

Ekspresowe chemiczne pociągi w komórkach



ROBERT HOŁYST

Instytut Chemii Fizycznej
Polska Akademia Nauk, Warszawa
rholyst@ichf.edu.pl

Prof. dr hab. Robert Hołyst jest dyrektorem Instytutu Chemii Fizycznej PAN. Specjalizuje się w termodynamice statystycznej, chemii polimerów, chemii fizycznej miękkiej materii.

Gdy spojrzymy na zjawiska zachodzące w komórkach okiem chemika, najciekawsze rzeczy zobaczymy w jądrach komórkowych

Każde jądro komórki przypomina chemiczny kocioł, w którym najróżniejsze cząsteczki, dramatycznie różniące się budową i rozmiarami, uczestniczą w tysiącach reakcji. Środowisko jest wyjątkowo zatłoczone i intuicja podpowiada, że cząsteczki powinny poruszać się w nim bardzo wolno – więc i odczuwać dużą lepkość.

Naturę zjawiska lepkości udało się dobrze poznać w środowiskach gazowych. Gdy dwie warstwy gazu przesuwają się względem siebie, cząsteczka może przeskoczyć z jednej warstwy do drugiej. Wtedy dochodzi do zderzeń i spowolnienia ruchu. Ale gdy płyn robi się gęsty i przekształca się w ciecz, cząsteczki dodatkowo oddziałują między sobą i coraz trudniej wskazać zjawiska odpowiedzialne za powstanie lepkości. W rezultacie współczesne badania nad lepkością wciąż prowadzi się w najprostszych płynach rzeczywistych, zbudowanych z atomów argonu lub innych gazów szlachetnych.

Jako parametr lepkość występuje w znanych od XIX wieku równaniach Naviera-Stokesa. Opisują one poprawnie przepływ rzek lub strug powietrza wzdłuż skrzydeł samolotu. Pierwszymi publikacjami naukowymi nawiązującymi do lepkości płynów złożonych były prace Williama Sutherlanda oraz Alberta Einsteina, opublikowane

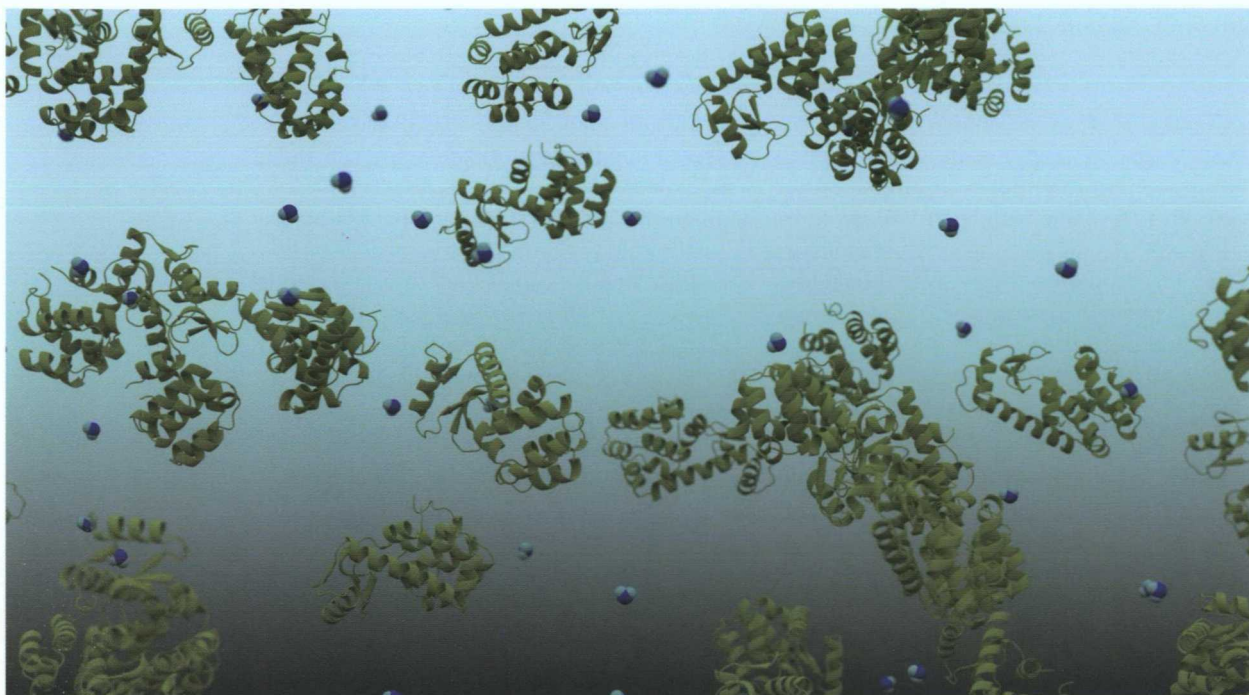
w pierwszych latach ubiegłego wieku. Zgodnie z nimi lepkość nie zależy od skali – powinna działać tak samo zarówno w przypadku lecącego samolotu, jak i cząsteczki białka poruszającej się wewnątrz jądra komórkowego. To ważny wniosek, bo to właśnie lepkość ogranicza dyfuzję, a ta z kolei szybkość zachodzenia reakcji chemicznych – także tych najważniejszych, kluczowych dla chemii życia.

Abstrakcyjne początki

W 1995 roku, zainspirowany wykładem o terapiach genowych na jednej z międzynarodowych konferencji, oszacowałem za pomocą wzoru Sutherlanda-Einsteina-Smoluchowskiego (SES) czas potrzebny białkom, aktywującym i dezaktywującym geny, na odszukanie odpowiadających im miejsc w łańcuchu DNA. Obliczenia mówiły o kilkunastu godzinach. Wiadomo jednak, że komórki dzielą się nawet co 20 minut. Zderzenie obu faktów prowadziło do absurdu. Komórki nie mogły dokonywać podziałów przed uruchomieniem swojego kodu genetycznego! Stało się oczywiste, że dyfuzja cząsteczek chemicznych w jądrach komórkowych zachodzi niezgodnie z przewidywaniami dotychczasowej teorii. Tak narodziła się zagadka, której rozwikłanie zajęło 17 lat.

Problem nie był wcześniej zupełnie niezany. Już w latach 50. ubiegłego wieku eksperymenty z zakresu sedymentacji drobin przy dużych przeciężeniach ujawniły, że obiekty znacznie mniejsze od makroskopowych mogą odczuwać lepkość tysiące razy mniejszą. Podobny efekt zauważono także dla cząsteczek białek w cytoplazmie komórkowej. Współczynnik lepkości typowej cytoplazmy ma jednak niewielką wartość, mieszczącą się między wartościami dla wody i oleju kuchennego. W porównaniu z tym, czego można oczekiwać w jądrach komórkowych, to niewiele.

Bezpośrednie pomiary szybkości dyfuzji cząsteczek w zatłoczonym środowisku



ICiF PAN

W Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie zbudowano bazę danych pozwalającą określić, jak szybko dyfundują białka w komórkach bakterii *Escherichia coli*

jąder komórkowych są i czasochłonne, i trudne. Pierwsze doniesienia z tego zakresu zaczęły się pojawiać w literaturze naukowej dopiero u schyłku ubiegłego wieku. Brak danych literaturowych oraz wyspecjalizowanej aparatury badawczej do przeprowadzania własnych eksperymentów spowodował, że przez pierwszych kilka lat moje prace zmierzające do poznania mechanizmów dyfuzji w zatłoczonym środowisku i realizowane m.in. we współpracy z prof. Krzysztofem Burdzym, probabilistą z University of Washington, dotyczyły głównie abstrakcyjnych, uproszczonych modeli i zagadnień statystycznych.

Tajemnice szamponów

W 2000 roku w ramach realizacji jednego z grantów Komitetu Badań Naukowych moje laboratorium kupiło pierwszy mikroskop. Wykorzystywano go głównie do relatywnie prostych i tanich eksperymentów z zakresu chemii fizycznej, z których tylko niewielka część luźno nawiązywała do problemu lepkości. Sprawy nabrały tempa dopiero kilka lat później, przy okazji mojego wyjazdu na wykłady do Malezji. Kluczowym momentem wyprawy okazała się... awaria samolotu na lotnisku w Amsterdamie. Podczas oczekiwania w pubie na nową maszynę poznałem jednego, ze specjalistów brytyjskiego koncernu Unilever. Kilka miesięcy później efektem tej przypadkowo zawartej znajo-

mości była oficjalna wizyta przedstawicieli firmy w Instytucie Chemii Fizycznej PAN. Unilever zajmuje się m.in. produkcją szamponów. A te są ciekawymi płynami złożonymi. Składają się niemal wyłącznie z wody, lecz mimo niewielkiej liczby dodatków mają znacznie większą od niej lepkość. Podczas rozmowy jednym zdaniem napomknąłem o możliwości wyznaczenia lepkości nowych szamponów w nanoskali i – jak się po chwili okazało – to był mój najkrótszy propozal grantowy.

Szampony to układy lamelarne, zbudowane z warstw jonowych surfaktantów. Początkowo do ich badania użyliśmy, dzięki życzliwości prof. Adama Patkowskiego, mikroskopu konfokalnego z korelacją fluorescencji, należącego do Wydziału Fizyki UAM. Wiele lat później kupiliśmy własny sprzęt. Pozwalał on śledzić w ognisku lasera zachowanie pojedynczych cząsteczek białek w płynach o objętości mikrometrów sześciennych, co wykorzystaliśmy do pomiaru lepkości w układach micelarnych. Dzięki użyciu cząsteczek barwników, białek, kropek kwantowych i kulek fluorescencyjnych udało nam się dokonać pomiarów lepkości, odczuwanej przez próbki różniące się rozmiarami aż o trzy rzędy wielkości. Eksperymenty trwały kilka lat i prócz firmy Unilever sponsorowało je Ministerstwo Nauki, Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, a obecnie korzystamy ze wsparcia Narodowego Centrum Nauki.

Transport cząsteczek w jądrach komórkowych

Dzięki pomiarom udało nam się wykazać, że w każdym układzie hydrodynamicznym istnieje fundamentalna, charakterystyczna skala długości, która zależy od rozmiarów obiektów tworzących płyn. W przypadku roztworów polimerów będzie to rozmiar kłębka polimerowego, a w zawieszinie wirusów – długość pałeczki wirusa. Stwierdziliśmy też, że lepkość zależy nie tylko od środowiska, ale również od rozmiaru i kształtu próbника użytego do jej pomiaru. W tym samym płynie, np. w cytoplazmie komórek jednego typu, cząsteczki różniące się kształtem i rozmiarami mogą odczuwać albo bardzo małą

Podczas przypadkowej rozmowy
napomknąłem o możliwości wyznaczenia
lepkości nowych szamponów
w nanoskali. To był mój najkrótszy
proposal grantowy

lepkość (nanolepkość), albo ogromną, nawet wiele tysięcy razy większą lepkość makroskopową. Zmiany lepkości mają przy tym charakter eksponencjalny i mogą być bardzo gwałtowne w pobliżu charakterystycznej dla roztworu skali długości.

Od polimerów do bakterii

Dalsze doświadczenia przeprowadzaliśmy w trzech typach roztworów: polimerach rozpuszczonych w wodzie, polimerach w rozpuszczalniku organicznym oraz w wodzie z micelami (wydłużonymi agregatami cząsteczek). W każdym przypadku zmiany lepkości spełniały tę samą zależność funkcyjną. Znaleziony wzór fenomenologiczny zawierał współczynniki tej samej natury fizycznej, charakteryzujące zarówno ośrodek płynny, jak i poruszający się w nim próbnik. Udało nam się ustalić, że nowy wzór ma charakter uniwersalny i może być stosowany dla próbników o rozmiarach od ułamków nanometrów po centymetry oraz dla płynów różnych typów, takich jak roztwory o elastycznej strukturze mikroskopowej (np. sieci polimerowe w rozmaitych rozpuszczalnikach) czy układy mikroskopowo sztywne (np. zbudowane z miceli).

Wzór zastosowaliśmy do opisu ruchu fragmentów DNA i innych próbników

w mysich komórkach mięśniowych Swiss 3T3 i ludzkich komórkach rakowych HeLa. Wyzaczyliśmy charakterystyczną skalę długości obiektów tworzących płyn, co pozwoliło nam ustalić, że w komórkach HeLa lepkość makroskopową odczuwają próbники większe od 350 nm, podczas gdy w komórkach Swiss 3T3 próg wynosi zaledwie 120 nm. Zmierzyliśmy również długość korelacji białek (cząsteczki o rozmiarach od niej mniejszych poruszają się w płynie swobodnie). W cytoplazmie komórek Swiss 3T3 wyniosła ona 7 nm, w komórkach HeLa – 5 nm.

Zgromadzona na tym etapie wiedza pozwoliła nam wrócić do problemu dyfuzji cząsteczek w gęsto zatłoczonym środowisku. Obiektem zainteresowania mojego zespołu stały się jednak nie komórki eukariotyczne, z trudnymi do badania jądrami komórkowymi, lecz bakterie. W porównaniu z komórkami ssaczymi bakterie są mniejsze, a ich wnętrza bardziej zatłoczone. Jak się okazało, lepkość makroskopowa jest tam nawet 26 tysięcy razy większa od lepkości wody.

Zebraliśmy kilkanaście znanych z literatury wartości współczynników dyfuzji makrocząsteczek w bakteriiach *Escherichia coli*. Dane te, w połączeniu z wzorem opisującym zmiany lepkości, umożliwiły nam skonstruowanie krzywej referencyjnej. Posłużyła ona do wyznaczenia współczynników dyfuzji wszystkich znanych białek występujących w bakteriiach *E. coli*. To ponad 6000 makrocząsteczek, na które składa się ok. 4300 kodowanych przez geny łańcuchów aminokwasów oraz ich różne, często wielokrotne połączenia (polimery), tworzone przez te same łańcuchy (homomery) oraz różne aminokwasy (heteromery). Dysponując wartościami współczynników dyfuzji, można było dokonać ostatniego kroku: wyliczyć stałe szybkości reakcji dla każdego z białek – a więc ustalić prędkości jazdy chemicznych pociągów w bakteriiach *E. coli*.

Dziewięć sekund do genu

Z prac nad nanolepkością, w których w IChF PAN uczestniczyło łącznie ponad 20 osób, wynikają interesujące wnioski. Na podstawie nowej teorii czas potrzebny białku na odnalezienie genu można dziś szacować na 9 s. Jedyne wiarygod-



ICIF PAN / Gregor Krzyżewski

Dr Tomasz Kalwarczyk próbuje dostarczyć informację w zatłoczonym środowisku. Białka w komórkach muszą radzić sobie z podobnymi problemami

ne dane eksperymentalne, opublikowane w „Science” przez inny zespół naukowy, mówią o 360 s. Potwierdza się zatem, że proces szukania nie jest prostą dyfuzją w przestrzeni 3D – białka ślizgają się po DNA, co spowalnia ich ruch.

Z kolei inne spostrzeżenie powinno ułatwić prowadzenie badań laboratoryjnych. Dotychczas uważano, że zatłoczone środowisko w komórkach jest trudne do badania i jego ogromna lepkość ma wyraźny wpływ na przebieg reakcji chemicznych. Teraz wiadomo, że to nie musi być prawdą i że dzięki prowadzeniu eksperymentów z białkami w buforze w kolbie laboratoryjnej można otrzymać wyniki zbieżne z pomiarami w cytoplazmie komórek HeLa (gdzie reakcje przebiegałyby tylko o 20-30% wolniej) i innych komórek eukariotycznych oraz w bakteriach (tu spowolnienie byłoby 10-krotne).

W większości przypadków białka w komórce będą bowiem dostatecznie duże, by odczuwać lepkość większą niż wody, lecz nadal za małe, żeby odczuwać tysiące razy większą lepkość makroskopową. ■

Spisał i opracował **Jarosław Chrostowski**

Chcesz wiedzieć więcej?

- Kalwarczyk T., Tabaka M., Holyst R. (2012). Biologistics-Diffusion coefficients for complete proteome of *Escherichia coli*. *Bioinformatics*, 28, 2971-2978.
- Kalwarczyk T., Ziebach N., Bielejewska A. et al. (2011). Comparative Analysis of Viscosity of Complex Liquids and Cytoplasm of Mammalian Cells at the Nanoscale. *Nano Letters*, 11, 2157-2163.
- Holyst R., Bielejewska A., Szymanski J. et al. (2009). Scaling form of viscosity at all length-scales in poly(ethylene glycol) solutions studied by fluorescence correlation spectroscopy and capillary electrophoresis. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11, 9025-9032.