



Орлова Дарья Юрьевна

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ И
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ЛАЗЕРНОЙ
СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ**

03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения РАН

Научный руководитель: доктор физико-математических наук
профессор
Мальцев Валерий Павлович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
профессор
Барцев Сергей Игоревич

доктор физико-математических наук
профессор
Мешалкин Юрий Петрович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск)

Защита состоится “29” ноября 2011 г. в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 003.007.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биофизики Сибирского отделения РАН по адресу: 660036, Красноярск, Академгородок, д. 50 стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института Биофизики Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан “4” октября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Л.А. Франк

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Исследование поверхностных и внутриклеточных лиганд-рецепторных взаимодействий представляет собой одно из основных направлений развития современной иммунологии, клеточной и молекулярной биологии, а также представляет интерес для биофизики в целом.

В настоящее время изучение защитной реакции организма на инфекции (бактериальные, вирусные, грибковые или паразитарные) становится всё более актуальным. Любая макромолекула, чуждая организму, может вызвать защитную реакцию - иммунный ответ. Взаимодействие типа лиганд-рецептор играет ключевую роль в иммунитете, являясь основой распознавания “свой-чужой” на молекулярном и клеточном уровне. Такой тип взаимодействия важен для различных биологических процессов. Например, передача сигналов от окружающей среды клетки в ее внутреннюю часть происходит путём лиганд-рецепторного взаимодействия белков с сигнальными молекулами.

В последние годы с разработкой новых экспериментальных методов появляется все больше экспериментальных работ, посвященных исследованию кинетики взаимодействий типа лиганд-рецептор. Для исследований поверхностных лиганд-рецепторных взаимодействий проточная цитометрия выгодно отличается от других методов, так как позволяет исследовать кинетику связывания лиганда с рецептором на поверхности одиночных клеток. Для исследований лиганд-рецепторного взаимодействия внутри живых клеток широко применяется метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания с использованием технологии конфокальной сканирующей микроскопии. Однако, для количественных кинетических исследований белковых взаимодействий типа лиганд-рецептор в сильно неоднородных средах (например, в ядрах клеток) эти методы до настоящего времени не были развиты.

Актуальность данной работы определяется методами и объектами исследования.

С одной стороны, существует проблема интерпретации кинетических измерений, проводимых в реальном времени на проточном цитометре, так как при этом разные клетки популяции измеряются в разное время и только однократно. Для решения проблемы интерпретации данных кинетических измерений на проточном цитометре в 2000 году был разработан метод временной эволюции функций распределений для моделирования кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия, однако, не был доведён до практического применения в случае низкой и средней величины аффинности лиганда к рецептору. В данной работе предложено развитие такого метода для случая низкой и средней аффинности лиганда к рецептору. Рассмотрение кинетических данных для лиганд – рецепторного взаимодействия, полученных с помощью проточного цитометра, с точки зрения временной эволюции распределения клеток по интенсивности флуоресценции даёт возможность получить подробную информацию о распределении клеточной популяции по числу поверхностных рецепторов, а также о константах скорости ассоциации и диссоциации на единичном рецепторе. Объектом исследования в данном случае является специфические обратимые лиганд-рецепторные реакции. Важность

исследований обоснована фундаментальной ролью данных процессов в нормальной жизнедеятельности биологического организма.

С другой стороны, существует проблема корректного определения количественных параметров (коэффициент диффузии, константы скорости ассоциации и диссоциации) динамики молекул в среде с неоднородным распределением связывающих центров (например, ядро живой клетки) методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (Fluorescence recovery after photobleaching - FRAP). Объектом исследования являются белки, вовлеченные в процессы транскрипции и трансляции, формирование и поддержание конденсированного хроматина и стабильности генома, а также участвующие в репарации двухцепочечных разрывов ДНК.

Целью данной диссертационной работы является исследование поверхностных и внутриклеточных лиганд-рецепторных взаимодействий с помощью проточной цитометрии и лазерной сканирующей микроскопии на нейтрофилах человека и в фибробластах мышинных эмбрионов, соответственно. Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. Усовершенствовать методику исследования связывания растворенных лигандов с низкоаффинными поверхностными рецепторами клетки, используя математическую модель, учитывающую гетерогенность клеточной популяции по количеству рецепторов.
2. С использованием усовершенствованной методики охарактеризовать нейтрофилы человека по количеству поверхностных рецепторов FcγRIIIb и по скоростям прямой и обратной реакций «лиганд-клеточный рецептор».
3. С использованием метода сканирующей проточной цитометрии исследовать светорассеивающие свойства нейтрофилов человека, а именно: измерить зависимость дифференциального сечения рассеяния от угла рассеяния.
4. Разработать метод анализа кинетики восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания для сильно неоднородных сред с оценкой количественных параметров динамики белков в ядрах живых клеток.
5. Исследовать диффузию гетерохроматиновых негистоновых белков семейства HP1 в ядрах фибробластов мышинных эмбрионов и кинетику реакции их взаимодействия с три-метилованным гистоновым белком H3.

Научная новизна работы определяется следующими наиболее значимыми результатами:

Усовершенствована методика исследования связывания низкоаффинных растворенных лигандов с поверхностными рецепторами клетки, учитывающая гетерогенность клеточной популяции по количеству рецепторов, что позволяет оценивать значения констант скорости прямой и обратной реакций лиганд-рецепторного взаимодействия, а также определять абсолютное распределение рецепторов в клеточной популяции.

Проведена расширенная характеристика нейтрофилов человека по свойствам поверхностных рецепторов FcγRIIIb методом проточной цитофлуорометрии с определением константы скорости реакции «лиганд-клеточный рецептор», константы скорости обратной реакции, распределения клеток по количеству рецепторов.

Впервые развит метод определения константы эффективной диффузии молекул лигандов в среде с неоднородным распределением сайтов связывания (рецепторов) без нахождения полного решения исходной системы дифференциальных реакционно-диффузионных уравнений.

Практическая ценность работы связана с развитием потенциала метода проточной цитометрии для исследования обратимых лиганд-рецепторных взаимодействий на поверхности биологических клеток и метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания для исследования сильно неоднородных сред. В частности, разработанные методы позволяют проводить более полную характеризацию биологических клеток по поверхностным и внутриклеточным рецепторам, а именно: определять константу скорости реакции «лиганд-клеточный рецептор», константу скорости обратной реакции, коэффициент эффективной диффузии, а также распределение клеток по количеству рецепторов. Это является диагностически важным:

- для иммунологического анализа клеток;
- в исследовании внутриклеточных процессов;
- при разработке новых лекарственных препаратов.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Усовершенствованная методика исследования связывания растворенных лигандов с низкоаффинными поверхностными рецепторами клетки, учитывающая гетерогенность клеточной популяции по количеству рецепторов, позволяет оценивать значения констант скорости прямой и обратной реакций лиганд-рецепторного взаимодействия, а также определять абсолютное распределение рецепторов в клеточной популяции.
2. Значения констант скорости ассоциации и диссоциации одиночной лиганд-рецепторной пары «1D3 IgM – FcγRIIIb» равны $k_+ = (7.5 \pm 1.0) \times 10^{-16}$ см³/с и $k_- = (2.1 \pm 0.8) \times 10^{-3}$ 1/с, соответственно. Среднее количество поверхностных рецепторов FcγRIIIb на нейтрофилах человека варьируется от пациента к пациенту от 0.5×10^5 до 3×10^5 .
3. Константа эффективной диффузии молекул лигандов в среде с неоднородным распределением сайтов связывания (рецепторов) может быть определена без нахождения полного решения исходной системы дифференциальных реакционно-диффузионных уравнений.
4. Средние значения констант эффективной диффузии белка HP1α в ядрах фибробластов мышинных эмбрионов Suv39h1/2+/+ и Suv39h1/2-/- равны $(5.7 \pm 0.8) \times 10^{-8}$ см²/с и $(4.9 \pm 0.4) \times 10^{-8}$ см²/с, соответственно. После обработки клеток трихостатином А, вызывающим ацетилирование гистонов на всем протяжении геномной ДНК, среднее значение константы эффективной диффузии белка HP1α в ядрах фибробластов мышинных эмбрионов Suv39h1/2+/+ и Suv39h1/2-/- равно $(3.9 \pm 0.6) \cdot 10^{-8}$ см²/с и $(3.4 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$ см²/с, соответственно.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены в 5 публикациях реферируемых журналов, включенных в прилагаемый перечень. Содержание диссертации докладывалось на международных конференциях: по биологическим и экологическим наукам (Египет, Хургада, 13 – 16 марта 2008 г.), “Использование ГМО в научных исследованиях” (Чехия, Брно, 8 – 9 апреля 2010 г.) на XXV конгрессе международного общества развития цитометрии, ISAC (США,

Сиятл, 8-12 мая 2010 г.), “Эпигенетика” (Чехия, Брно, 22 – 25 ноября 2010 г.), “Динамика систем внутриклеточной связи” (Швейцария, Энгельберг, 15 – 19 мая, 2011 г.), а также на научных семинарах в Институте химической кинетики и горения СО РАН, Институте биофизики Чешской академии наук и Институте клинической иммунологии СО РАМН.

Публикации. Основное содержание изложено в 5-и статьях в рецензируемых журналах, а также в тезисах международных конференций.

Личный вклад. Все приведённые в работе результаты получены либо самим автором, либо при его непосредственном участии.

Структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 201 наименование. Диссертация изложена на 114 страницах, включает 7 таблиц, 32 рисунка и одно приложение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель и задачи работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, и дано краткое описание диссертации по главам.

Первая глава является обзором научной литературы, посвященной исследованию кинетики поверхностных и внутриклеточных лиганд-рецепторных взаимодействий.

В разделе 1.1 кратко описаны типы клеточных рецепторов, которые можно разделить на два основных класса - мембранные (поверхностные) рецепторы и внутриклеточные рецепторы.

В разделе 1.2 представлено краткое описание морфологии нейтрофилов и их основных функций.

Раздел 1.3 посвящён использующимся в настоящее время экспериментальным методам исследования взаимодействия лиганд-рецептор на поверхности живых клеток с акцентом на методы, позволяющие проводить кинетические исследования.

Наиболее распространенными экспериментальными методиками являются радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ, иммунофлуоресцентный анализ, иммуноагглютинация, поверхностный плазмонный резонанс, техника полного внутреннего отражения, проточная цитометрия. Проточная цитометрия выгодно отличается от других методов, так как позволяет исследовать кинетику связывания лиганда с рецептором на поверхности одиночных клеток. С применением проточных цитометров возникает задача повышения информативности измерения одиночных клеток за короткое время ее нахождения в зоне регистрации. Кроме того, существует проблема интерпретации кинетических измерений, проводимых в реальном времени на проточном цитометре, так как при этом разные клетки популяции измеряются в разное время и только однократно. Для решения проблемы интерпретации данных кинетических измерений на проточном цитометре в 2000 году был разработан метод временной эволюции функций распределений для моделирования кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия, однако, не был доведён до практического применения в случае низкой и средней величины

аффинности лиганда к рецептору. В данной диссертации предложено развитие такого метода для случая обратимого лиганд – рецепторного взаимодействия.

В разделе 1.4 показано, что при моделировании процессов происходящих в ядре живой клетки необходимо учитывать неоднородность и мобильность структуры ядра. Такое понимание ядерной динамики возникло в результате развития новых *in vivo* микроскопических методов с использованием неинвазивного мечения белков флуоресцентными маркерами, такими как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Эти методы открыли совершенно новые способы исследования локализации белков в ядре. Кроме того, использование GFP позволило исследовать динамические процессы, включая лиганд-рецепторные взаимодействия внутри клеток. Наиболее широко используемым методом в настоящее время является FRAP (восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания).

В разделе 1.5 представлено краткое описание структуры хроматина - комплекса ДНК и связанных с ней белков. Хроматин находится внутри ядра клеток эукариот и входит в состав нуклеоида у прокариот. Именно в составе хроматина происходит начальный этап реализации генетической информации, а также репликация и репарация ДНК. Структура генома и экспрессия генов зависят от функциональной активности множества белков, ассоциированных с хроматином. Механизмы взаимодействия этих белков с хроматином в интактных клетках до сих пор остаются не раскрытыми. Подход, основанный на объединении конфокальной микроскопии, метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания и кинетического моделирования, позволяет количественно определять основные биофизические параметры (коэффициент диффузии, константу скорости) динамики хроматин-связанных белков в живых клетках. Это в свою очередь поможет проанализировать механизмы взаимодействия таких белков с хроматином в естественных условиях более детально.

Раздел 1.6 посвящён описанию структуры белка гетерохроматина HP1 и его функциональных особенностей. Heterochromatin protein 1 (HP1) является “держателем” гетерохроматина — транскрипционно молчащей, конденсированной ДНК, которая обычно ассоциирует с центромерными областями. Различают три изоформы HP1: α , β , γ . Члены семейства HP1 характеризуются наличием двух консервативных доменов: N-концевой хромодомен и C-концевой теневой хромодомен, разделенных линкером переменной длины. Классическая модель функциональной активности HP1 – связывание с модифицированными гистонами посредством хромодомена и взаимодействие с другими белками посредством теневого домена.

Долгое время гетерохроматин рассматривался как инертный, высоко конденсированный и недоступный для транскрипционных факторов домен, в котором белок HP1 играет роль "клея" и является иммобильным. Однако эксперименты, проведённые на живых клетках с помощью метода FRAP показали, что HP1 не стабильно привязан к периферическому гетерохроматину, является мобильным и формирует стабильный, активно обновляемый компартмент. Таким образом, динамические свойства HP1, возможно, имеют решающее значение в создании постоянно обновляемой, но в целом стабильной, архитектуры хроматина.

В разделе 1.7 представлены экспериментальные методы исследования взаимодействия лиганд-рецептор внутри живых клеток, а также охарактеризованы

различные математические модели, описывающие мобильность молекул внутри биологических клеток.

Можно выделить три группы современных подходов, которые используют для исследования динамики флуоресцентно меченых молекул внутри живых клеток. Первая группа основана на локальном фотообесцвечивании (фотоактивации) флуоресценции и дальнейшем наблюдении пространственного распределения сигнала во времени. Такой подход лежит в основе методов: FRAP (восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания), непрерывного фотообесцвечивания (CP - continuous photobleaching) или потери флуоресценции в процессе фотообесцвечивания (FLIP - Fluorescence Loss in Photobleaching) и фотоактивации (PA - Photoactivation). Эти методы позволяют интерпретировать динамические измерения макромолекул с точки зрения химической кинетики.

Вторая группа использует интенсивность флуктуации сигнала флуоресценции молекул, пребывающих и покидающих фокальный объём (для конфокального микроскопа). Во флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS - Fluorescence correlation spectroscopy) такие флуктуации оцениваются с помощью автокорреляционного анализа. Третья группа основана на измерении транслокации индивидуальных частиц со временем. Такие методы представляют собой прямой способ измерения диффузионного перемещения и взаимодействия с сайтами связывания интересующей молекулы. Однако, они зачастую ограничены относительно коротким периодом наблюдения (< 1 сек.), за который сигнал флуоресценции может быть зафиксирован и лишь небольшое количество траекторий записано для дальнейшего анализа.

В настоящее время метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP) является широко используемым подходом для исследования динамики макромолекул в живых клетках. Этот метод используется для изучения многих аспектов клеточной биологии, включая скорости молекулярной диффузии и движения молекул, структуру хроматина, транскрипцию, мобильность мРНК, передачу сигналов, динамику цитоскелета, пузырьковый транспорт, клеточную адгезию и митоз. Типичный FRAP эксперимент – это обесцвечивание флуоресцирующих молекул в небольшой области исследуемого образца при кратковременном облучении интенсивным лазерным излучением (т.е. необратимое фотообесцвечивание) и наблюдение процесса восстановления флуоресценции данной области за счёт диффузии необесцвеченных молекул.

Количественный анализ экспериментальных данных по FRAP, как правило, основан на аппроксимации экспериментальной кривой восстановления флуоресценции конкретной математической моделью. Такой подход требует знания математического решения исходных дифференциальных уравнений (с несколькими переменными, в частных производных) в каждом конкретном случае с учетом начальных и граничных условий FRAP. Однако, существует фундаментальная проблема применения такого подхода для неоднородных сред (например, ядер клеток), где получить соответствующее математическое решение практически невозможно в силу неизвестного неоднородного пространственного распределения сайтов связывания.

Альтернативный подход, развиваемый в данной работе, основан на новом методе обработки видео-FRAP измерений, разрешённых по пространственным

координатам и по времени (получаемых с конфокального лазерного сканирующего микроскопа). При этом метод не требует знания соответствующего математического решения исходных дифференциальных уравнений, не зависит от геометрии области выжигания, профиля выжигающего луча лазера и пространственного распределения сайтов связывания.

Во второй главе кратко описаны экспериментальные установки, которые были использованы в данной работе: сканирующий проточный цитометр (СПЦ), который позволяет измерять индикатрису - зависимость интенсивности рассеянного света от угла рассеяния; проточный цитометр FACS Calibur и конфокальный лазерно-сканирующий микроскоп Leica TCS SP5.

Технология сканирующей проточной цитометрии совместно с методами решения обратной задачи светорассеяния позволяет получать информацию о морфологии клетки из индикатрисы светорассеяния. Таким образом, измерение и обработка индикатрис светорассеяния от клеток позволяет не только дифференцировать клетки крови, но и характеризовать эти клетки, а именно определять их размер, форму и структуру. В качестве экспериментальной установки для определения дифференциального сечения рассеяния нейтрофила был использован СПЦ.

В качестве экспериментальной установки для исследования лиганд-рецепторного взаимодействия на поверхности биологических клеток был использован проточный цитометр стандартной конфигурации FACSCalibur, Becton Dickinson, USA.

В качестве экспериментальной установки для исследования лиганд-рецепторного взаимодействия внутри ядер живых клеток был использован конфокальный лазерно – сканирующий микроскоп Leica TCS SP5. Изменения, происходящие в клетках и их структурах во времени, можно исследовать и на обычных микроскопах, снабжённых видеосистемой. Но лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (ЛСКМ) позволяет получать серии изображений с высоким пространственным разрешением. Кроме того, благодаря наличию лазеров и системы сканирования можно осуществлять не только регистрацию временных изменений, но и осуществлять воздействие на клеточные структуры лазерным излучением. Вышеперечисленные особенности ЛСКМ позволяют с лёгкостью реализовывать FRAP измерения.

Также в данной главе представлены методики кинетических экспериментов по исследованию лиганд-рецепторных взаимодействий и методика по выделению нейтрофилов из периферической крови.

В третьей главе в разделе 3.1 представлена разработанная ранее модель связывания растворенных лигандов с клеткой, учитывающая гетерогенность клеточной популяции по количеству рецепторов и описывающая процесс через состояния клетки. Эта модель позволяет описать кинетику не только средних величин, но и самой функции распределения по количеству рецепторов, которая может быть измерена непосредственно в ходе эксперимента. В данной работе впервые была применена такая математическая модель для обработки кинетики лиганд – рецепторного связывания в случае низкоаффинных рецепторов, для которых наличие реакции диссоциации не может быть проигнорировано. Для математической обработки кинетики обратимого лиганд – рецепторного связывания

были использованы следующие уравнения:

$$\frac{d\bar{y}}{dt} = Lk_+R - k_-LR \quad (1)$$

$$\bar{y}(t) = \frac{L_0}{c} \frac{y'_1 y'_2 (e^{k_+ L_0 (y'_1 - y'_2) t} - 1)}{(y'_1 e^{k_+ L_0 (y'_1 - y'_2) t} - y'_2)}$$

$$y'_{1,2} = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{R_0}{L_0} + \frac{K}{L_0} \right) \pm \frac{1}{2} \sqrt{\left(1 + \frac{R_0}{L_0} + \frac{K}{L_0} \right)^2 - 4 \frac{R_0}{L_0}}$$

$$K = \frac{k_-}{k_+}$$

Где $\bar{y}(t)$ - среднее число занятых рецепторов на клетке; LR - объемная концентрация лиганд-рецепторных комплексов в среде; k_+ , k_- - кинетические константы взаимодействия лиганда с единичным рецептором; L_0 - концентрация антител; R_0 - полное число рецепторов в единице объёма (свободные и занятые); c - концентрация клеток; K - константа равновесия реакции.

В разделе “результаты” данной главы продемонстрировано применение математической модели в случае обратимого лиганд – рецепторного взаимодействия для описания экспериментальных данных, получаемых во время цитофлуориметрических измерений. Для наглядности результаты нелинейной регрессии приведены на примере одного из пациентов на Рис. 1. Из обработки данных по всем пациентам (одновременно для четырёх пациентов при трёх разных концентрациях антител) были определены константа скорости ассоциации и аффинность (обратная константа равновесия), среднее число рецепторов на нейтрофиле для каждого пациента (Таблица 1).

Как показано в Таблице 1 среднее количество поверхностных рецепторов на нейтрофилах варьируется от пациента к пациенту (от 0.5×10^5 до 3×10^5), также как и асимметрия распределений по числу рецепторов (от $0.5(\pm 0.2)$ до $0.3(\pm 0.1)$). В то время как коэффициент вариации (т.е. отношение стандартного отклонения к среднему значению) меняется в довольно узком диапазоне (от $0.20(\pm 0.1)$ до $0.27(\pm 0.1)$). Это приводит к мысли о том, что потенциально асимметрия распределения может быть более чувствительным диагностическим параметром, нежели коэффициент вариации. Возможно, что в скором будущем эти параметры будут добавлены в список стандартных диагностических параметров.

Хочется отметить, что в проточной цитометрии клетки разделяют по интенсивности прямого и бокового светорассеивания, а также по флуоресценции специфических маркёров на их поверхности. Для эффективного разделения клеток по светорассеянию необходимо использовать адекватную оптическую модель конкретной клетки, в частности для учёта её абсолютного сечения светорассеяния.

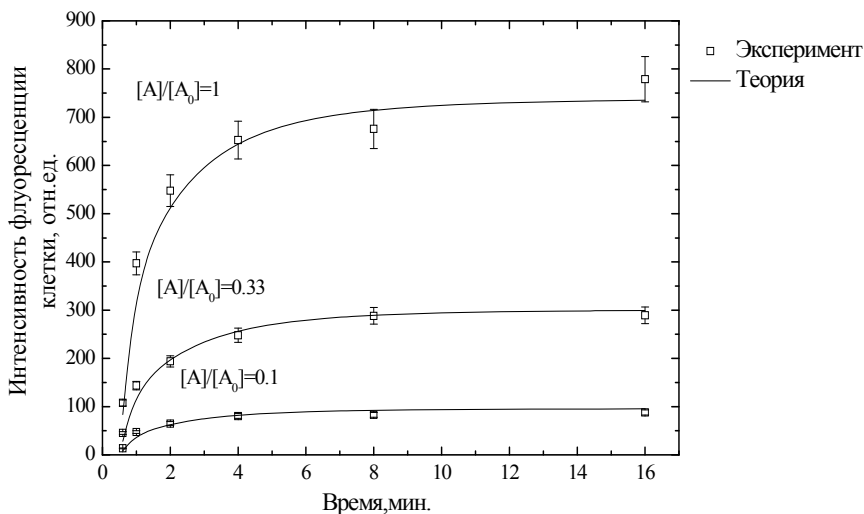


Рис. 1. Кинетика средней флуоресценции нейтрофилов одного из пациентов.

Таблица 1. Результаты теоретической обработки экспериментальных данных

Пациент №	Среднее число рецепторов на клетке $n, 10^5$	Отн. дисперсия	Кoeff. асимметрии	Константа скорости прямой реакции $k_+, 10^{-16}, \frac{см^3}{с}$	Константа скорости обратной реакции $k_-, 10^{-3}, \frac{1}{с}$
1	2.4 ± 0.3	0.20 ± 0.1	0.3 ± 0.1	7.5 ± 1.0	2.1 ± 0.8
2	0.53 ± 0.05	0.26 ± 0.1	-0.010 ± 0.003		
3	3.3 ± 0.6	0.29 ± 0.1	-0.5 ± 0.2		
4	2.5 ± 0.3	0.27 ± 0.1	0.020 ± 0.06		

Поэтому в рамках данной диссертационной работы было измерено сечение рассеяния нейтрофила, что позволило приступить к созданию оптической модели клетки. Предложена оптическая модель нейтрофила, использованная для расчёта абсолютного дифференциального сечения рассеяния методом дискретных диполей.

На Рис. 2 представлены абсолютные сечения рассеяния модели нейтрофила (слева) и экспериментально измеренных клеток (справа). Экспериментально и теоретически полученные абсолютные сечения нейтрофила демонстрируют хорошее согласие, что позволяет сделать вывод об адекватности, предложенной нами оптической модели нейтрофила.

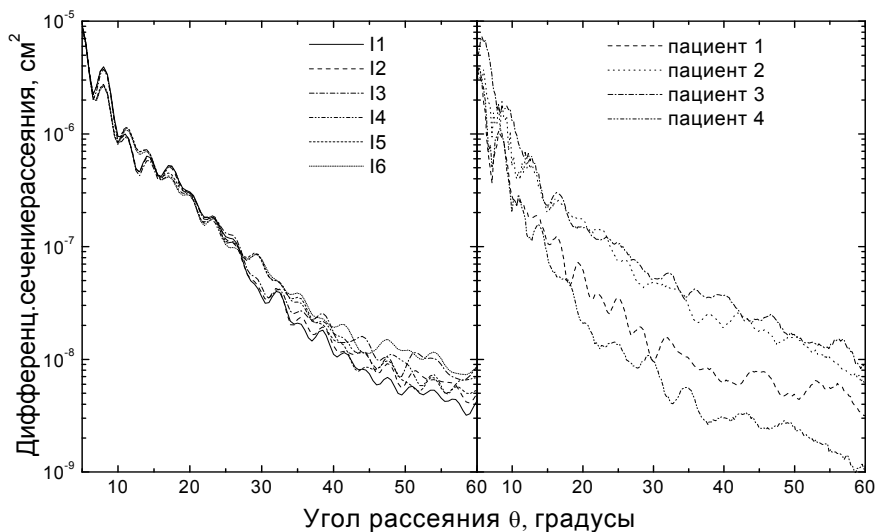


Рис. 2 Дифференциальное сечение рассеяния оптической модели нейтрофилов для различных наборов параметров (слева). Дифференциальное сечение рассеяния для характерных нейтрофилов четырёх различных пациентов (справа).

Таким образом, результаты, приведенные в настоящей главе, позволяют установить границы возможности в характеристике нейтрофилов с помощью проточной цитометрии. Следующие характеристики популяции нейтрофилов могут быть измерены: среднее значение размера нейтрофилов, степень вариации нейтрофилов по размеру, среднее количество рецепторов на мембране нейтрофилов, константы прямой и обратной реакций взаимодействия лиганд-рецептор для популяции нейтрофилов.

Четвёртая глава посвящена разработке метода лазерной сканирующей микроскопии для исследования кинетики обратимого лиганд-рецепторного взаимодействия в среде с неоднородным распределением сайтов связывания. А именно, был разработан FRAP метод для неоднородных сред. Для этого мы

использовали общепринятый вид дифференциальных уравнений двумерной диффузии для лиганд-рецепторного типа связывания:

$$\begin{cases} \frac{\partial F}{\partial t} = D \frac{\partial^2 F}{\partial x^2} + D \frac{\partial^2 F}{\partial y^2} - k_+ AF + k_- B \\ \frac{\partial A}{\partial t} = -k_+ AF + k_- B \\ \frac{\partial B}{\partial t} = k_+ AF - k_- B \end{cases} \quad (2)$$

где x и y пространственные переменные; t время, F концентрация свободного (несвязанного) белка; A концентрация свободных сайтов связывания (рецепторы); B концентрация связанного белка (комплексов лиганд - рецептор); k_+ константа скорости ассоциации, k_- константа скорости диссоциации.

Подчеркнем, что, в отличие от общепринятых моделей FRAP, пространственное распределение мест связывания в нашей модели считается неоднородным, то есть концентрация A является функцией пространственных переменных, как и все другие концентрации в уравнении (2).

В данной работе уравнение (3) было использовано для обработки экспериментальных видео-FRAP данных, измеренных с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Количество кадров, p , в обработке данных варьировалось для оценки погрешности D_{eff} (как стандартная ошибка среднего).

$$D_{eff} = \left[\int_0^p S(t) dt \right]^{-1} (G(p) - G(0)) \quad (3)$$

Экспериментальные функции $S(t)$ и $G(t)$ можно вычислить непосредственно из экспериментальных видео-FRAP данных, но невозможно получить эти функции теоретически, если пространственное распределение сайтов связывания неизвестно. Таким образом, стандартная схема обработки экспериментальных данных методом нелинейной регрессии с использование аналогичной теоретической зависимости с целью получения искомого коэффициента эффективной диффузии в данном случае неприменима. Однако, при произвольном пространственном распределении мест связывания, можно получить коэффициент эффективной диффузии D_{eff}

$$D_{eff} = \frac{D}{1 + K}, \text{ где} \quad (4)$$

$$K(x, y) = \frac{k_+ A(x, y)}{k_-}$$

путём сравнительного анализа экспериментальных функций $S(t)$ и $G(t)$ учитывая теоретическое соотношение между ними (уравнение (5)). Основная трудность состоит в наличии шума в экспериментальных данных, так как это снижает точность расчёта производной экспериментальной функции $G(t)$ по времени. Вместо того,

чтобы вычислять производную, мы предлагаем провести интегрирование (что является более стабильным по отношению к шуму) уравнения (5) по времени (с переменным верхним пределом, p), что привело к уравнению (3) для D_{eff} :

$$\frac{\partial}{\partial t} G(t) = \frac{D}{1 + \bar{K}} S(t). \quad (5)$$

Также в рамках данной главы приведена проверка разработанного метода на простых (без сайтов связывания) и сложных (неоднородных по распределению сайтов связывания) средах.

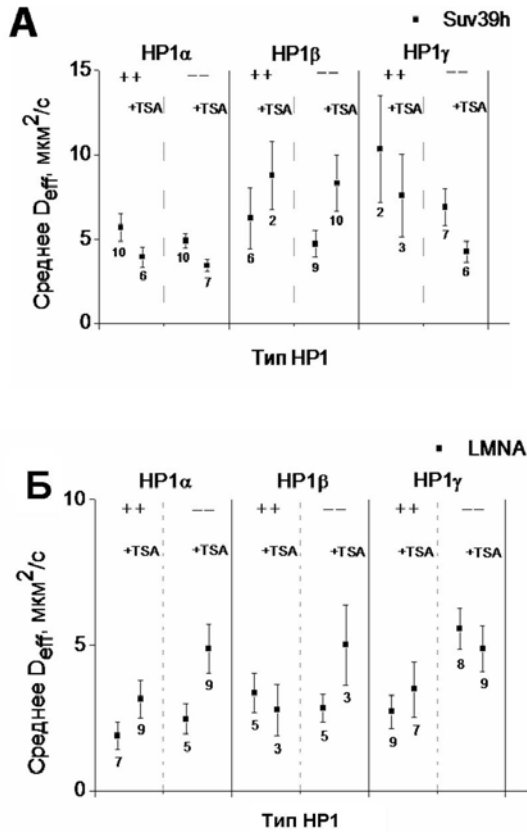


Рис. 3. Результаты применения FRAP метода для исследования динамики белков HP1 (α, β, γ) в ядрах живых клеток. Средние значения (точки) и стандартные ошибки среднего (“усы”) коэффициента эффективной диффузии, измеренного для различных изоформ белка HP1 в клетках типа Suv39h (A) и Lmna (B). Где ++ дикий тип клеток (эмбриональные мышинные фибробласты); – нокаутные клетки по Suv39h1/2 (A) или по Lmna (B). Числа под средними значениями означают количество обработанных клеток. +TSA – клетки, измеренные через 2 часа после добавления трихостатина А.

Для примера показаны результаты применения разработанного FRAP метода для исследования динамики белков HP1 (α, β, γ) в ядрах живых клеток (Рис. 3, А и Б). Была проведена трансфекция белками HP1-GFP (HP1 α , HP1 β , и HP1 γ) эмбриональных мышинных фибробластов (MEFs) от нокаутных мышей типа *Suv39h1/2^{-/-}* и *Lmna^{-/-}* и соответствующих мышей дикого типа (wt). Следует отметить, что в отличие от стандартных FRAP методов, была обесцвечена большая область (примерно половина) ядра клетки (Рис. 4), так как предложенный в данной работе метод FRAP применим в рамках диффузионно-доминирующей модели, когда

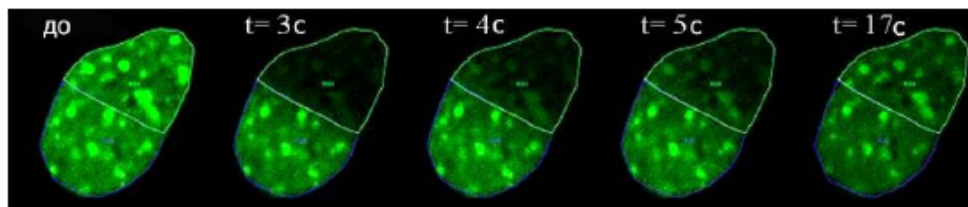


Рис. 4 FRAP анализ хроматин - связанных белков. Кадры распределения HP1 β - GFP белка в MEF клетках были получены до фотообесцвечивания и вовремя восстановления флуоресценции после выжигания примерно половины ядра клетки. Кадры сняты в указанное время (t) после окончания выжигания.

время ассоциации GFP-меченного белка гораздо меньше времени необходимого для диффузии белка в обесцвеченную область.

Основное преимущество предложенного FRAP метода заключается в том, что он позволяет количественно описывать одновременно и диффузию и лиганд - рецепторное взаимодействие молекул (определять коэффициент эффективной диффузии) в среде с неоднородным распределением сайтов связывания, не требуя при этом аналитического решения реакционно-диффузионных дифференциальных уравнений. Использование относительно большой области фотообесцвечивания позволяет расширить границы применения эффективно-диффузионного подхода на исследование медленных лиганд – рецепторных взаимодействий, которые не могут быть количественно описаны в диффузионном пределе с помощью обычных FRAP методов (фотообесцвечивание малой области исследуемого объекта). Такой метод является особенно полезным инструментом при исследовании высоко неоднородных сред, например, ядро живой клетки, для которых невозможно получить аналитическое решение реакционно-диффузионных дифференциальных уравнений в силу неизвестности математической функции пространственного распределения неоднородностей.

Метод, предложенный в данной работе, не зависит от геометрии области фотообесцвечивания, от профиля луча лазера, от пространственного распределения мест связывания, а также от положения объекта исследования в наблюдаемом фрейме. Поэтому, такой подход может быть легко адаптирован для исследования, например, около сотни клеток за час при использовании FRAP метода в режиме одна клетка на фрейм. Это позволит набирать надёжную статистическую экспериментальную выборку за относительно небольшой промежуток времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. Исследована кинетика связывания растворенных лигандов с низкоаффинными поверхностными рецепторами нейтрофилов человека. С помощью усовершенствованной методики решения обратной задачи биокинетики оценены значения констант скоростей прямой и обратной реакций взаимодействия лиганда с рецептором Fc γ RIIIb, которые для одиночной лиганд-рецепторной пары «1D3 IgM – Fc γ RIIIb» равны $k_+ = (7.5 \pm 1.0) \times 10^{-16}$ см³/сек и $k_- = (2.1 \pm 0.8) \times 10^{-3}$ 1/сек, соответственно.
2. Определено абсолютное распределение рецепторов Fc γ RIIIb в клеточной популяции нейтрофилов человека. Показано, что их среднее количество варьируется у пациентов от 0.5×10^5 до 3×10^5 на клетку.
3. Впервые измерена зависимость дифференциального сечения рассеяния от угла рассеяния для нейтрофилов человека. Для объяснения данных экспериментов предложена сферическая оптическая модель нейтрофила, учитывающая влияние на процесс светорассеяния сегментированности ядра и зернистости цитоплазмы.
4. Константа эффективной диффузии молекул лигандов в среде с неоднородным распределением сайтов связывания (рецепторов) может быть определена без нахождения полного решения исходной системы дифференциальных реакционно-диффузионных уравнений.
5. Среднее значение константы эффективной диффузии белка HP1 α в ядрах фибробластов мышинных эмбрионов Suv39h1/2+/+ и Suv39h1/2-/- равно $(5.7 \pm 0.8) \times 10^{-8}$ см²/с и $(4.9 \pm 0.4) \times 10^{-8}$ см²/с, соответственно. После обработки клеток трихостатином А, вызывающим ацетилирование гистонов на всем протяжении геномной ДНК, среднее значение константы эффективной диффузии белка HP1 α в ядрах фибробластов мышинных эмбрионов Suv39h1/2+/+ и Suv39h1/2-/- равно $(3.9 \pm 0.6) \cdot 10^{-8}$ см²/с и $(3.4 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$ см²/с, соответственно.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Д.Ю. Орлова, М.А. Юркин, К.А.Семьянов, В.П.Мальцев, Оптические свойства гранулярных клеток крови: нейтрофилы. Вестник НГУ, Серия: Физика. Том 2 (4), с. 83-87, 2007.
2. D.Yu. Orlova, M.A. Yurkin, A.G. Hoekstra, and V.P. Maltsev. Light scattering by neutrophils: model, simulation and experiment. Journal of Biomedical Optics. Vol. 13(5), 054057, pp.1-7, 2008.
3. E. Bártová, A. Harničarová Horáková, R. Uhlřřová, I. Raška, G. Galiová, D. Orlova, S. Kozubek. Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. Vol. 58(5), pp. 391 – 403, 2010.
4. D. Yu. Orlova, E. Bártová, V. P. Maltsev, S. Kozubek, and A. V. Chernyshev. A nonfitting method using a spatial sine window transform for inhomogeneous effective-diffusion measurements by FRAP. Biophysical Journal. Vol. 100(2), pp. 507 – 516, 2011.
5. D. Yu. Orlova, V. I. Borisov, V. S. Kozhevnikov, V. P. Maltsev and A. V. Chernyshev, Distribution function approach to study the kinetics of IgM antibodies binding to Fc γ RIIIb (CD16b) receptors on neutrophils by Flow Cytometry. Journal of Theoretical Biology. Vol. 290, pp. 1-6, 2011.

Орлова Дарья Юрьевна

КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ И
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ
МИКРОСКОПИИ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Подписано в печать 28.09.2011

Формат 60x84/16

Усл. печ. л. 1

Заказ № 87

Тираж 100 экз.

Отпечатано на полиграфическом участке Института катализа СО РАН
630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 5