

Е. С. Кумейша

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР С ПОМОЩЬЮ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Научный руководитель: канд. техн. наук, ст. преп. О. В. Недзьведь

Кафедра медицинской и биологической физики,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

E. S. Kumeisha

DETERMINATION OF PARAMETERS OF SUBCELLULAR STRUCTURES WITH HELP OF SUPER-RESOLUTION MICROSCOPY

Tutors: PhD O. V. Nedzvedz

Department of Medical and Biological Physics,

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. На основе анализа видеоизображений, полученных при помощи флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF-микроскопии) определены параметры внутриклеточного транспорта белка-переносчика глюкозы GLUT-4 под воздействием инсулина.

Ключевые слова: инсулин, белок-переносчик глюкозы, GLUT4, видеоизображения, микроскопия сверхвысокого разрешения, TIRF-микроскопия.

Resume. On base of the analysis of video images obtained by fluorescence microscopy of total internal reflection (TIRF-microscopy), the parameters of the intracellular transport of glucose transfer protein GLUT-4 under the influence of insulin were determined.

Keywords: insulin, glucose transfer protein, GLUT4, video images, super-resolution microscopy, TIRF-microscopy.

Актуальность. На клеточном уровне происходит множество жизненно важных процессов, таких как внутриклеточная передача сигналов и транспорт белка. Анализ движения субклеточных структур играет важную роль при проведении биофизических и биохимических исследований.

Одним из процессов, протекающих на клеточном уровне, является перемещение везикул, содержащих белок GLUT-4 на мембрану клетки под влиянием инсулина. Изучение этого процесса является важным для объяснения патогенеза диабета второго типа у человека.

GLUT-4, регулируемый инсулином белок-переносчик глюкозы, в отсутствие инсулина преимущественно находится в цитоплазме клеток жировой и мышечной ткани. При воздействии инсулина начинается процесс перемещения везикул GLUT-4 к цитоплазматической мембране, где они встраиваются в мембрану, образуя в комплексе с другими белками протеиновые каналы для переноса глюкозы внутрь клетки [1].

Цель: на основе анализа видеоизображений, полученных при помощи флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения определить параметры внутриклеточного транспорта GLUT-4 в примембранной области.

Задачи:

1. Ознакомиться с принципами флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и ее возможностями для анализа внутриклеточных процессов.

Проанализировать видеоизображения внутриклеточного транспорта белка GLUT-4, полученные при помощи TIRF-микроскопии.

Определить параметры транспорта белка-переносчика глюкозы GLUT-4, такие как скорость перемещения везикул GLUT-4 и длительность интервала между стимуляцией инсулином и началом накопления белка на мембране.

Материалы и методы. Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF-микроскопия) служит важным инструментом для изучения процессов, происходящих в живых клетках. К преимуществам флуоресцентной микроскопии можно отнести возможность проведения исследований в живой клеточной культуре в отличие, например, от электронной микроскопии. Пространственное разрешение флуоресцентной микроскопии превышает разрешение оптической микроскопии, но ниже, чем разрешение электронной или атомно-силовой микроскопии. Для типичных условий флуоресцентной микроскопии латеральное разрешение составляет приблизительно 200 нм, аксиальное \approx 500 нм.

Принцип TIRF-микроскопии основан на явлении полного внутреннего отражения. С точки зрения классической физики, когда свет падает из оптически более плотной среды в оптически менее плотную, при определенном для каждой среды угле падения, преломленный луч исчезает, наблюдается только отраженный луч. Это явление называется явлением полного внутреннего отражения. Однако с точки зрения волновой физики, в момент времени, когда угол падения соответствует углу полного отражения, электромагнитное поле отраженного света все еще распространяется вдоль оси Z и затухает по экспоненциальному закону. Он проникает во вторую среду на глубину нескольких сотен нанометров и вызывает флуоресценцию отдельных молекул в тонком слое вблизи клеточной мембраны [2].

Интенсивность наблюдаемой флуоресценции уменьшается с увеличением расстояния от границы раздела и позволяет определить глубину расположения флуоресцирующих молекул. Интенсивность флуоресценции определяется по формуле (1):

$$I_z = I_0 e^{(-z/d_p)} \quad (1),$$

где глубина проникновения излучения d_p определяется как (2):

$$d_p = \lambda / (4\pi \sqrt{(n_1^2 - \sin^2 \theta) - n_2^2}) \quad (2),$$

где I_z – интенсивность на глубине Z, I_0 – начальная интенсивность, λ – длина волны, θ – угол падения.

Метод TIRF-микроскопии позволяет наблюдать флуоресценцию отдельных молекул. Малая глубина проникновения затухающей волны является основным преимуществом TIRF-микроскопии по сравнению с традиционной флуоресцентной микроскопией. Излучение возбуждается только в молекулах флуорофора, расположенных очень близко к границе раздела, создавая очень тонкий оптический срез. За пределами этого среза флуоресценция минимальна, что позволяет получать изображения с очень высокой контрастностью. Глубина проникновения электромагнитной волны во вторую среду зависит от напряжения на зеркальном гальванометре, при этом с увеличением напряжения глубина проникновения уменьшается, что позволяет наблюдать более тонкий срез.

Таким образом, TIRF-микроскопия относится к методам микроскопии сверхвы-

сокого разрешения или флуоресцентной наноскопии, которые имеют как латеральное, так и аксиальное разрешение, измеряемое в десятках нанометров [3].

Результаты и их обсуждение.

Видеоизображение внутриклеточного транспорта GLUT-4 представляет собой перемещающиеся светящиеся точки, соответствующие белкам, помеченным флуоресцентными метками. Яркие вспышки на видео возникают в моменты слияния везикул GLUT-4 с плазматической мембраной, так как при слиянии мембраны везикулы с плазматической мембраной наблюдается распространение флуоресцентного сигнала. Этот процесс называется везикулярным экзоцитозом, он играет важную роль в клеточной биологии (рис. 1).

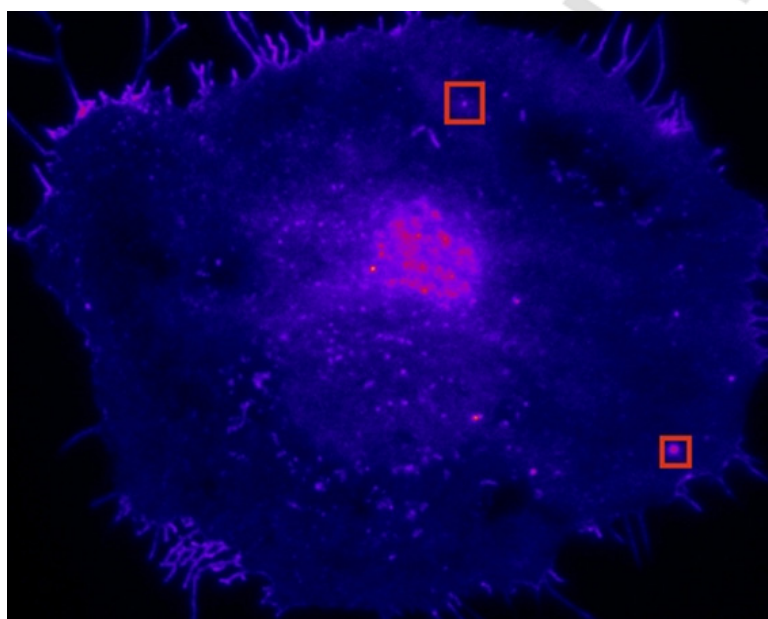


Рис. 1 □ Экзоцитоз на изображении TIRF-микроскопии

Инсулин регулирует экзоцитоз везикул GLUT4 во времени и пространстве. Анализ видеопоследовательности показал, что накопление GLUT4 на поверхности мембраны начинается через 3–5 минут после стимуляции инсулином.

Скорость перемещения везикул была определена на основе изменения их положения на видео. Зная разрешение изображения (0,133 мкм/пиксел) и частоту смены кадров (5 кадр/с) можно перевести пиксели в микрометры, а кадры в секунды. Таким образом, мгновенная скорость определяется перемещением частицы между кадрами с коэффициентом, определяемым по формуле (3):

$$k=0,133 \text{ мкм/пиксел} \cdot 5 \text{ кадр/с}=0,665 \text{ (мкм} \cdot \text{Гц)/(пиксел} \cdot \text{с)} \quad (3).$$

Таким образом, мгновенная скорость определяется на основе перемещения частицы между кадрами по формуле (4):

$$V=k \cdot l=0,665 \text{ l} \quad (4),$$

где V □ реальная скорость перемещения везикулы (мкм/с), l – перемещение везикулы между кадрами (пиксел/кадр).

Соответственно, значения скорости перемещения везикул были определены в

диапазоне: 0-3 пиксел/кадр, что соответствует 3,75-15 пиксел/с или 0,5мкм/с - 2мкм/с. Эти значения превышают значения для скорости диффузии, что подтверждает теорию о направленном движении везикул под влиянием инсулина.

Видеоизображения TIRF-микроскопии позволяют изучить динамику движения клеток в слое толщиной не более 200 нм вблизи поверхности клетки. Затем везикулы либо сливаются с плазматической мембраной, либо возвращаются в клетку. Но при этом, хотя траектории движения везикул во всей клетке нельзя наблюдать при помощи этого микроскопического метода, они могут быть промоделированы с помощью вероятностных методов. Кроме того, так как везикулы движутся вдоль микротрубочек, то на основе моделирования траекторий их движения можно восстановить трехмерную структуру микротрубочек.

Выводы:

1 Малая глубина проникновения затухающей волны является основным преимуществом TIRF-микроскопии по сравнению с обычной флуоресцентной микроскопией. Излучение возбуждается только в молекулах флуорофора, расположенных очень близко к мембране, что позволяет получать изображения с очень высокой контрастностью.

2 Анализ видеоизображений, полученных при помощи TIRF-микроскопии позволяет промоделировать траектории движения везикул с помощью вероятностных методов; восстановить трехмерную структуру микротрубочек; отследить события везикулярного экзоцитоза; определить скорость перемещения везикул GLUT-4. Это позволяет глубже понять пространственно-временную зависимость между передачей сигналов инсулина и внутриклеточным перемещением везикул GLUT-4 к мембране.

3 Накопление GLUT4 на поверхности мембраны начинается через 3–5 минут после стимуляции инсулином. Значения скорости перемещения везикул изменяются в диапазоне: 0-3 пиксел/кадр (3,75-15 пиксел/с, 0,5мкм/с - 2мкм/с).

Работа выполнена при поддержке совместного проекта БРФФИ 18КИ-015 между БГУ и Чжэцзянским Университом (Китай) «Living cells properties computing by tracking active component on images».

Литература

1. Клементьева, Н. В. Принципы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения / Н.В. Клементьева, Е.В. Загайнова, К.А. Лукьянов и др. // Современные технологии в медицине. □ 2016. □ № 8 (2). □ С. 130-140.
2. Zhou, X. Spatiotemporal Regulators for Insulin-Stimulated GLUT4 Vesicle Exocytosis / X. Zhou, P. Shentu, Y. Xu // Journal of Diabetes Research. □ 2017. □ Vol. 2017. □ P. 1-9.
3. Mattheyses, A. L. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist / A. L. Mattheyses, S. M. Simon, J. Z. Rappoport // Journal of Cell Science. □ 2010. □ Vol. 123 № 21. □ P. 3621–3628.