, как и данио, принадлежит к семейству *Cyprinidae*. Во взрослом состоянии эти рыбешки вида *Paedocypris progenetica* достигают в длину всего 7.9 мм. У этого вида формируется рудиментарный череп оставляющий большую часть мозга за его пределами (Kottelat et al., 2006). Это связано со значительной редукцией и даже потерей элементов скелета возникающих у данио на поздних стадиях развития. А потому скелет *Paedocypris* напоминает скелет данио на личиночных и ювенильных стадиях развития (Britz and Conway, 2009). Эти свойства делают этот вид рыб весьма привлекательным объектом нейробиологических исследований. В настоящее время существенным недостатком *Paedocypris* является отсутствие опыта содержания этого вида в лаборатории и как следствие отсутствие понимания генетики и биологии развития. Можно предположить, что с учетом глубины понимания биологии данио задача внедрения *Paedocypris* в практику может существенно упроститься. Тем не менее несколько исходных публикаций ограничены только описанием морфологии этого вида.

В водоемах Бирмы водятся три вида *Danio* — *D. mirifica*, *D. translucida*, and *D. dracula*, которые до описания *Paedocypris* считались самыми маленькими видами позвоночных. Эти виды также представляют семейство *Cyprinidae*. Длина взрослых *Danio* около 10 мм (Britz et al., 2009). Эволюционно этот вид также близок данио и есть сообщения аквариумистов об успешном размножении этих видов в аквариумах. Самка мечет несколько яйцеклеток примерно того же размера, что и у данио (Roberts, 1986). К сожалению эти виды пока не внедрены в лабораторную практику.

В списке перспективных кандидатов на роль идеального объекта исследований с применением МИОМ несколько видов так называемых стеклянных рыб и в том числе представитель тетра — *Pristella maxillaries*, несколько видов из семейства *Ambassidae*, и в том числе индийская стеклянная рыба *Parambassis ranga* и стеклянный сом *Kryptopterus bicirrhis*, использование которого в лаборатории маловероятно из-за его агрессивности (<http://www.fishbase.org/home.htm>).

Вместо заключения или потенциальные проблемы

Как любая новая область исследования исследования основанные на МИОМ *in vivo* в биологии развития и физиологии клетки натываются на ряд проблем. Некоторые из них связаны с созреванием флуоресцентных белков, их накопления до необ-

ходимого минимума, нахождения части молекул в нефлуоресцентном состоянии и выгорании флуорофоров. Эти проблемы подробно исследовались в специальных обзорах (например, Verkhusha and Lukyanov, 2004; Giermans et al., 2006; Remington, 2006).

Кроме этого имеются проблемы некоторые из которых характерны для МИОМ. Первая из них это проблема роста. Союз физиков и биологов от которого прежде всего зависит развитие этой области все еще довольно хрупок. Этим в частности и объясняется то обстоятельство что большинство опубликованных статей представляют собой доказательство применения того или иного метода в принципе и поэтому по необходимости выполнены на хорошо опробованных системах микроскопов и осуществляются в рамках изученных биологических проблем. Большая часть использованных методов все еще экспериментальны в своей сути и до сих не внесли существенного вклада в коррекцию или ниспровержение царящих догм покоящихся на данных полученных с помощью исследований выполненных *in vitro*. Эта ситуация должна измениться по мере того как новое поколение “биофизиков развития” почувствуют себя комфортно как в “мокрых” биологических так и в переполненных “железом” физических лабораториях и начнут интегрировать знания полученные на стыке биологии и физики.

При мечении исследуемых белков флуоресцентными белками сложную проблему представляет существенное увеличение молекулярной массы белка после мечения. Без сомнения такие весовые добавки не могут не менять биологические свойства меченных ими молекул добавляя тем самым фактический материал в качестве иллюстрации применения принципа неопределенности Гейзенберга в биологии. Эта проблема может вероятно быть решена в будущем посредством введения соответствующих поправок при моделировании биологических процессов на основе измерений полученных на различных версиях флуоресцентно меченного белка отличающихся по своей молекулярной массе и используемых в качестве стандартов для вычисления калибровочной кривой по которой поведение молекул нормальной массы и конформации может быть рассчитано. Это вероятно потребует создания палитры флуоресцентных белков гораздо большего разнообразия не только по спектру но и по молекулярной массе. К счастью этот процесс уже идет.

Необходимо также решить проблему доставки в клетку строго определенного количества стабильно флуоресцирующих молекул, которое не нарушит нормального клеточного метаболизма. С точки зрения клеточной экономики и в отсутствие надежной количественной информации можно предположить, что в норме внутриклеточные системы

работают почти на полную мощность. И если какой-то резерв и существует, он по всей вероятности довольно ограничен. Ведь даже в эмбрионах анамниот обеспеченных значительным исходно запасом различных молекул и даже органелл только часть этого материала готова к немедленному использованию. Например, если при инъекции в эмбрион ДНК ее количество может возрасти довольно быстро, то на уровне белка существует иная ситуация. Например, количественная оценка наличия участков связывания белков “домашнего хозяйства” присутствующих в эмбрионах костистых рыб в момент оплодотворения показала наличие 20% запаса таких участков связывания (Ключако et al., 1982). Это означает что существуют ограничения физиологического распределения, а следовательно и использования введенных веществ. По сему необходимо помнить что введение биологического материала в эмбрион или клетку посредством микроинъекции создает искусственную ситуацию характеризуемую превышением физиологической концентрации данного материала и сдвигом стохиометрического соотношения различных молекул в клетке. Таким образом в идеале когда целью исследования является измерение соотношения молекул (например лиганда и рецептора), необходимо позаботиться о сохранении их нормального соотношения при их введении в клетку. Например, перед введением меченных молекул в попытке сохранить общий уровень этих молекул можно искусственно понизить внутриклеточный уровень природных веществ. В эмбрионах анамниот это можно сделать путем ингибирования синтеза природных молекул за счет введения антисмысловых олигонуклеотидов на основе морфолино (Nasevicius and Ekker, 2000). Поддержание нормального фенотипа эмбриона после такой экспериментальной процедуры может служить в качестве мерила того насколько успешной оказалась попытка спасения нормальной функции исследуемых молекул. К сожалению такой подход применим к анализу не всех белков. Вместе с тем эти предосторожности могут оказаться излишними в силу того что благодаря высокой чувствительности МИОМ значительный избыток меченных молекул могут и не понадобиться, а кроме того некоторые измерения могут быть основаны на эффекте автофлуоресценции (Korzha et al., 2008).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Перевозицкова И.В.* Исследование митохондрий на уровне одиночных частиц методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии // Автореферат кандидатской диссертации. МГУ, 2009.
- Перевозицкова И.В., Сорочкина А.И., Зоров Д.Б. и др.* Сафранин О как флуоресцентный индикатор мембранного потенциала митохондрий: исследование на уровне суспензии и уровне отдельных митохондрий // Биохимия. 2009. Т. 74 (6). С. 663–671.
- Сердюк И.Н.* Физические методы в структурной молекулярной биологии в начале XXI века // Усп. биол. хим. 2002. Т. 42. С. 3–28.
- Шварцбург А.* Эффект полного внутреннего отражения: сенсация на “стыке двух наук” (<http://www.inauka.ru/science/article85409.html>) воспроизводится по Свет в конце туннеля. Наука и жизнь. 2008. Т. 8.
- Bacia K., Scherfeld D., Kahya N. et al.* Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes // Biophys. J. 2004. V. 87. P. 1034–1043.
- Bhattacharya D., Talwar S., Mazumder A. et al.* Spatio-temporal plasticity in chromatin organization in mouse cell differentiation and during *Drosophila* embryogenesis // Biophys. J. 2009. V. 96. P. 3832–3839.
- Bridson S.J., Hill S.J.* Pharmacology under the microscope: the use of fluorescence correlation spectroscopy to determine the properties of ligand-receptor complexes // Trend Pharmacol. Sci. 2007. V. 28. P. 637–645.
- Britz R., Conway KW.* Osteology of *Paedocypris*, a miniature and highly developmentally truncated fish (Teleostei: Ostariophysi: Cyprinidae) // J. Morphol. 2009. V. 270. P. 389–412.
- Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E. et al.* A monomeric red fluorescent protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 7877–7882.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression // Science 1994. V. 263. P. 802–805.
- Chong S.W., Emelyanov A., Gong Z. et al.* Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b* // Mech. Dev. 2001. V. 109. P. 347–354.
- Eggeling, C., Ringemann C., Medda R. et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell // Nature 2009. V. 457. P. 1159–1162.
- Elson EL.* Quick tour of fluorescence correlation spectroscopy from its inception // J. Biomed. Optics. 2004. V. 9. P. 857–864.
- Giepmans B, Adams S., Ellisman M., et al.* The fluorescent toolbox for assessing protein location and function // Science 2006. V. 312. P. 217–224.
- Hirschfeld T.* Optical microscopic observation of single small molecules // Appl. Optics. 1976. V. 15. P. 2965–2966.
- Huisken J., Swoger J., Del Bene F. et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy // Science. 2004. V. 305. P. 1007–1009.
- Kahya N., Scherfeld D., Bacia K. et al.* Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy // J. Struct. Biol. 2004. V. 147. P. 77–89.
- Keller P., Schmidt A., Wittbrodt J.* Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy // Science 2008. V. 322. P. 1065–9.
- Klyachko O., Korzh V., Gorgolyuk S., et al.* Nonuniform distribution of enzymes in fish eggs // J. Exp. Zool. 1982. V. 222. P. 137–139.
- Korzha S., Pan S., Garcia-Lecea M. et al.* Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish // BMC Dev. Biol. 2008. V. 8. P. 84

- Kottelat M., Britz R., Hui T.H. et al.* Paedocypris, a new genus of Southeast Asian cyprinid fish with a remarkable sexual dimorphism, comprises the world's smallest vertebrate // *Proc. Biol. Sci.* 2006. V. 273. P. 895–899.
- Labas Y.A., Gurskaya N.G., Yanushevich Y.G. et al.* Diversity and evolution of the green fluorescent protein family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 4256–4261.
- Lecaudey V., Cakan-Akdogan G., Norton W.H.J. et al.* Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium // *Development.* 2008. V. 135. P. 2695–2705.
- Lissandron V., Rossetto M., Erbguth K. et al.* Transgenic fruit-flies expressing a FRET-based sensor for in vivo imaging of cAMP dynamics // *Cell. Signal.* 2007. V. 19. P. 2296–2303.
- Magde D., Elson E., Webb W.* Thermodynamic fluctuations in a reacting system – measurement by fluorescence correlation spectroscopy // *Phys. Rev. Lett.* 1972. V. 29. P. 705–708.
- Matthews H., Marchant L., Carmona-Fontaine C. et al.* Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA // *Development* 2008. V. 135. P. 1771–1780.
- Nagao I., Aoki Y., Tanaka M.* Analysis of the molecular dynamics of medaka nuage proteins by fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 341–349.
- Nasevicius A., Ekker S.C.* Effective targeted gene 'knock-down' in zebrafish // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. P. 216–220.
- Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K. et al.* Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Science* 1996. V. 273. P. 1392–1395.
- Pan X., Yu H., Shi X. et al.* Characterization of flow direction in microchannels and zebrafish blood vessels by scanning fluorescence correlation spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. 014034.
- Pan X., Shi X., Korzh V. et al.* Line scan fluorescence correlation spectroscopy for three-dimensional microfluidic flow velocity measurements // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. 024049.
- Petrsek Z., Hoege C., Mashaghi A.* Characterization of protein dynamics in asymmetric cell division by scanning fluorescence correlation spectroscopy // *Biophys. J.* 2008. V. 95. P. 5476–5486.
- Pramanik A., Rigler R.* Ligand-receptor interactions in the membrane of cultured cells monitored by fluorescence correlation spectroscopy // *Biol. Chem.* 2001. V. 382. P. 371–378.
- Rauer B., Neumann E., Widengren J. et al.* Fluorescence correlation spectrometry of the interaction kinetics of tetramethylrhodamin alpha-bungarotoxin with *Torpedo californica* acetylcholine receptor // *Biophys. Chem.* 1996. V. 58. P. 3–12.
- Remington S.J.* Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. V. 16. P. 714–721.
- Richler E., Chaumont S., Shigetomi E. et al.* Tracking transmitter-gated P2X cation channel activation in vitro and in vivo. *Nat Methods* 2008.5:87–93.
- Ries J., Yu S.R., Burkhardt M. et al.* Modular scanning FCS quantifies receptor-ligand interactions in living multicellular organisms // *Nat. Methods* 2009. V. 6. P. 643–645.
- Rigler R.* Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening // *J. Biotechnol.* 1995. V. 41. P. 177–186.
- Roberts T.R.* *Danionella translucida*, a new genus and species of cyprinid fish from Burma, one of the smallest living vertebrates // *Environ. Biol. Fish.* 1986. V. 16. P. 231–241.
- Sakon J.J., Weninger K.R.* Detecting the conformation of individual proteins in live cells // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. P. 203–205.
- Schaaf M.J., Koopmans W.J., Meckel T. et al.* Single-molecule microscopy reveals membrane microdomain organization of cells in a living vertebrate // *Biophys. J.* 2009. V. 97. P. 1206–1214.
- Shafer O.T., Kim D.J., Dunbar-Yaffe R.* Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cyclic AMP imaging // *Neuron.* 2008. V. 58. P. 223–237.
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A. et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotech.* 2004. V. 22. P. 1567–1572.
- Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V. et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging // *Nat. Methods* 2007. V. 4. P. 741–746.
- Shcherbo D., Shemiakina I., Ryabova A. et al.* Near-infrared fluorescent proteins. *Nat. Methods.* 2010. V. 7. P. 827–829.
- Shi X., Teo L.X., Pan X. et al.* Probing events with single molecule sensitivity in zebrafish and *Drosophila* embryos by fluorescence correlation spectroscopy // *Dev. Dyn.* 2009a. V. 238. P. 3156–3167.
- Shi X., Foo Y.H., Sudhaharan T. et al.* Determination of dissociation constants in living zebrafish embryos with single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy // *Biophys. J.* 2009b. V. 97. P. 678–686.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y.* Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. V. 59. P. 223–239.
- Shimomura O., Inouye S., Musicki B. et al.* Recombinant aequorins and semisynthetic recombinant Aequorins // *Biochem. J.* 1990. V. 270. P. 309–312.
- Starchev K., Zhang J., Buffle J.* Applications of fluorescence correlation spectroscopy – particle size effect // *J. Colloid. Interface. Sci.* 1998. V. 203. P. 189–196.
- Takemoto K., Kuranaga E., Tonoki A. et al.* Local initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 13367–13372.
- Terry B.R., Matthews E.K., Haseloff J.* Molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 217. P. 21–27.
- Tsuruwaka Y., Konishi T., Miyawaki A. et al.* Real-time monitoring of dynamic intracellular Ca(2+) movement

- during early embryogenesis through expression of yellow cameleon. *Zebrafish*. 2007. V. 4. P. 253–260.
- Tokunaga M., Imamoto N., Sakata-Sogawa K.* Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. P. 159–161.
- Valentin G., Haas P., Gilmour D.* The chemokine SDF1 α coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr. Biol.* 2007. V. 17. P. 1026–1031.
- Van Craenenbroeck E., Engelborghs Y.* Quantitative characterization of the binding of fluorescently labeled colchicine to tubulin in vitro using fluorescence correlation spectroscopy // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 5082–5088.
- Verkhusha V., Lukyanov K.* The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins // *Nat. Biotech.* 2004. V. 22. P. 289–296.
- Wagner O.I., Esposito A., Kohler B. et al.* Synaptic scaffolding protein SYD-2 clusters and activates kinesin-3 UNC-104 in *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. 106:19605–19610.
- Webb S.E., Miller A.L.* Ca(2+) Signalling and early embryonic patterning during zebrafish development // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007. V. 34. P. 897–904.
- White R.M., Sessa A., Burke C. et al.* Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis // *Cell. Stem. Cell*. 2008. V. 2. P. 183–189.
- Wohland T., Friedrich K., Hovius R. et al.* Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different fluorophores: evidence that the homopentameric 5-hydroxytryptamine type 3As receptor binds only one ligand // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 8671–8681.
- Wohland T., Shi X., Sankaran J. et al.* Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments // *Opt Express*. 2010. V. 18. P. 10627–10641.
- Xie Y., Ottolia M., John S.A. et al.* Conformational changes of a Ca²⁺-binding domain of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger monitored by FRET in transgenic zebrafish heart // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2008. V. 295. P. C388–393.
- Yu S.R., Burkhardt M., Nowak M. et al.* Fgf8 morphogen gradient forms by a source-sink mechanism with freely diffusing molecules // *Nature*. 2009. V. 46. P. 533–536.

Analysis of Properties of Single Molecules *in vivo* or ... Why Small Fish is Better than Empty Dish

Vladimir Korzh^{a,b} and Thorsten Wohland^c

^a Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore
e-mail: vlad@imeb.a-star.edu.sg

^b Department of Biological Sciences

^c Department of Chemistry, National University of Singapore, Singapore

Keywords: single molecule techniques, fluorescent correlation spectroscopy, total internal reflection fluorescence, fluorescence resonance energy transfer, selective plane illumination microscopy, zebrafish, medaka-fish, *C. elegans*.