

Исследование структурно-функциональных свойств клеточных мембран методами атомно-силовой микроскопии

*Гомельский государственный медицинский университет,
Институт фотобиологии НАН Беларуси, г. Минск

Сделан обзор возможностей применения атомно-силовой микроскопии в исследованиях физических свойств клеточных поверхностей. Для количественного определения эластичных свойств мембранных поверхностей разработан метод силовой спектроскопии. Определены модули упругости ядер и митохондрий гепатоцитов. Методом атомно-силовой микроскопии изучена структура синаптосомальных мембран.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, модуль упругости, ядра, митохондрии, синаптосомы.

T.G. Kuznetsova, S.V. Fedorovich, T.V. Vasim

Investigating of structural and functional properties of cell membranes by atomic force microscopy

The potential use of atomic force microscopy for studying physical properties of cellular surface – an overview. Methods of force spectroscopy have been developed for quantitative investigation of elastic properties of membrane surface. Measuring of hepatocytes nuclei and mitochondria elastic modules has been conducted. Structure of synaptosomal membrane was studied by atomic force microscopy.

Key words: atomic force microscopy, elastic modulus, nuclei, mitochondria, synaptosome

За время, прошедшее с момента появления атомно-силовой микроскопии (АСМ), определились области клеточной биологии, для которых этот метод стал наиболее перспективным. Прежде всего, это изучение нативных цитологических структур и механизмов их функционирования путем оценки физических свойств их поверхности. Конструкция современных АСМ позволяет реализовать сразу несколько различных модификаций анализа. В любом режиме работы перемещения сканирующего зонда формируют трехмерное топографическое изображение поверхности изучаемого объекта. Одновременно с этим можно регистрировать и другие характеристики поведения зонда, которые будут зависеть от локальных физических свойств поверхности. Таким образом, различия в свойствах можно картировать и комбинировать их с изображением формы объекта. Например, АСМ позволяет определять распределение поверхностного потенциала на мембранах, эластичность и мобильность мембранных слоев, их адгезивные свойства и т.д. [6, 9]

Другое направление - определение сил взаимодействий в макромолекулярных системах. Используя зонды с закрепленными на острие лигандными молекулами можно анализировать адгезию, локализацию рецепторов, моделировать механизмы различных процессов, например, миелинизацию нервных волокон [10], молекулярные события, обеспечивающие экзоцитоз, регуляцию адгезии лейкоцитов к эндотелиальным пластам [13] и т.д.

Анализ сил межмолекулярных взаимодействий в сочетании с определением упругостных свойств обеспечивает дополнительные возможности АСМ. Например, в

работе Almqvist [3] показано, что эластичность и текучесть мембраны эндотелиоцитов выше на границах с соседними клетками и находится в прямой зависимости от плотности рецепторов к фактору роста. Эти эксперименты значительно расширяют представления о механизмах ангиогенеза.

Исключительный интерес представляет исследование упруго-вязкостных свойств клеточных мембран, поскольку именно они являются наиболее общими, интегральными показателями функционального состояния мембран, мембранных органелл и клеток в целом. В этой области наиболее разработанным подходом представляется метод «force mapping» [7]. Этим методом было впервые проведено определение эластичных свойств в различных участках живых тромбоцитов и сделаны модельные расчеты [11]. Это позволило проследить трансформацию цитоскелета активированных тромбоцитов, механическую пульсацию поверхности изолированных кардиомиоцитов, оценить эластические свойства различных клеток [4,9].

Важнейшим событием в развитии биологической АСМ является описание новых клеточных структур. В 1997 году на поверхности живых экзокриноцитов поджелудочной железы, а позже у нейроэндокринных клеток были описаны структура и динамика пор слияния, или так называемых поросом [12]. Эти исследования предполагают существование нового механизма транспорта веществ через плазмолемму, отличного от экзоцитоза.

Несмотря на очевидный прогресс и перспективность АСМ-исследований, они очень далеки от состояния рутинных методов, особенно в области исследования физико-механических свойств живых клеток. Это новая область, где активно разрабатываются как технические режимы сканирования, так и теоретические модели интерпретации результатов. Этим объясняется цель наших экспериментов – разработка методов АСМ для исследования нативных цитомембран, в частности для определения их упругостных свойств.

Материал и методы.

Объектами для исследования упруго-вязкостных свойств были выбраны ядра и митохондрии гепатоцитов белых крыс. Для их получения использовалась методика дифференциального центрифугирования.

В ходе эксперимента был разработан способ формирования монослоев исследуемых органелл на стеклянной подложке [2]. Для оценки качества образцов использовалась сканирующая электронная микроскопия, где применялись стандартные методики.

В качестве еще одного объекта исследований были выбраны изолированные нервные окончания – синаптосомы. Синаптосомы получали по методу Najos [5]. Для подготовки образцов был модифицирован способ, предложенный ранее [1]. АСМ-исследования были проведены на приборе НТ-206 (ОДО Микротестмашины, Беларусь).

В работе использовался режим tapping mode, в котором острие зонда колеблется и в нижнем положении кратковременно касается образца. Этот режим позволяет свести к минимуму неупругую деформацию поверхности и избежать повреждения мембраны. В сочетании с построением изображений фазового контраста он также позволяет выявлять неоднородности физических свойств поверхности. Для количественной оценки упругостных свойств был применен метод динамической силовой спектроскопии [2].

Результаты и обсуждение

На монослойных образцах были успешно проведены АСМ-исследования в различных режимах работы. Получены топографические изображения объектов в режиме tapping mode. Качество изображений свидетельствует об их хорошей сохранности, прочной адгезии к стеклянной подложке и устойчивости к процессу сканирования (рис.1). Важным достоинством монослоев оказалось то, что обширные периферийные участки были покрыты изолированными органеллами, что позволяет оценивать их размеры и форму.

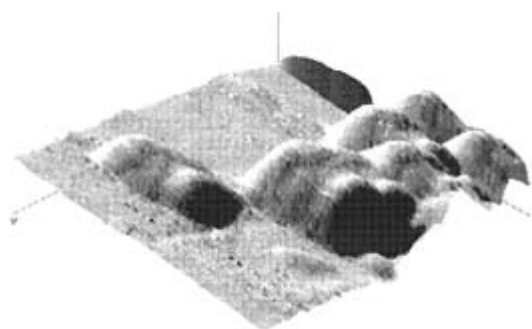


рис.1 АСМ-изображение митохондрий гепатоцитов. Площадь поля сканирования - 4x4 мкм. Высота Z - 1 мкм

Монослойные образцы были также исследованы методом динамической силовой спектроскопии [2]. Сущность метода заключается в анализе амплитуды колебаний зонда в результате кратковременного контактного взаимодействия острия зонда с исследуемой поверхностью. За счет упругого взаимодействия острия с мембранной поверхностью амплитуда уменьшается относительно амплитуды исходных свободных колебаний. Авторами выведена формула, где для расчета модулей эффективной упругости биологических мембран используются кривые амплитуда-расстояние между острием зонда и поверхностью образца [2].

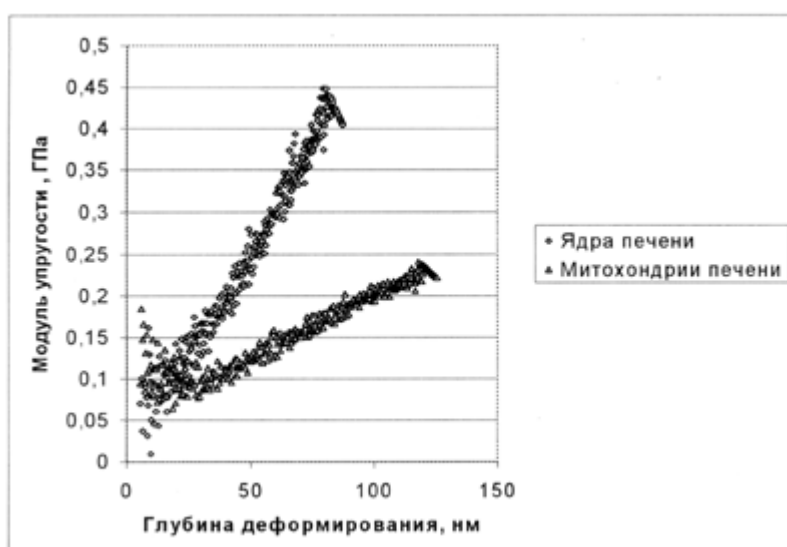


рис.2 Модули упругости ядер и митохондрий печени

На этой основе впервые проведено количественное измерение модулей упругости мембран изолированных митохондрий и ядер. Результаты экспериментов приведены на рисунке 2. Значения модулей упругостей оказались в диапазоне 70-450 МПа.

Представленный на рисунке 2 график наглядно демонстрирует различия в упругостных свойствах ядер и митохондрий. При деформировании объектов анализирующим зондом на глубину 10-20 нм значения для обеих органелл оказались близки и составили разброс от 70 до 120 МПа. Глубина погружения зонда при этом приблизительно соответствует ширине межмембранного пространства митохондрий и перинуклеарного пространства кариолеммы. При глубине деформирования 50-70 нм, при которой оценивается общая упругость сразу двух мембранных слоев, модули упругости митохондрий оказались равны 120-200 МПа, а ядер - 250-450 МПа, т.е. жесткость ядер была приблизительно в 2 раза выше. Предположительно это может быть обусловлено ядерной ламиной, которая образует кариоскелет из промежуточных филаментов, связанных с внутренней ядерной мембраной.

Необходимо отметить, что приведенные в работе результаты на данном этапе являются оценочными и могут обоснованно использоваться лишь при сравнительном анализе. Тем не менее, полученные результаты демонстрируют перспективы прямых количественных измерений интегральных биомеханических свойств клеточных мембран. Следует отметить, что большинство экспериментальных исследований в этой области носит качественный или относительный характер (например, оценка упругостных свойств по микровязкости, определяемая липидными и белковыми зондами).

Еще одним объектом АСМ-исследований были выбраны изолированные нервные окончания – синаптосомы, которые широко используются в качестве модели при изучении механизмов передачи нервного возбуждения между нейронами. Нервные окончания представляют собой, в основном, пресинаптические нервные терминалы, содержащие синаптоплазму, везикулы с нейромедиатором и некоторое количество митохондрий. Синаптосомы способны в течение нескольких часов сохранять свою функциональную активность, что, в сочетании с достаточно простым способом получения, делает их надежной модельной системой для исследования синапсов.

Важнейшим элементом синаптосом является синаптическая мембрана со встроенными в нее белковыми молекулами: переносчиками нейромедиаторов и их предшественников, рецепторами, канальными белками, мембраносвязанными ферментами. Динамика ее перестройки, в конечном счете, и определяет функциональные характеристики межнейрональных контактов.

В результате экспериментов были получены АСМ-изображения округлых, слегка вытянутых частиц, которые по размерам (ширина 250 – 270 нм, длина 500 – 700 нм, высота 40 – 50 нм) хорошо соответствуют синаптосомам.

Выводы. Использование метода динамической силовой спектроскопии и фазового контраста позволили выявить на поверхности синаптосом отчетливо выраженные участки размером 10-20 нм, которые отличались более низкой жесткостью (плотностью). Относительно стабильные размеры этих структур и регулярность их распределения позволяет исключить возможность артефакта. По размерам и характеру размещения это могут быть как поры слияния, недавно описанные в работе Жена [8], так и липидные рафты [14]. Выяснение природы этих структур требует дальнейших экспериментов.

1. Лиопо А.В., Чумакова О.В., Чижик С.А. Атомно-силовая микроскопия в оценке состояния синаптосомальной мембраны. Минск, БГУ, 2002. – 143 с.

2. Матюхина Т. Г., Шельманов А. И., Чирик С. А. Определение эластичных свойств ядер и митохондрий методом атомно-силовой микроскопии. Морфологические ведомости, 2002. – № 3-4.– с. 24-26.
3. Almqvist N., Bhatia R., Primbs G., Desai N., Banerjee S., Lal R. Elasticity and adhesion force mapping reveals real-time clustering of growth factor receptors and associated changes in local cellular rheological properties. *Biophys.J.*, 2004, v.86, p.1753-1762.
4. Domke J., Parak W.J., George M. et al. Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscope. *European Biophys.J.Biophys.Letts.*, 1999, v.28, p. 179-186.
5. Hajos F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.*, 1975, v.93, p. 485-489.
6. Heinz W.F. and Hoh J.H. Relative surface charge mapping with the atomic force microscopy. *Biophys.J.*, 1999b, v.76, 528-538.
7. Heinz W.F. and Hoh J.H. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends Biotechnol.*, 1999a, v.17, p. 143- 150.
8. Jena J. Fusion pore or porosome: structure and dynamics. *Endocrinology*, 2003, v.176, p.169-174 A.
9. Laney D.E., Garsia R.A., Parsons S.M., Hansma H.G. Changes in the elastic properties of cholinergic synaptic vesicles as measured by atomic force microscopy. *Biophys.J.*, 1997, v.72, 806-813.
10. Mueller H., Butt H.-J., Baberg E. Force measurements on myelin basic protein adsorbed to mica and lipid bilayer surfaces done with the atomic force microscope. *Biophys J.*, 1999, v. 76, № 2, p. 1072-1079.
11. Radmacher M., Fritz M., Kacher C. et al. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope *Biophys. J.*, 1996, № 70, p. 556-567.
12. Schneider S.W., Sritharan K.S., Geibel J.P., Oberleithner H., Jena B.P. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *PNAS* 1997, v. 94, p. 316-321.
13. Zhang X., Chen A., Leon D., Li H., Noiri E., Moy V.T., Goligorsky M.S. Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004, v.286, p.359-367.
14. Zajchowski L. D, Robbins S.M.. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signaling in membrane microdomains. *Eur. J.Biochem.*, 2002, v.269, p.737-752.