

ПАРАМЕТРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОЦЕНКУ ПОДВИЖНОСТИ БЕЛКОВ ЯДРЫШКА В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ МЕТОДОМ FRAP НА ПРИМЕРЕ БЕЛКА ФИБРИЛЛАРИНА

© В. В. Барыгина,^{1,2} А. А. Миронова,^{1,3} О. В. Зацепина¹

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шенякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва,

² Биологический факультет и ³ Факультет биоинформатики и биоинженерии

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

электронный адрес: zatsepina_olga@mail.ru, v.barygina@mail.ru

Метод FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) в сочетании с конфокальной лазерной сканирующей микроскопией является одним из основных подходов к изучению свойств белков в живых клетках млекопитающих. Однако данные разных авторов о динамическом состоянии одного и того же белка даже в клетках одного типа могут сильно различаться. Причины таких расхождений до сих пор специально не анализировались. В настоящей работе на примере белка ядрышка фибрилларина, слитого с EGFP, изучено влияние площади облучаемой области (region of interest, ROI) и температурных условий проведения эксперимента на основные динамические характеристики белка — долю мобильной фракции и время полувосстановления флуоресценции ($t_{1/2}$) после фотообесцвечивания. Полученные результаты показали, что оба параметра заметно влияют на оценку подвижности фибрилларина-EGFP в клетках HeLa. Сделано заключение о том, что при постановке экспериментов методом FRAP площадь ROI должна быть стандартизирована и по возможности минимизирована. Кроме того, при анализе динамических характеристик белков ядрышка, участвующих в температурозависимых энзиматических реакциях, необходимо придерживаться стандартных температурных условий.

Ключевые слова: FRAP, фибрилларин, мобильная фракция белка, время полувосстановления флуоресценции ($t_{1/2}$), площадь фотообесцвечивания ROI, температурные условия.

Метод FRAP (fluorescence recovery of photobleaching, восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания) впервые предложен в 1970 г. для изучения подвижности мембранных белков в живых клетках. Белки предлагалось метить синтетическими флуорофорами, такими как флуоресцеин, родамин, цианин и др. и вводить в клетку с помощью микроинъекций (Axelrod et al., 1976). Однако, несмотря на перспективность использования этого подхода для изучения свойств не только мембранных, но и других белков, метод обладал двумя существенными недостатками — побочным цитотоксичным действием химических красителей, используемых для мечения биомолекул, а также трудоемкостью и недостаточной воспроизводимостью результатов (Dobrucki et al., 2007). Эти недостатки были преодолены после введения в практику микроскопических исследований флуоресцентных белков, кодируемых генетическими конструкциями, которые можно вводить в клетки путем трансфекций.

Клонирование гена зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP или avGFP) из медузы *Aequorea victoria* в 1992 г. (Prasher et al., 1992) и его демонстрация как возможного флуоресцентного маркера (Chalfie et al., 1994) предоставили новые подходы к изучению локализации и подвижности белков в живых клетках (Chudakov et al., 2010). В связи с тем что сворачивание GFP с образованием флуорофора может происходить без участия специфических факторов, присутствующих только в *A. victoria* (Tsien, 1998), экспрессия этого белка

оказалась возможной во всех типах клеток млекопитающих. Флуорофор GFP находится внутри «цилиндра» белковой оболочки молекулы, поэтому флуоресценция белка практически не зависит от температурных условий и pH внутриклеточной среды (Зубова и др., 2003).

В наше время широкое применение получил улучшенный вариант GFP — белок EGFP (Enhanced GFP), обладающий способностью к быстрой экспрессии и более яркой флуоресценцией (Yang et al., 1996). Относительно малый размер (27 кДа) и функциональная инертность EGFP в клетках млекопитающих позволяют использовать его для маркирования практически любого белка без нарушения функциональной активности (Tsien, 1998). Достоинством EGFP являются также спектры возбуждения (максимум при 434 нм) и эмиссии (максимум при 477 нм), близкие к аналогичным параметрам флуоресцеина, что облегчает его использование во флуоресцентной микроскопии. При облучении лазером высокой мощности флуорофор EGFP подвергается практически моментальному фотохимическому разложению, а образующиеся при этом свободные радикалы не попадают в клетку из-за наличия окружающей флуорофор белковой оболочки и, таким образом, не проявляют цитотоксических эффектов (White, Stelzer, 1999; Зубова и др., 2003; Tsien et al., 2006; Stasevich et al., 2010). Открытие EGFP, а позднее и других флуоресцентных белков (Chudakov et al., 2010) существенно расширило возможности применения метода FRAP в млеко-биологических исследованиях. К сегодняшнему

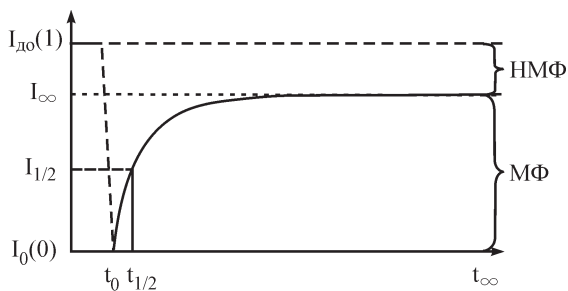


Рис. 1. Кривая восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания, иллюстрирующая принцип расчета мобильной (МФ) и немобильной (НМФ) фракций белка и времени полувосстановления флуоресценции ($t_{1/2}$), определяемых методом FRAP.

За единицу принимается уровень флуоресценции в ROI до фотообесцвечивания ($I_{до}$). Сразу после фотообесцвечивания (t_0) интенсивность флуоресценции в ROI принимается за ноль (I_0). I_∞ — значение флуоресценции в ROI после фотообесцвечивания, соответствующее выходу кривой на плато, $t_{1/2}$ соответствует значению флуоресценции $I_{1/2}$.

дню маркирование белков с помощью EGFP было использовано для изучения большинства цитоплазматических органелл (лизосом, митохондрий, аппарата Гольджи и др.), а также многих ядерных структурных доменов, включая ядрышки (Olson et al., 2000; Gerbi et al., 2003; Leung et al., 2003; Lam et al., 2005). Метод FRAP применяется не только для анализа свойств белков в живых клетках, но и для выяснения их функций (Rizzuto et al., 1995; Phair, Misteli, 2000; Snaar et al., 2000; Hoogstraten et al., 2002).

Теория метода FRAP подробно описана во многих исчерпывающих обзорах (Lippincott-Schwartz et al., 2003; Houtsmuller, 2005; van Royen et al., 2008, 2009), поэтому в данной работе мы ограничимся лишь кратким изложением его основных принципов. Метод FRAP основан на кратковременном (150—250 мс) облучении области интереса (region of interest, ROI) лазером с длиной волны, соответствующей длине волны возбуждения флуоресценции маркерного белка (например, EGFP), слитого с белком интереса, и на мощности, вызывающей практически мгновенное и полное гашение флуоресценции маркерного белка (White, Stelzer, 1999; Зубова и др., 2003; Stasevich et al., 2010). Затем с выбранным интервалом производят серию сканирований клетки (или только ROI) лазером низкой мощности для мониторинга восстановления флуоресценции. Такое сканирование мы будем называть мониторинговым сканированием. В случае если в ROI и вокруг него присутствуют подвижные (т. е. не иммобилизованные белок-белковыми или иными взаимодействиями) молекулы, в области фотообесцвечивания произойдет восстановление флуоресценции за счет диффузии «обесцвеченных» белковых молекул из зоны облучения, а «интактных» (флуоресцирующих) молекул — в зону облучения из соседних областей. Восстановление флуоресценции будет наблюдаться до тех пор, пока перераспределение «обесцвеченных» и «интактных» молекул не завершится. Характер восстановления флуоресценции в ROI зависит от прочности взаимодействия изучаемого белка с другими макромолекулами, присутствующими как в ROI, так и в окружающих районах (Verkman, 2002; Sprague et al., 2004; Sprague, McNally, 2005). Подвижные молекулы флуоресцентно меченного белка составляют подвижную, или мобильную, фракцию (МФ) белка, тогда как неподвижные (т. е. незамещаемые после фотообесцвечивания) — неподвижную, или немобильную, фракцию

(НМФ) белка. МФ и НМФ являются параметрами, легко определяемыми по кривой восстановления флуоресценции, а их содержание выражают в процентных долях от общего пула белка, принимаемого за 100 % (рис. 1). Согласно существующим представлениям, МФ и НМФ одного и того же белка могут выполнять в клетке разные функции. Например, МФ может быть представлена молекулами, выполняющими энзиматическую функцию, а НМФ — молекулами, играющими структурную роль (Snaar et al., 2000; Reits, Neeffjes, 2001). Однако справедливость этих представлений применительно к ядрышковым белкам нуждается в дополнительном изучении.

Скорость обмена «обесцвеченных» молекул с «интактными» молекулами характеризует также такой параметр, как время полувосстановления флуоресценции ($t_{1/2}$) в ROI (Lippincott-Schwartz et al., 2001). Параметр $t_{1/2}$ рассчитывается по кривой восстановления флуоресценции (рис. 1) и входит в состав формул для расчета коэффициента диффузии (D) белка. При изучении подвижности белков в живых клетках обычно рассчитывают коэффициент «эффективной» диффузии ($D_{эф}$), который учитывает замедление диффузии белка, возникающее в результате макромолекулярных взаимодействий (Sprague, McNally, 2005). Классической формулой для расчета $D_{эф}$ является формула Аксельрода, которая применяется в случае двухмерной диффузии белков в мембранах и представляет собой отношение квадрата радиуса облучаемой области (w^2) к значению $t_{1/2}$: $D_{эф} = \gamma(w^2/4t_{1/2})$, где γ — константа, равная 0.88 для случая круговой области фотообесцвечивания (Axelrod et al., 1976). В остальных структурах клетки, в том числе в ядрышке, диффузия белков является трехмерной, поэтому для расчета $D_{эф}$ предложено учитывать большее количество параметров (Braga et al., 2004), однако стандартная формула для расчета $D_{эф}$ ядрышковых белков в настоящее время отсутствует.

Активное ядрышко — это наиболее крупный структурный домен клеточного ядра, до 60 % сухой массы которого составляют белки (Lam et al., 2005). Методом FRAP показано, что большинство ядрышковых белков являются высокоподвижными и характеризуются высокой скоростью обмена между ядрышком и нуклеоплазмой. Сравнительно высокой подвижностью обладают белки, вовлеченные в транскрипцию рДНК (например, специфический кофактор РНК-полимеразы I — UBF), а также практически все белки, которые участвуют в процессинге рРНК, включая нуклеолин, фибрилларин и нуклеофозмин (Phair, Misteli, 2000; Chen, Huang, 2001; Барыгина и др., 2010). Напротив, подвижность рибосомных белков в ядрышке (например, S5 и L9) оказывается более низкой. На основании этих наблюдений был сделан вывод о том, что синтез и созревание рРНК происходят интенсивнее, чем процесс сборки рибосом (Phair, Misteli, 2000; Chen, Huang, 2001).

Фибрилларин — один из наиболее эволюционно-консервативных клеточных белков, гомологи которого присутствуют в клетках разных биологических видов от археобактерий до человека. У эукариот фибрилларин входит в состав малых ядрышковых РНК (мякРНК) и является основной ядрышковой метилтрансферазой, принимающей участие в метилировании и процессинге пре-рРНК (Lischwe et al., 1985; Tollervy, 1993; Wang et al., 2000). Помимо энзиматической функции фибрилларин может играть также структурную роль, поскольку сохраняется в неактивных остаточных ядрышках (Hernandez-Verdun, 2006). Фибрилларин относится к белкам ядрышка, динамические характеристики которого описаны в нескольких

работам (Phair, Misteli, 2000; Snaar et al., 2000; Chen, Huang, 2001; Gurskaya et al., 2006; Tripathi, Parnaik, 2008; Барыгина и др., 2010). Однако по данным разных авторов, его подвижность варьирует в значительных пределах даже в клетках одного типа. Так, доля МФ фибрилларина-EGFP в ядрышках клеток HeLa колеблется от 53 (Snaar et al., 2000) до ~70 % (Tripathi, Parnaik, 2008), а время полу-восстановления флуоресценции химерного белка после фотообесцвечивания — от 3 (Phair, Misteli, 2000) до 17.5 с (Tripathi, Parnaik, 2008). Более чем на порядок различаются также коэффициенты $D_{\text{эф}}$ фибрилларина — от 0.02 (Snaar et al., 2000) до 0.53 $\mu\text{м}^2/\text{с}$ (Phair, Misteli, 2000). Заметные противоречия можно отметить также при характеристике динамических свойств других белков ядрышка. Например, время полувосстановления флуоресценции нуклеофозмина/B23 колеблется от 5 (Louvet et al., 2005) до ~20 с (Chen, Huang, 2001; Negi, Olson, 2006), а для UBF1 — от 4 (Gorski et al., 2009) до 9 с (Chen, Huang, 2001), доля МФ нуклеолина — от 25 (Gaume et al., 2011) до ~90 % (Chen, Huang, 2001).

Причины таких разногласий остаются неизвестными. Анализ работ, посвященных подвижности фибрилларина, проведенный нами, выявил большой разброс в условиях постановки FRAP, используемых разными авторами. Например, значительно варьировала площадь облучаемой области (от небольшого ROI, размером 1 $\mu\text{м}^2$ до целого ядрышка с размером площади не менее 3 $\mu\text{м}^2$). В большинстве случаев измерения производили при физиологической температуре (37 °C), однако в некоторых работах указания на температурный режим отсутствуют (Tripathi, Parnaik, 2008).

Основная цель настоящей работы заключается в анализе влияния двух параметров — площади ROI и температурных условий — на динамические свойства белка ядрышка фибрилларина-EGFP в трансформированных клетках HeLa человека, определяемые с помощью FRAP и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Полученные результаты могут способствовать стандартизации метода FRAP и получению воспроизводимых результатов при анализе подвижности белков ядрышка в различных биологических системах.

Материал и методика

Клетки HeLa выращивали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, глутамин, стрептомицин и пенициллин в стандартных концентрациях, при 37 °C и 5 % CO_2 . Трансфекцию производили через 24 ч после пересева, когда клетки находились в экспоненциальной фазе роста и достигали 80 % конfluence. Для трансфекции использовали реагент Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Великобритания), следуя рекомендациям производителя. Через 36 ч после трансфекции экспрессию фибрилларина-EGFP наблюдали в 80 % клеток.

Антитела. В работе использовали кроличьи поликлональные антитела к фибрилларину (Abcam, США) и афинноочищенные антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с Техасским красным. Все антитела использовали в оптимальных концентрациях. Для иммуноцитохимического окрашивания антитела разводили в стандартном фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.2—7.4 (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 и 1.5 mM KH_2PO_4).

Непрямая иммуноцитохимия. Клетки выращивали на покровных стеклах и использовали в экспоненциальной фазе роста. Клетки фиксировали 3%-ным параформальдегидом, приготовленным на PBS, в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего обрабатывали 0.5%-ным Тритоном X-100 на льду в течение 10 мин, промывали в PBS и инкубировали с первичными антителами во влажной камере 1 ч при комнатной температуре. После промывки в PBS клетки инкубировали со вторичными антителами в течение 45 мин при комнатной температуре, окрашивали 0.1 $\mu\text{г}/\text{мл}$ DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо; Sigma, США) и заключали в Мовиол, содержащий DABCO (1,4-дiazобисцикло[2,2,2]октан; Sigma, США). Препараты изучали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа DuoScanMETA LSM510 (Carl Zeiss, Германия), используя объектив 63 \times /ЧА 1.25 PlanNeofluar. Изображения обрабатывали с помощью программы Adobe Photoshop CS (версия 10.0).

Условия прижизненных наблюдений и применения метода FRAP. Микроскоп DuoScanMETA LSM510 оснащен инкубатором для прижизненных наблюдений (IncubatorXL LSM S, Carl Zeiss), нагревательным элементом и термоконтроллером, что позволяло поддерживать в инкубаторе нужную температуру. Клетки HeLa высевали в чашки для прижизненных наблюдений и трансфицировали плазмидами, кодирующими нативный фибрилларин (фибрилларин-EGFP) или EGFP. Среда для культивирования клеток содержала 25 mM буфера HEPES для поддержания стабильного значения pH.

Температурные условия в камере для прижизненных наблюдений создавали путем ее нагревания с помощью термоконтроллера в течение 1.5 ч. В случае проведения измерений при 37 °C чашку с клетками помещали в камеру и сразу приступали к эксперименту FRAP. При проведении экспериментов при 27 °C чашку с клетками предварительно помещали в камеру на 30 мин при 27 °C, затем приступали к измерениям.

В начале каждого эксперимента FRAP сначала производили 2—3 сканирования всего ядра с помощью аргонного лазера (длина волны 488 нм, максимальная мощность 200 мВт), используя низкую мощность лазера, составляющую 0.5 % от максимальной. Фотообесцвечивание выбранного участка производили 5 импульсами при высокой мощности лазера, составлявшей 50 % от максимальной. Длительность фотообесцвечивания и эффективность гашения флуоресценции в разных экспериментах составляли соответственно 200—250 мс и 86 ± 2 %.

Для облучения выбирали ROI с размером площади 0.9 $\mu\text{м}^2$, что соответствовало среднему размеру фибрилларин-позитивных фокусов в ядрышке, или 3.2 $\mu\text{м}^2$, что в большинстве случаев соответствовало площади маленького ядрышка. Восстановление флуоресценции регистрировали при 0.5%-ной мощности лазера в течение 2.5—5 мин; интервал мониторингового сканирования составлял 2 с для фибрилларина-EGFP и 100 мс для GFP.

Для расчета доли МФ и времени полувосстановления флуоресценции после фотообесцвечивания ($t_{1/2}$) данные сначала нормализовали по общепринятой формуле $I_{\text{норм},t} = (I_t - I_0)/(I_{\text{до}} - I_0)$, где I_t — значение флуоресценции в каждый момент времени; I_0 — значение флуоресценции сразу после фотообесцвечивания; $I_{\text{до}}$ — значение флуоресценции перед фотообесцвечиванием (рис. 1) (Houtsmuller, 2005). Долю МФ рассчитывали по формуле

Динамические параметры фибрилларина в клетках HeLa, регистрируемые при разных условиях постановки экспериментов FRAP

Номер эксперимента	T, °C	Площадь ROI, мкм ²	МФ, %	t _{1/2} , с	n
1	37	0.9	60.30 ± 6.58 ^{a, б}	16 ^{a, б}	20
2	37	3.2	37.96 ± 5.25 ^a	22 ^б	20
3	27	0.9	50.26 ± 6.42 ^б	21 ^a	40

Примечание. ROI — район интереса (область фотообесцвечивания), МФ — доля мобильной фракции, t_{1/2} — время полувосстановления флуоресценции, n — количество измерений. Пары значений, имеющих одинаковый индекс (^a, ^б), различаются с достоверностью P < 0.001.

(1 - I_∞) · 100 %, где I_∞ — уровень флуоресценции при выходе кривой на плато. Доля НМФ составляла разницу: 100 % — МФ (%). Время полувосстановления флуоресценции после фотообесцвечивания t_{1/2} соответствовало значению флуоресценции I_∞/2. Для каждой экспериментальной точки сделали 20—40 измерений (см. таблицу). Различия между значениями оценивали по критерию Стьюдента. В расчеты подвижности фибрилларина вводили поправки на гашение флуоресценции в ходе мониторингового сканирования, составлявшее 8 ± 2 % от начального (I_{до}) уровня флуоресценции, оцененные с использованием стандартного подхода (Houtsmuller, 2005). Длительность мониторингового сканирования составляла не менее 3 мин.

Плазмидные конструкции. В работе использовали плазмиды, кодирующие зеленый флуоресцирующий белок EGFP и нативный фибрилларин человека, слитый с EGFP с С-конца (фибрилларин-EGFP; Dundr et al., 2000). Обе плазмиды предоставлены Dr. M. O. Olson (Университет г. Джексон, Миссисипи, США).

Результаты

Иммуноцитохимическая локализация фибрилларина в клетках HeLa. Методом конфокальной микроскопии в ядрышках клеток фибрилларин

отчетливо выявлялся в дискретных розеткоподобных фокусах площадью около 0.9 мкм² (рис. 2, а). Ранее показано, что такие фокусы колокализуются с местами синтеза пре-рРНК, выявляемыми с помощью бромированного уридинфосфата и, скорее всего, соответствуют плотному фибриллярному компоненту (ПФК) ядрышка, окружающему фибриллярные центры (Мухарьямова, Зацепина, 2001). Помимо ядрышка фибрилларин отчетливо выявлялся также в одиночных гранулах в нуклеоплазме — тельцах Кахала (Aris, Blobel, 1991), число которых составляло от 3 до 5 на ядро (рис. 2, а).

Колокализация эндогенного фибрилларина и фибрилларина-EGFP. Через 36 ч после трансфекции в подавляющем большинстве клеток фибрилларин-EGFP располагался в ядрышках и тельцах Кахала, где полностью колокализовался с эндогенным фибрилларин (рис. 2, б). В единичных клетках проявлялась также гомогенная флуоресценция фибрилларина-EGFP в нуклеоплазме (не иллюстрируется). Такие клетки относили к клеткам с повышенной экспрессией плазмиды и в экспериментах с FRAP не использовали.

Динамические свойства фибрилларина, изученные методом FRAP при малой площади облучения и температуре 37 °C. В качестве ROI для облучения выбирали один из ядрышковых фокусов, маркированных фибрилларин-EGFP. Так же как и при иммуноцитохимическом окрашивании, средний размер этих фокусов составлял 0.89 ± 0.05 мкм². Для определения начального уровня флуоресценции (I_{до}) выбранного фокуса проводили 2—3 контрольных сканирования клетки при мощности лазера 0.5 % от максимальной (рис. 3, а), после чего выбранный участок подвергали фотообесцвечиванию пятью лазерными импульсами мощностью 50 % от максимальной (рис. 3, б). Сразу после фотообесцвечивания производили мониторинговое сканирование клетки при мощности лазера 0.5 % до тех пор, пока кривая восстановления флуоресценции не выходила на плато, что в среднем занимало 120 с (рис. 3, в, г; 4, кривая 1). По кривой восстановления флуоресценции определяли эмпирические параметры подвижности фибрилларина. Доля МФ фибрилларина-EGFP составила 60.3 %, а время t_{1/2} — 17 с (см. таблицу).

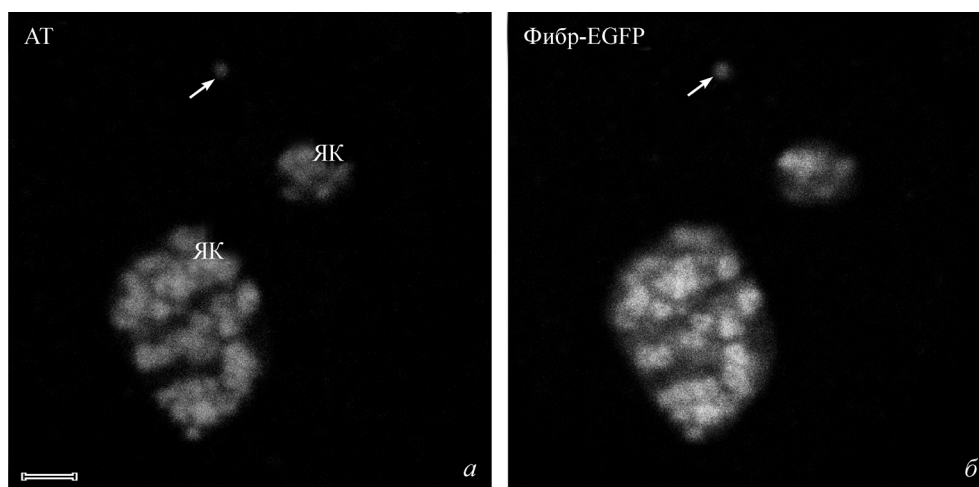


Рис. 2. Колокализация эндогенного фибрилларина (а) и фибрилларина-EGFP (б) в клетках HeLa.

Клетки, экспрессирующие фибрилларин-EGFP (б), фиксировали 3 %-ным параформальдегидом и иммуноцитохимически метили антителами (АТ) к фибрилларину (а). Изображенные на фотографии два ядрышка (ЯК) и тельце Кахала (стрелка) находятся в одном ядре. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Масштабный отрезок — 1 мкм.

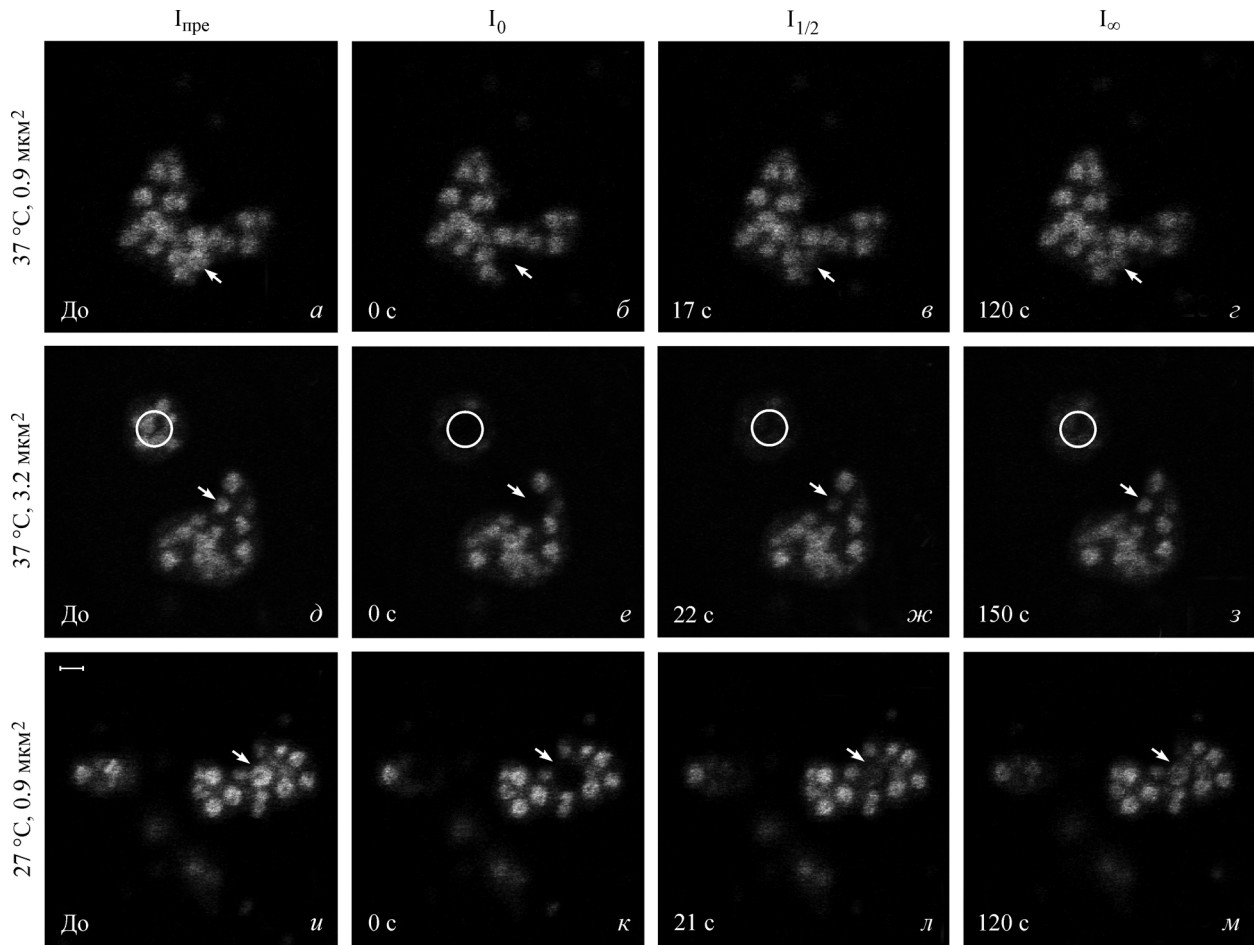


Рис. 3. Влияние температуры и площади фотообесцвечиваемой области на подвижность нативного фибрилларина-EGFP, выявляемую методом FRAP в клетках HeLa.

a–г: температура 37 °C, площадь фотообесцвечивания 0.9 мкм²; *д–з:* температура 37 °C, площадь фотообесцвечивания 3.2 мкм² (заклучена в белый кружок); *и–м:* температура 27 °C, площадь фотообесцвечивания 0.9 мкм²; *a, д, и* — изображения ядрышек до фотообесцвечивания (головки стрелок); *б, е, к* — изображения ядрышек сразу после фотообесцвечивания (I_0) (головки стрелок); *в, ж, л* — изображения ядрышек на промежуточных стадиях восстановления флуоресценции (значение $I_{1/2}$) (головки стрелок); *г, з, м* — изображения ядрышек в момент выхода кривой восстановления флуоресценции на плато (значение I_∞) (головки стрелок). В каждом случае показаны ядрышки, находящиеся в одном ядре. Масштабный отрезок — 1 мкм.

Влияние размера ROI на подвижность фибрилларина при 37 °C. Для анализа влияния площади ROI на долю мобильной фракции фибрилларина и значение $t_{1/2}$ фибрилларина-EGFP в некоторых клетках фотообесцвечиванию подвергали небольшие ядрышки площадью около 3.2 мкм² (рис. 3, *д–з*). Как показано на рис. 4 (кривая 2) и видно из данных таблицы, увеличение площади фотообесцвечивания приводило к заметному замедлению восстановления флуоресценции в ядрышках, так что кривая восстановления флуоресценции выходила на плато в среднем через 150 с после облучения. При этом $t_{1/2}$ увеличивалось с 17 до 22 с, а доля мобильной фракции фибрилларина-EGFP снижалась с 60.30 до 37.96 % по сравнению со значениями, полученными при облучении одиночных фокусов.

Для выяснения влияния температурных условий на динамические характеристики фибрилларина эксперименты с FRAP проводили при 27 °C. Все остальные параметры измерений, включая площадь области фотообесцвечивания (~0.9 мкм²), оставались неизменными. На рис. 3, *и* представлен типичный вариант локализации фибрилларина после инкубации клеток при 27 °C в течение 40 мин. Снижение температуры

практически не вызывало изменений в размерах и локализации фибрилларина в ядрышках. Однако динамические характеристики белка с понижением температуры изменялись: время полувосстановления флуоресценции увеличивалось с 17 до 21 с, а доля мобильной фракции снижалась с 60.30 до 50.26 % по сравнению с результатами экспериментов, проводимых при физиологической температуре (рис. 3, *и–м*; 4, кривая 3). Оценка параметров по критерию Стьюдента показала, что МФ фибрилларина-EGFP и время полувосстановления флуоресценции при 37 и 27 °C различаются статистически достоверно (см. таблицу).

Из закона Эйнштейна—Стокса известно, что диффузия белка в клетке подлжит общему закону диффузии частицы в свободном объеме и снижается при понижении температуры. Для изучения возможного влияния снижения температуры на свободную диффузию фибрилларина в условиях наших экспериментов мы сравнили подвижность EGFP — белка, который в клетках млекопитающих является маркером свободной диффузии (Mueller et al., 2010), при 37 и 27 °C. Облучаемые зоны располагались либо в ядре, либо в цитоплазме, но во всех случаях их площадь составляла ~0.9 мкм². Интервал мониторингового сканирования был снижен до 100 мс из-за высокой по-

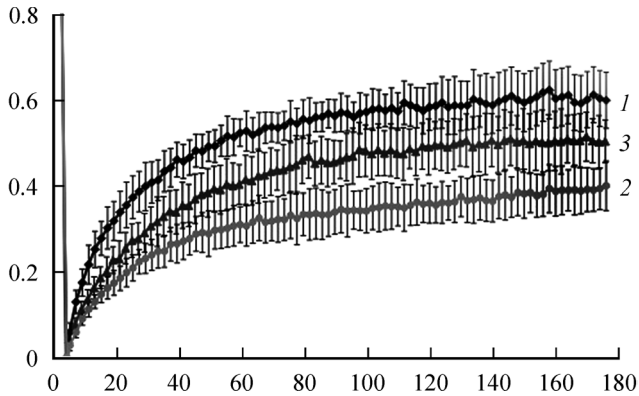


Рис. 4. Сравнение динамических характеристик фибрилларина-EGFP при разных условиях проведения экспериментов FRAP.

По горизонтали — время, с; по вертикали — интенсивность флуоресценции, исходный уровень которой принят за 1. Кривая 1 — температура 37 °С, площадь облучаемой области 0.9 мкм²; кривая 2 — температура 37 °С, площадь облучаемой области 3.2 мкм²; кривая 3 — температура 27 °С, площадь облучаемой области 0.9 мкм²; вертикальные отрезки — среднее квадратичное отклонение, интервал сканирования — 2 с. Число изменений для разных экспериментальных условий указано в таблице.

движности EGFP. Кроме того, для ускорения процесса сканирования мониторинговому сканированию подвергался только участок ROI.

В клетках HeLa EGFP располагался равномерно в цитоплазме и нуклеоплазме, но отсутствовал в ядрышках (рис 5, а). На рис. 5, б представлены типичные варианты кривых восстановления флуоресценции EGFP при 37 и 27 °С. В обоих случаях доля МФ белка EGFP составляла 100 %, а время полувосстановления — около 150 мс. Динамические параметры EGFP не зависели от места фотообесцвечивания (цитоплазма или нуклеоплазма). Таким образом, снижение температуры на 10 °С не оказывало заметного влияния на динамические характеристики EGFP в цитоплазме и нуклеоплазме клеток HeLa.

Обсуждение

В экспериментах FRAP восстановление флуоресценции маркированных белков часто описывается двумя параметрами: долей МФ белка (%) и коэффициентом эф-

фективной диффузии ($D_{эф}$, мкм²/с). Однако в настоящее время не существует единого расчета $D_{эф}$ белка, диффузия которого имеет место в трехмерных структурах клетки, включая ядрышко. Поэтому в представленной работе мы не рассчитывали $D_{эф}$ фибрилларина-EGFP и учитывали лишь время $t_{1/2}$ химерного белка после фотообесцвечивания. Этот параметр является однозначным, входит в расчет коэффициентов диффузии по разным формулам и, подобно $D_{эф}$, характеризует скорость обменных процессов, происходящих с участием исследуемого белка.

Результаты нашей работы показали, что при физиологической температуре (37 °С) увеличение площади обесцвечиваемой области приводит к статистически достоверному увеличению времени $t_{1/2}$ фибрилларина-EGFP. Доля его МФ при этом снижается более чем в 1.5 раза — с 60.30 ± 6.58 до 37.96 ± 5.25 % (см. таблицу).

Известно, что в гомогенных системах, в которых подвижность белка в каждой точке одинакова и неограниченна, увеличение площади облучаемой области приводит к пропорциональному возрастанию времени $t_{1/2}$ (Pucadyil, Chattopadhyay, 2007; Saxena, Chattopadhyay, 2011). Напротив, если облучаемая область неоднородна, увеличение ROI не приведет к пропорциональному увеличению $t_{1/2}$. Действительно, если сравнить $t_{1/2}$ фибрилларина-EGFP для ROI двух размеров (0.9 и 3.2 мкм²) при одной температуре (37 °С) (см. таблицу), то видно, что $t_{1/2}$ увеличивается непропорционально увеличению площади фотообесцвечивания ($16/0.9 \neq 22/3.2$). Наблюдаемое несоответствие можно объяснить несколькими причинами: неравномерным распределением фибрилларина-EGFP внутри облучаемой площади большего размера, различиями в динамических характеристиках белка в разных районах крупного ROI и обесцвечиванием большей доли молекул химерного белка, общий пул которых в короткий отрезок времени наблюдений остается практически неизменным. Вклад каждой из перечисленных выше причин требует дополнительного изучения. Однако в целом результаты, описанные в настоящей работе, указывают на целесообразность стандартизации и по возможности уменьшения площади фотообесцвечивания (ROI) при постановке экспериментов FRAP. При анализе белков, располагающихся в ядрышках неравномерно, необходимо, с нашей точки зрения, стремиться к обесцвечиванию одиночных «фокусов» концентрации белка, где его расположение, по оценке оператора, является однородным.

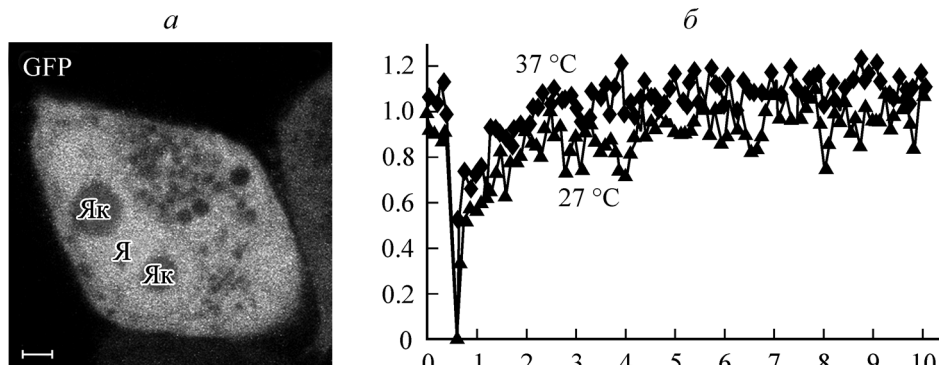


Рис. 5. Локализация (а) и подвижность белка EGFP (б) в клетках HeLa при 37 и 27 °С.

а — EGFP локализуется в цитоплазме и нуклеоплазме и практически отсутствует в ядрышках, Я — ядро, Як — ядрышко; подвижности EGFP в нуклеоплазме и в цитоплазме не различаются. б: по горизонтали — время, с; по вертикали — интенсивность флуоресценции, отн. ед.; показаны кривые восстановления флуоресценции EGFP при 37 °С (черная) и 27 °С (серая). Масштабный отрезок — 1 мкм.

Другим параметром, который может влиять на оценку динамических свойств белков ядрышка в живых клетках, являются температурные условия постановки эксперимента. Наши наблюдения показали, что снижение температуры на 10 °С относительно физиологической температуры (37 °С) приводит к снижению доли МФ фибрилларина-EGFP и увеличению времени $t_{1/2}$ (см. таблицу). Так, при понижении температуры до 27 °С доля МФ фибрилларина-EGFP снижалась с 60.30 до 50.26 %, а время $t_{1/2}$ увеличивалось с 16 до 21 с. Эти изменения свидетельствуют о том, что около 10 % МФ фибрилларина (60.30—50.26) представляют собой температурочувствительную фракцию белка. Возможно, что температурочувствительные молекулы фибрилларина участвуют в энзиматических процессах (например, процессинге пре-рРНК), скорость которых, подобно большинству энзиматических реакций, снижается при понижении температуры.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии нескольких основных фракций белка ядрышка фибрилларина в клетках HeLa. 1. Мобильная (свободно диффундирующая) фракция, которая не является температурочувствительной. Ее доля составляет около 50 % от общего пула белка. Можно предположить, что эта фракция временно не несет физиологической нагрузки и составляет запасной пул белка. 2. Мобильная, но температурочувствительная фракция фибрилларина. Ее доля составляет около 10 %. Эта фракция может быть вовлечена в энзиматические процессы, происходящие с участием фибрилларина. 3. Немобильная (иммобилизованная) фракция фибрилларина. Ее содержание составляет около 40 %. Высказано предположение о том, что немобильная фракция фибрилларина играет структурную роль (Snaar et al., 2000).

В заключение хотелось бы еще раз отметить, что метод FRAP в сочетании с EGFP-маркированием белков и конфокальной лазерной микроскопией — это широко используемый подход для изучения свойств белков в живых клетках. Однако для получения воспроизводимых и сопоставимых результатов необходима стандартизация условий его применения. Важность стандартизации условий проведения FRAP отмечалась также другими авторами при анализе динамических свойств различных внутриклеточных белков (Meuvis et al., 1999; Klonis et al., 2002; Cargero et al., 2003; Sprague et al., 2004; Stasevich et al., 2010). В настоящей работе на примере белка ядрышка фибрилларина продемонстрировано значимое влияние температурных условий и площади облучаемой области на долю МФ и время полувосстановления флуоресценции фибрилларина-EGFP в клетках HeLa.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК № 14.740.11.0121 и 14.740.11.0171.

Список литературы

Барыгина В. В., Вейко В. П., Зацепина О. В. 2010. Анализ подвижности и функционального состояния белка ядрышка фибрилларина в живых клетках HeLa. Биохимия. 75 (8): 1079—1090.

Зубова Н. Н., Булавина А. Ю., Савицкий А. П. 2003. Спектральные и физико-химические свойства зеленого (GFP) и красного (dRFP583) флуоресцирующих белков. Успехи биол. химии. 43 : 163—224.

Мухарьямова К. Ш., Зацепина О. В. 2001. Визуализация транскрипции рибосомных генов в клетках культуры ткани

СПЭВ с помощью бромированного уридинтрифосфата. Цитология. 43 (8) : 792—795.

Aris J. P., Blobel G. 1991. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. Cell Biol. 88 : 931—935.

Axelrod D., Koppel D. E., Schlessinger J., Elson E., Webb W. W. 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Biophys J. 16 : 1055—1069.

Braga J., Desterro J. M. P., Carmo-Fonseca M. 2004. Intracellular macromolecular mobility measured by fluorescence recovery after photobleaching with confocal laser scanning microscopes. Mol. Biol. Cell. 15 : 4749—4760.

Carrero G., McDonald D., Crawford E., de Vries G., Hendzel M. J. 2003. Using FRAP and mathematical modeling to determine the *in vivo* kinetics of nuclear proteins. Methods. 29 : 14—28.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 263 : 802—805.

Chen D., Huang S. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. J. Cell Biol. 153 : 169—176.

Chudakov D. M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K. A. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. Physiol Rev. 90 : 1103—1163.

Dobrucki J. W., Feret D., Noatynska A. 2007. Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies. Biophys J. 93 : 1778—1786.

Dundr M., Misteli T., Olson M. O. J. 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. J. Cell Biol. 150 : 433—446.

Gerbi S. A., Borovjagin A. V., Lange T. S. 2003. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. Curr. Opin. Cell Biol. 15 : 318—325.

Gurskaya N. G., Verkhusha V. V., Shcheglov A. S., Staroverov D. B., Chepurnykh T. V., Fradkov A. F., Lukyanov S., Lukyanov K. A. 2006. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. Nature Biotechnol. 24 : 461—465.

Hernandez-Verdun D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. Histochem. Cell Biol. 125 : 127—137.

Hoogstraaten D., Nigg A. L., Heath H., Mullenders L. H., van Driel R., Hoeijmakers J. H., Vermeulen W., Houtsmuller A. B. 2002. Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair *in vivo*. Mol. Cell. 10 : 1163—1174.

Houtsmuller A. B. 2005. Fluorescence recovery after photobleaching: application to nuclear proteins. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 95 : 177—199.

Klonis N., Rug M., Harper I., Wickham M., Cowman A., Tillery L. 2002. Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. Eur. Biophys J. 31 : 36—51.

Lam Y. W., Trinkle-Mulcahy L., Lamond A. I. 2005. The nucleolus. J. Cell Sci. 118 : 1335—1337.

Leung A. K. L., Andersen J. S., Mann M., Lamond A. I. 2003. Bioinformatic analysis of the nucleolus. Biochem. J. 376 : 553—569.

Lippincott-Schwartz J., Altan-Bonnet N., Patterson G. H. 2003. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. Nat. Cell Biol. Suppl. : S7—14.

Lippincott-Schwartz J., Snapp E., Kenworthy A. 2001. Studying protein dynamics in living cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2 : 444—456.

Lischwe M. A., Ochs R. L., Reddy R., Cook R. G., Yeoman L. C., Tan E. M., Reichlin M., Busch H. 1985. Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr = 34,000; pI, 8.5) rich in NG, NG-dimethylarginine. J. Biol. Chem. 260 : 14 304—14 310.

Louvet E., June'ra H. R., Le Panse S., Danie'le Hernandez-Verdun D. 2005. Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. Exp. Cell Res. 304 : 457—470.

- Meyvis T. K., De Smedt S. C., Van Oostveldt P., Demeester J. 1999. Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharm. Res.* 16 : 1153—1162.
- Mueller F., Mazza D., Stasevich T. J., McNally J. G. 2010. FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know? *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 : 403—411.
- Negi S. S., Olson M. O. 2006. Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J. Cell Sci.* 119 : 3676—3685.
- Olson M. O., Dundr M., Szeben A. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10 : 189—196.
- Phair R. D., Misteli T. 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature.* 404 : 604—609.
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111 : 229—233.
- Pucadyil T. J., Chattopadhyay A. 2007. Cholesterol depletion induces dynamic confinement of the G-protein coupled serotonin (1A) receptor in the plasma membrane of living cells. *Biochim. biophys. acta.* 1768 : 655—668.
- Reits E. A., Neeffes J. J. 2001. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* 3 : E145—E147.
- Rizzuto R., Brini M., Pizzo P., Murgia M., Pozzan T. 1995. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.* 5 : 635—642.
- Saxena R., Chattopadhyay A. 2011. Membrane organization and dynamics of the serotonin (1A) receptor in live cells. *J. Neurochem.* 116 : 726—733.
- Snaar S., Wiesmeijer K., Jochemsen A. G., Tanke H. J., Dirks R. W. 2000. Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells. *J. Cell Biol.* 151 : 653—662.
- Sprague B. L., McNally J. G. 2005. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol.* 15 : 84—91.
- Sprague B. L., Pego R. L., Stavreva D. A., McNally J. G. 2004. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* 86 : 3473—3495.
- Stasevich T. J., Mueller F., Michelman-Ribeiro A., Rosales T., Knutson J. R., McNally J. G. 2010. Cross-validating FRAP and FCS to quantify the impact of photobleaching on *in vivo* binding estimates. *Biophys. J.* 99 : 3093—3101.
- Tollervey D. 1993. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell.* 72 : 443—457.
- Tripathi K., Parnaik V. K. 2008. Differential dynamics of splicing factor SC35 during the cell cycle. *J. Biosci.* 33 : 345—354.
- Tsien R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67 : 509—544.
- Tsien R. Y., Ernst L., Waggoner A. 2006. Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry. *Handbook of biological confocal microscopy.* New York: Springer Science+Business Media. 955 p.
- Van Royen M. E., Dinant C., Farla P., Trapman J., Houtsmuller A. B. 2009. FRAP and FRET methods to study nuclear receptors in living cells. In: *Methods in molecular biology: the nuclear receptor superfamily.* New York: Humana Press. 69—96.
- Van Royen M. E., Farla P., Mattern K. A., Geverts B., Trapman J., Houtsmuller A. B. 2008. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to study nuclear protein dynamics in living cells. In: *The nucleus. Vol. 2. Chromatin, transcription, envelope, proteins, dynamics, and imaging.* New York: Humana Press. 363—385.
- Verkman A. S. 2002. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem. Sci.* 27 : 27—33.
- Wang H., Boisvert D., Kim K. K., Kim R., Kim S.-H. 2000. Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *EMBO J.* 19 : 317—323.
- White J., Stelzer E. 1999. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol.* 9 : 61—65.
- Yang T. T., Cheng L., Kain S. R. 1996. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucl. Acids Res.* 24 : 4592—4593.

Поступила 15 IX 2011

PARAMETERS WHICH AFFECT THE ESTIMATION OF PROTEIN MOBILITY
BY METHOD FRAP IN LIVING CELLS ON THE EXAMPLE OF PROTEIN FIBRILLARIN

V. V. Barygina,^{1, 2} A. A. Mironova,^{1, 3} O. V. Zatsepina¹

¹ M. M. Shemyakin—Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,

² Faculties of Biology and ³ Bioengineering and Bioinformatics of M. V. Lomonosov Moscow State University;
e-mails: zatsepina_olga@mail.ru, v.barygina@mail.ru

Method FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) in combination with confocal laser scanning microscopy represents one of the principal approaches in studying the properties of proteins in living mammal cells. However, the data of different authors on the dynamic properties of the same protein and even in cells of the same type can differ greatly. The reasons of such discrepancies were not specifically analyzed yet. In the present work, on the example of the nucleolar protein fibrillarin fused to EGFP, was studied the impact of area of the region of interest (ROI) and temperature conditions on the main dynamic characteristics of the protein, such as mobile fraction and time for half-time of fluorescence recovery after photobleaching ($t_{1/2}$). Obtained results suggest that both parameters have a great impact on the estimation of mobile properties of fibrillarin-EGFP in HeLa cells. Was concluded that during FRAP experiments the area of ROI has to be standardized and, as possible, minimized. Moreover, analyzing the dynamic properties of the nucleolar proteins, which take part in the temperature-sensitive reactions, the standard temperature conditions should also be standardized.

Key words: FRAP, fibrillarin, mobile fraction, half-time of recovery ($t_{1/2}$), area of bleaching, temperature conditions.