

ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ВИРУСОВ: НАНОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНА

Вирусы – биологически активные частицы, состоящие из белковой оболочки (капсида) и генетического материала в виде РНК или ДНК. Они характерны тем, что не имеют собственного белок-синтетического аппарата и для репродукции им требуется клетка-хозяин, которая синтезирует вирусные белки и делает копии его генетического материала. Во внеклеточной фазе каждый вид вирусов представляет собой популяцию индивидуумов одинакового размера, формы и структуры, называемых вирионами. Как правило, вирусы имеют икосаэдрическую форму (сферические частицы) или спирально-симметричные палочки (прямые или изогнутые в зависимости от их длины и жесткости), реже вирусы имеют более сложное строение (рис. 1).

Изучение физико-химических и биологических факторов, влияющих на стабильность вирусных оболочек, и наблюдение процесса высвобождения РНК (ДНК) из вириона в реальном времени представляет собой важную фундаментальную задачу современной вирусологии. Детальное понимание того, как внешние факторы влияют на состояние вириона, может стать ключом к созданию новых противовирусных препаратов.

Для проведения таких исследований вирусологи используют широкий спектр экспериментальных методов, в том числе зондовую микроскопию.

Бактериофаги часто обладают смешанным типом симметрии, а у крупных вирусных частиц встречается дополнительная липопротеидная оболочка, подобная плазматической мембране клетки-хозяина. Встречаются отдельные виды вирусов без определенного типа симметрии (например, вирус оспы).

Фундаментальные исследования вирусных частиц сконцентрированы в трех основных направлениях. Одно из них – теоретическая биология. Общепризнанной считается гипотеза, в соответствии с которой вирусам принадлежит важнейшая роль в обмене генами в ходе эволюции. Встраиваясь в геном одной клетки-хозяина, вирус приобретает от него неко-

торые последовательности генов, а после этого, встроившись в геном новой клетки-хозяина, передает ему эти гены. Подобное явление часто наблюдается у бактерий и бактериофагов. Недавно был обнаружен вирус, паразитирующий подобным образом на других вирусах. Его ДНК имеет химерную природу: вирус "собрал" свой геном как минимум из трех разных источников. По-видимому, многие вирусы тоже произошли подобным образом, т.е. "собрались" из кусочков ДНК других вирусов и клеточных организмов, но у новооткрытого вируса признаки химерного происхождения наиболее очевидны [1].

Другое активно обсуждаемое направление связано с идеей создания на основе вирусов структурированных систем для применения в наноэлектронике. Широко известна спо-

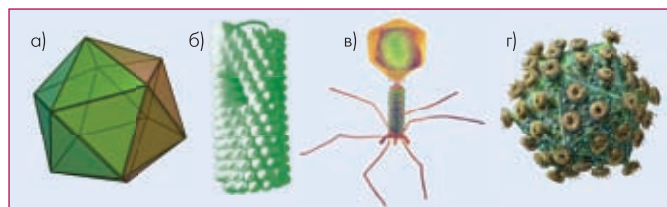


Рис. 1 Различные виды вирусов: а) икосаэдрический, б) спирально-симметричный, в) оболочечный, г) бактериофаг со смешанной симметрией

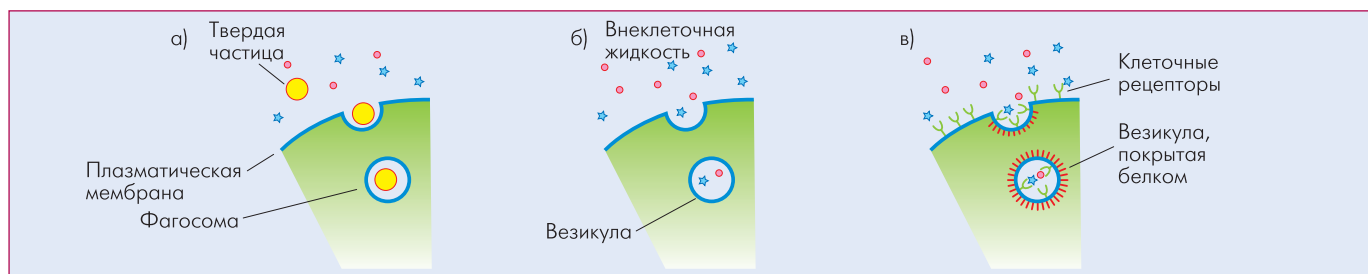


Рис.2 Фагоцитоз – поглощение крупной твердой частицы (а), пиноцитоз – поглощение жидкой фазы с растворенными в ней веществами (б) , рецептор-опосредованный эндоцитоз (в)

способность многих вирусов самопроизвольно агрегировать на поверхности с образованием более или менее упорядоченных структур. Так, например, вирус мозаики костра легко образует на поверхности слюды плотноупакованные вирусные кристаллы; многие палочковидные растительные вирусы склонны к простой агрегации торец-в-торец или бок-в-бок [2]. Важно то, что вирусы стабильны и имеют четко определенные размеры в нанометровом диапазоне. Один из последних подобных примеров – создание прототипа памяти на основе вируса ВТМ, содержащего наночастицы платины [3].

Однако понимание биологических процессов, происходящих в жизненном цикле вируса, необходимо, в первую очередь, медицине для борьбы с заболеваниями, поражающими людей, животных или растения. Современные медицинские технологии позволяют говорить о регулировании процессов, протекающих на молекулярном уровне. Так, например, Нобелевская премия по биологии и медицине этого года была присуждена Харальду цур Хаузену за открытие вызывающих рак шейки матки вирусов папилломы человека [4,5] и Франсуазе Барре-Синусси [6,7] и Люку Монтанье [8] за открытие вируса иммунодефицита человека. Эти открытия позволили сохранить миллионы человеческих жизней.

Дальнейшее развитие таких технологий и распространение их на все новые и новые объекты возможно только при появлении новых фундаментальных знаний о вирусах.

Крайне важно знать, как вирус взаимодействует с клеткой. Первая стадия взаимодействия – проникновение вируса в клетку. "С точки зрения" вируса главная задача – доставить в клетку свою РНК (или ДНК) с тем, чтобы, используя ресурсы клетки, запустить процесс воспроизводства вирусных частиц. Наиболее эффективно было бы вести борьбу с вирусом именно на этой, самой ранней, стадии заражения. Существует ограниченное количество противовирусных препаратов широкого спектра действия, ориентированных на то, чтобы остановить заражение организма в самом начале и не дать вирусу добраться до клетки-мишени.

Большинство современных препаратов борются с заражением на поздних стадиях инфекции. Они блокируют процессы репликации вирусной ДНК, ингибируют ферменты (к примеру, ДНК-полимеразу, вирусные протеазы) или ограни-

чивают распространение инфекции, затрудняя выход готовых вирионов из клетки.

В ходе жизнедеятельности клетка постоянно обменивается различными веществами с внешней средой. Одни вещества проникают через мембрану диффузионно вследствие градиента концентрации (транспорт воды, углекислого газа, кислорода). Другие – облегченной диффузией, двигаясь через поры и специфичные каналы по направлению градиента концентрации (транспорт аминокислот и сахаров). Третьи движутся через мембрану при помощи активного транспорта против градиента концентрации с затратой энергии (типичный пример – натрий-калиевый насос). Доставка крупных частиц в клетку осуществляется посредством эндоцитоза.

Чтобы доставить в клетку свой генетический материал, вирусу необходимо "взломать" тот или иной механизм доставки веществ внутрь клетки. Для большинства вирусов единственный способ прикрепиться к мембране – соединиться со специфическим клеточным рецептором. Рецептор представляет собой белок, комплекс белков или гликопротеид, подобный иммуноглобулинам (антителам).

Наличие подходящего рецептора определяет круг клеток-хозяев данного вируса. После того, как вирус прикрепился к рецептору, ход событий может быть разным. В некоторых случаях взаимодействие с рецептором приводит к образованию отверстия в оболочке вириона, а в других – вызывает появление поры в клеточной мембране. Наличие на поверхности вируса нескольких лигандов теоретически дает возможность "выследить" его еще во внеклеточной фазе и заблокировать при помощи специального препарата.

Часто вирус целиком попадает внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза (рис.2) и оказывается внут-

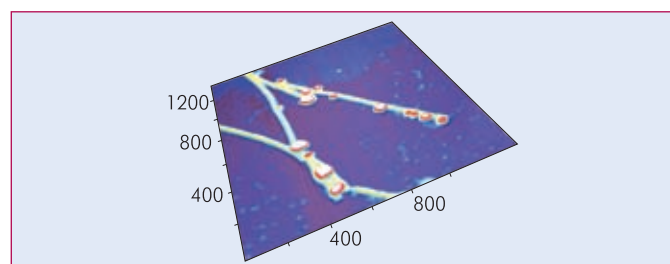


Рис.3 Атомно-силовое изображение специфического "узнавания" вируса табачной мозаики антителами к белку оболочки

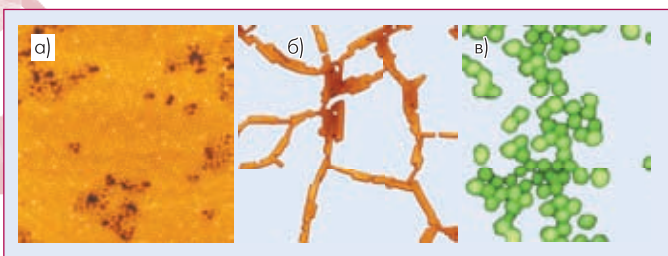


Рис.4 Атомно-силовые изображения различных вирусов: а) вирус мозаики костра, б) полулатентный вирус мятлика, в) вирус Менго

ри мембранного пузырька (визикулы), который может слиться с лизосомой или в котором клетка может избирательно изменять кислотность. Под действием гидролаз лизосомы или изменившегося pH меняется конформация оболочки, и РНК (ДНК) выходит из вириона.

Традиционно для изучения вирусов использовалась электронно-лучевая микроскопия (ЭЛМ). Ее главное преимущество – высокое разрешение, однако при ее помощи никаких данных об образце, кроме топографических, получить нельзя.

В течение последних десятилетий быстрое развитие получили методы сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), в том числе атомно-силовая микроскопия (АСМ), ставшая эффективным инструментом для решения разнообразных задач вирусологии. АСМ позволяет не только визуализировать профиль поверхности образца с нанометровым разрешением и получать высококачественные изображения вирусных частиц (рис.3, 4 [2, 9, 10]), но и дает много дополнительных возможностей. К примеру, АСМ была использована для прямых измерений силы связи в паре лиганд-рецептор биотин и авидин [11], силы связи между комплиментарными цепями ДНК [12], эластичности клеточной мембраны [13].

Зондовая микроскопия позволяет определять механические свойства отдельных, сорбированных на поверхность, вирусных частиц [14]. Для этого используется метод силовой спектроскопии [15]. Эксперимент по силовой спектроскопии включает получение и последующий анализ кривой (массива кривых) зависимости действующей на закрепленную с двух концов макромолекулу силы от расстояния между этими концами при растяжении макромолекулы (рис.5). Растяжение может быть осуществлено различными методами, в описываемом эксперименте в качестве растягивающего устройства используется атомно-силовой микроскоп, основное преимущество которого – высокая чувствительность при определении сил (менее нескольких наноньютонов). Методика силовой спектроскопии может быть использована не только для растяжения единичной макромолекулы, но и для определения сил, необходимых для разрыва связи между двумя молекулами, одна из которых закреплена на поверхности, а другая – на острие.

Другой метод исследования механических свойств состоит в анализе данных о высоте вирусной частицы. В этом случае необходимо получить серию изображений в контактном или резонансном режиме, варьируя силу воздействия иглы на об-

разец при сканировании. При разной силе высота частиц будет различной, и по графику такой зависимости можно определить механическую жесткость частиц, модуль Юнга (рис.6).

В работе [16] показано, что жесткость полноценной частицы X вируса картофеля (ХВК) и пустышки (оболочки, не содержащей РНК) не одинакова – наблюдается небольшая разница в модуле Юнга. Таким образом, можно говорить о том, что при высвобождении РНК (ДНК) из вириона меняются механические свойства последнего.

Еще одна возможность СЗМ состоит в изучении локальных электрических, магнитных или химических свойств поверхности. При помощи резистивного АСМ можно получить изображение поверхности образца, в каждой точке которого при помощи цвета передается локальная проводимость поверхности. Это позволяет исследовать электрические свойства вирусной оболочки и влияние электрического тока на высвобождение РНК (ДНК). Аналогично можно изучать влияние магнитного поля на вирусные частицы в магнитном режиме АСМ.

Важнейшее преимущество АСМ перед ЭЛМ состоит в том, что эксперимент можно проводить не только в вакууме, но и на воздухе и, что особенно важно, в жидкой среде, с использованием жидкостной ячейки. В ней экспериментатор имеет возможность наблюдать за течением биологических процессов в режиме реального времени [17]. Ячейка снабжена специальными отверстиями, через которые при помощи шприца вводится раствор. Можно, например, постепенно подкислять окружающую вирус среду, чтобы наблюдать за изменениями в его капсиде и высвобождением РНК. Для биологических приложений АСМ очень интересен режим сканирования в жидкости, поскольку при работе с закрепленными на подложке высушенными образцами никогда нельзя знать, как изменился объект при подготовке к микроскопическому исследованию. Интересно наблюдать "живые" образцы, на которых исследуемые объекты имеют реальные размеры, не искаженные в процессе сорбции на подложку или отщепления металлом. Это можно осуществить только в естественной жидкой буферной среде. Следует заметить, однако, что любые измерения в жидкости проводить значительно сложнее, чем на воздухе.

В целом при исследовании вирусов с помощью АСМ могут быть получены совершенно новые, недоступные другими ме-

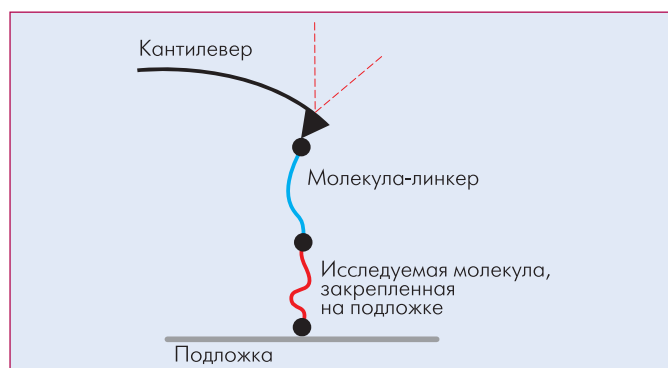


Рис.5 Схема метода силовой спектроскопии

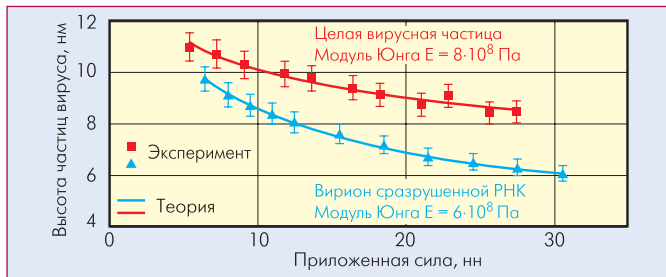


Рис. 6 Зависимость высоты частиц вируса X картофеля от силы, приложенной к зонду [8]

тодами, результаты. Вместе с тем всестороннее исследование объекта – дело долгое и трудоемкое, требующее значительных теоретических знаний и практических навыков. Однако изучение природы заболеваний и создание новых вакцин – задача, решение которой стоит этих усилий и диктует потребность в проведении серьезных и объемных фундаментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bernard La Scola et al. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. – Nature, 2008, 455, p. 100–104.
2. Dubrovin E.V., Drygin Yu.F., Novikov V.K., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy as a tool of inspection of viral infection. – Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2007, № 3, 2, p. 128–131.
3. Ricky J.Tseng et al. Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles. – Nature Nanotechnology, 2006, № 1, p. 72–77.
4. H. zur Hausen, Papillomaviruses in human cancers. – Proc. Assoc. Am. Phys, 1999, 111, p. 581–587.
5. H. zur Hausen, Papillomaviruses – to Vaccination and Beyond. – Biokhimiya/Biochemistry, M: 2008 73, p. 498–503.

6. Simon F., Maucere Ph., Roques P., Lousert-Ajaka I., Muller-trutwin M.C., Saragosti S., Georges-Courbot M.C., Barre-Sinoussi F., Brun-Vezinet F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. – Nature & Med., 1998, №4, p. 1032–1037.
7. Barre-Sinoussi F. et al. Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. J.Clin. Investet., 2005, 115 (4), p. 1082–1091.
8. Irigaray P., Newby J.A., Clapp R., Hardell L., Howard V., Montagnier L., Epstein S., Belpomme D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. – Biomed Pharmacother, 2007, 61 (10), p. 640–658.
9. Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. Atomic Force Microscopy Examination of TMV and Virion RNA. – FEBS letters, 1998, 425, p. 217–221.
10. Gallyamov M.O., Drygin Yu.F., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy visualization of RNA and ribonucleotides of the tobacco mosaic virus. – Surface investigation, 2000, № 15, p. 1127–1134.
11. Florin E.L., Moy V.T. and Gaub H.E. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. – Science, 1994, 264, 5157, p. 415–417.
12. Lee G.U., Chrisey L.A., Colton R.J. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. – Science, 1994, 266, p. 771–773.
13. Putman C., van der Werf K.O., de Grooth B.G., van Hulst N.F., Greve J. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy. – Biophys. J., 1994, 67, p. 1749–1753.
14. Falvo M.R., Washburn S., Superfine R., Finch M., Brooks F.P., Chi V., Taylor II R.M. Manipulation of individual viruses: friction and mechanical properties. – Biophys. J., 1997, 72, p. 1396–1403.
15. Темкина Н., Филонов А., Яминский И. Силовая спектроскопия единичных молекул и их комплексов с использованием АСМ. – Наноиндустрия, 2008, № 6, с.26–29.
16. Kiselyova O.I., Nasikan N.S., Yaminsky I.V., Novikov V.K. AFM imaging of PVX particles and PVX RNA. – Physics of Low-Dimensional Structures, 2001, № 3/4, с. 167–174.
17. Malkin A.J., Land T.A., Kuznetsov Yu.G., McPherson A., DeYoreo J.J. Investigation of virus crystal growth mechanisms by in situ atomic force microscopy. – Phys. Rev. Lett., 1995, 75 (14), p. 2778–2781.