

## Применение атомно-силовой микроскопии для исследования процессов внутриклеточной сигнализации в нейронах

© А.В. Анкудинов,<sup>1,2</sup> М.М. Халисов,<sup>2,3</sup> В.А. Пенниайнен,<sup>3</sup> С.А. Подзорова,<sup>3</sup> Б.В. Крылов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,  
194021 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский университет ИТМО,  
197101 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
199034 Санкт-Петербург, Россия  
email: krylov@infran.ru

(Поступило в Редакцию 10 декабря 2014 г.)

В работе впервые сделана попытка применить метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) для выяснения молекулярных механизмов внутриклеточной сигнализации, в которых участвует  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, играющая важную роль трансдуктора (усилителя) сигналов. АСМ-метод в сочетании с методом органотипического культивирования позволил получить количественные данные о величинах модулей Юнга живых нейронов и клеток, подвергшихся воздействию очень низких концентраций уабаина. Известно, что в этом случае он запускает процессы внутриклеточной сигнализации, передавая молекулярный сигнал на геном клетки. Клеточным ответом служит резкое усиление процесса синтеза белка, сопровождаемое перестройкой цитоскелета и активацией ферментных сигнальных путей в цитозоле. С помощью режима PeakForce QNM были проведены АСМ-измерения изображений рельефа поверхности клеток. Одновременно измерялись величины модуля Юнга контрольных нейронов, а также модуля Юнга сенсорных нейронов при воздействии уабаина. Установлено, что активация трансдукторной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов, которые увеличивают жесткость клетки. Дальнейшее использование АСМ-метода для изучения механизмов внутриклеточных молекулярных процессов представляется перспективным. Его совместное применение с ингибиторным анализом позволит выяснить роль отдельных молекул (например, ряда ферментов) в регуляции процессов роста и развития живого организма.

Активация трансдукторной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы происходит благодаря специфическому связыванию с молекулой уабаина. Это приводит к запуску внутриклеточных каскадных процессов, ведущих к экспрессии ряда генов [1]. По этой причине очень низкие „эндогенные“ концентрации уабаина влияют на рост, развитие и пролиферацию клеток различных тканей. Этот агент может также активировать процесс апоптоза злокачественно перерожденных клеток. С другой стороны, низкие концентрации уабаина могут вызывать снижение потенциальности медленных натриевых каналов, ответственных за кодирование болевых сигналов у теплокровных животных [2,3]. Связь между трансдукторной функцией  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и снижением потенциальности медленных натриевых каналов была продемонстрирована ранее [4]. Предположение о том, что запуск трансдукторной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы приводит к физиологически важным последствиям на мембранном, клеточном и поведенческом уровнях, также было исследовано ранее [5]. Низкие (нанолярные) концентрации уабаина были обнаружены в крови человека [6]. В этой связи применение метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) для исследования эффектов эндогенных концентраций уабаина, активирующих трансдукторную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, представляет значительный интерес не только с теоретической, но и с практической точки зрения.

АСМ — это уникальный инструмент, позволяющий помимо поверхности твердых тел изучать также и мягкие биологические объекты, в частности живые клетки. За счет возможности точного контроля силы, действующей со стороны зонда на образец, удается сканировать живые клетки в условиях, приближенных к физиологическим, при этом получать не только информацию о топографии клеток, но и отслеживать динамику изменения их упругих свойств (т.е. модуля Юнга) при активации внутриклеточных сигнальных процессов. Первые работы по АСМ-исследованию клеток эукариот относятся к последнему десятилетию прошлого века [7,8]. К настоящему времени с помощью метода АСМ были исследованы различные виды клеток: нейроны, фибробласты, кардиомиоциты и т.д. [9–15].

Недавно разработанный компанией Bruker режим работы АСМ PeakForce Quantitative Nanomechanical properties Mapping (PeakForce QNM) позволяет одновременно с топографией живых клеток также оценивать их упругость. Благодаря тому, что PeakForce QNM дает возможность с высокой степенью точности контролировать силу взаимодействия между зондом и образцом во время сканирования, этот режим является оптимальным для АСМ-исследования клеток. Суть PeakForce QNM состоит в том, что в каждой точке измерения зонд надавливает на образец с заданной силой, затем отводится на безопасное расстояние, после чего проис-

ходит перемещение в следующую точку и указанный цикл повторяется снова. В результате такого подхода АСМ-сканирование удается проводить без повреждения образца.

В настоящей работе с помощью АСМ-режима PeakForce QNM проводились измерения модуля Юнга живых сенсорных нейронов. Изучались контрольные клетки, а также сенсорные нейроны, подвергнутые воздействию убаина. Он приобретен в фирме „Сигма“.

Нейроны дорзальных ганглиев были выделены из областей L5-S1 10–12-дневных куриных эмбрионов в соответствии с методикой, разработанной ранее [5]. Убаин добавляли в культуральную среду в концентрации  $1 \times 10^{-10}$  М. Контрольные клетки культивировали без убаина.

Эксперименты были выполнены на коммерческом атомно-силовом микроскопе Bioscope Catalyst фирмы Bruker, совмещенном с инвертированным оптическим микроскопом Carl Zeiss Axio Observer D1m. Полученные в результате сканирования АСМ-данные обрабатывались с помощью программ NanoScope Analysis 1.5 и Gwyddion 2.28.

Предварительно перед АСМ-сканированием сенсорные нейроны визуализировались с помощью оптического микроскопа для отбора подходящих здоровых сенсорных нейронов, а также для точного позиционирования АСМ-зонда относительно клеток. Также оптический микроскоп использовался во время АСМ-сканирования для контроля текущего состояния исследуемых нейронов.

АСМ-исследование сенсорных нейронов проводилось в жидкости при постоянной температуре около  $37^\circ\text{C}$ . Поддержание постоянной температуры образца осуществлялось с помощью термоконтроллера LakeShore 335.

Для обеспечения неразрушающего характера АСМ-измерения использовались зонды Bruker SNL-10 (С) с малым коэффициентом жесткости. Согласно данным производителя, жесткость таких зондов составляет  $0.12 \text{ N/m}$ . Для получения более надежной количественной информации о модуле Юнга сенсорных нейронов с помощью метода тепловых шумов непосредственно перед измерением производилась точная калибровка коэффициента жесткости зондового датчика.

Область сканирования сенсорных нейронов варьировалась от  $20 \times 20$  до  $60 \times 60 \mu\text{m}$ , исходя из размеров конкретной клетки. Обычно эта область включала часть тела клетки (сомы) и отрезок нейрита. Максимальная высота отсканированной части нейронов, как правило, не превышала  $5 \mu\text{m}$  (что соизмеримо с высотой иглы зондового датчика). Это защищало клетки от нежелательного контакта с консолью зонда, который мог бы явиться причиной открепления образца от подложки. Для уменьшения гидродинамических сил, действующих на движущийся зонд в жидкости, устанавливалась наименьшая возможная частота построчного сканирования ( $0.1 \text{ Hz}$ ), а также минимальная частота вертикального

движения зонда ( $250 \text{ Hz}$ ). Разрешение АСМ-скана выбиралось на уровне  $128 \times 128$  точек, а максимальная сила надавливания — не более  $2 \text{ nN}$  с целью уменьшения вероятности повреждения клеток.

В АСМ-режиме PeakForce QNM в каждой точке измерения регистрируются так называемые силовые кривые (зависимости силы взаимодействия между зондом и образцом от расстояния между ними). Силовая кривая содержит в себе информацию о механических характеристиках образца, в частности, о модуле Юнга. Данные о модуле Юнга сенсорных нейронов определялись автоматически с использованием модели Снеддона при обработке силовых кривых. В рамках этой модели зонд считается конусообразным, а модуль Юнга  $E$  образца рассчитывается на основании следующего выражения:

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \tan(\alpha) \delta^2, \quad (1)$$

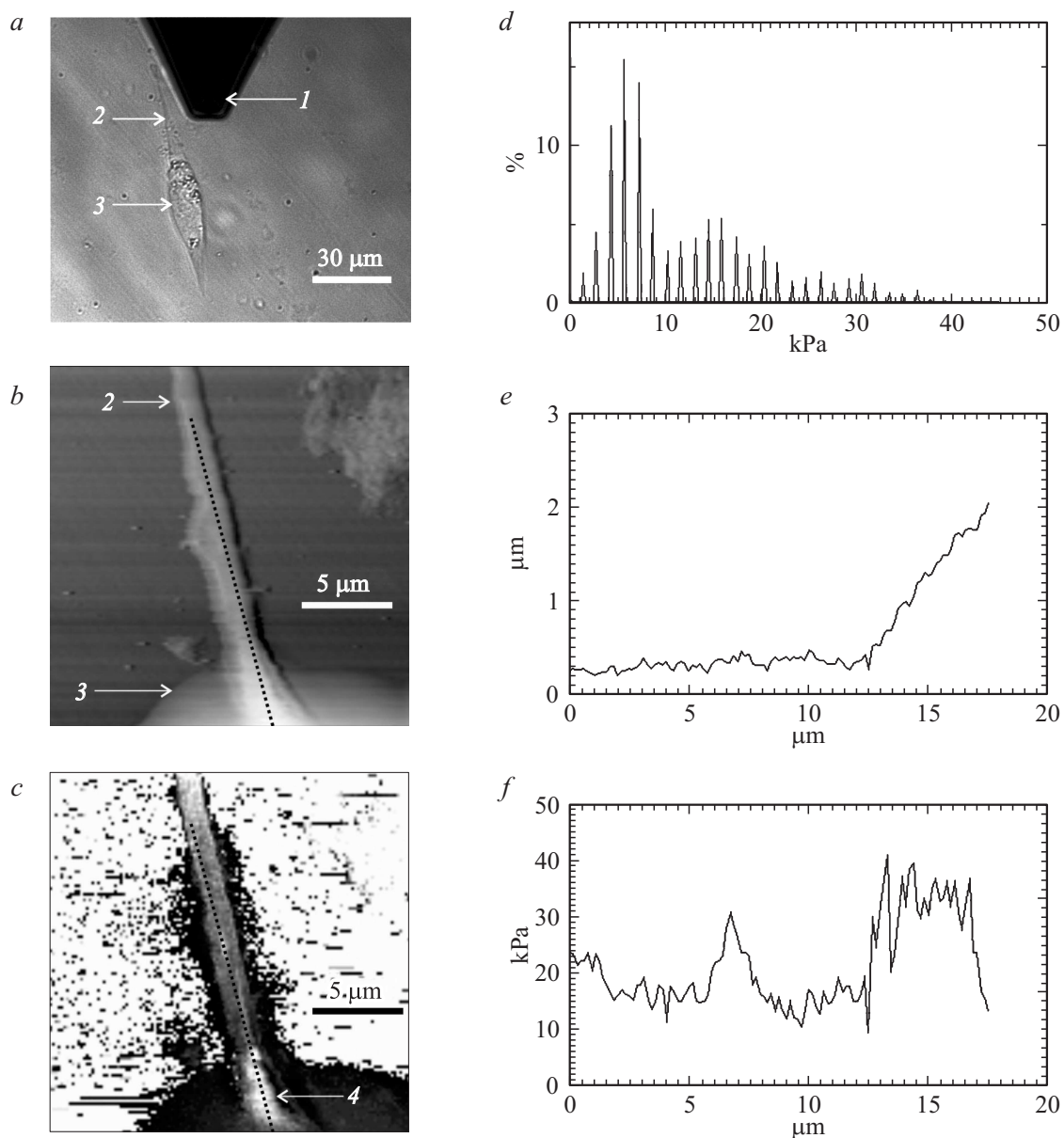
где  $F$  — сила взаимодействия между зондом и поверхностью,  $\nu$  — коэффициент Пуассона (зависящий от образца, типичные значения  $0.2$ – $0.5$ ),  $\alpha$  — половинный угол между противоположными ребрами на вершине пирамиды зонда,  $\delta$  — величина деформации.

Пример оптического изображения сенсорного нейрона, исследованного методом АСМ, приведен на рис. 1, *a*. Нейрон состоит из сомы с поперечными размерами чуть более  $10 \mu\text{m}$  и двух отростков, нейритов, идущих от нее в разные стороны и оканчивающихся конусами роста на расстоянии около  $100 \mu\text{m}$  друг от друга.

Типичный набор АСМ экспериментальных данных, характеризующих нейрон, представлен на рис. 1, *b–f*. На АСМ-топографии (рис. 1, *b*) видно, что сома возвышается приблизительно на  $3 \mu\text{m}$  по отношению к окружающей подложке. Нижняя часть сомы переходит в длинный и относительно невысокий (высота менее  $0.5 \mu\text{m}$ ) нейрит.

Клетка в изображении на рис. 1, *c* имеет более темный контраст по сравнению с заметно более жесткой подложкой. Согласно приведенным данным, модуль Юнга сомы составляет около  $5 \text{ kPa}$ , в то время как для нейрита характерно примерно  $15 \text{ kPa}$ . Кроме того, наблюдается также небольшая область повышенной жесткости с модулем Юнга на уровне  $30 \text{ kPa}$ . Важно отметить, что эта область соответствует однородному наклону рельефа клетки (см. профиль высоты на рис. 1, *e*). Следовательно, она не может быть артефактом сканирования из-за, например, вариации площади контакта зонда с клеткой на участках рельефа разного наклона. Поэтому такую область можно идентифицировать как аксонный холмик, который, как ожидается, должен быть прочнее окружения.

Всего было изучено 15 контрольных клеток и 15 нейронов, выращенных в присутствии убаина. На рис. 2 показаны топографии рельефа и одновременно полученные карты модуля Юнга для четырех клеток из каждой группы. Сравнительный визуальный анализ изображений на рис. 2, а также аналогичных данных для всех

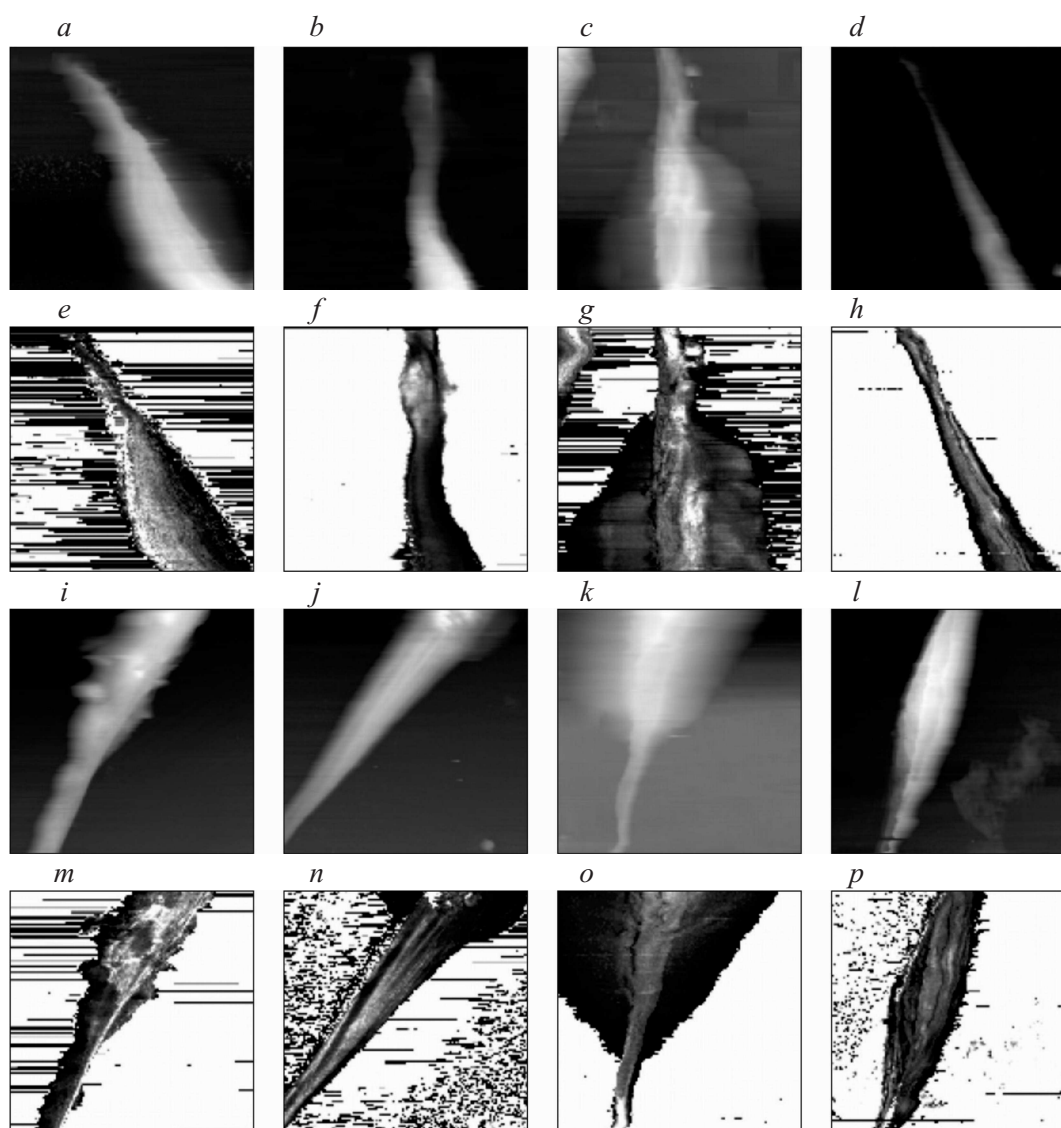


**Рис. 1.** Контрольный сенсорный нейрон. *a* — оптическое изображение; *b* — АСМ-изображение топографии поверхности, шкала серого —  $3.2\ \mu\text{m}$ ; *c* — карта распределения модуля Юнга, измеренная одновременно с *b*, шкала серого —  $35\ \text{kPa}$ ; *d* — гистограмма распределения значений модуля Юнга для отсканированной области клетки; *e* — профиль высоты вдоль линии на *b*; *f* — профиль карты распределения значений модуля Юнга вдоль линии на *c*. 1 — сома, 2 — нейрит, 3 — кончик треугольного кантилевера с острием пирамидальной формы, 4 — аксонный холмик. Среднее значение модуля Юнга внутри клетки составляет  $10 \pm 10\ \text{kPa}$ .

остальных клеток, не выявлял существенных различий в устройстве контрольных нейронов и клеток, подвергнутых обработке убаином. Кроме того, лишь на 9 клетках из 30 оказалось возможным указать положение аксонного холмика. Однако если в качестве индикатора на воздействие убаина использовать средний модуль Юнга нейрита, то различие обнаруживалось. Гистограммы распределения среднего модуля Юнга для двух групп исследованных сенсорных нейронов представлены на рис. 3. Можно заметить, что распределение для группы клеток, подвергшихся воздействию убаина, шире, чем у

контрольной группы. Кроме того, центр распределения для экспериментальной группы смещен по отношению к центру распределения контрольной приблизительно на 30%.

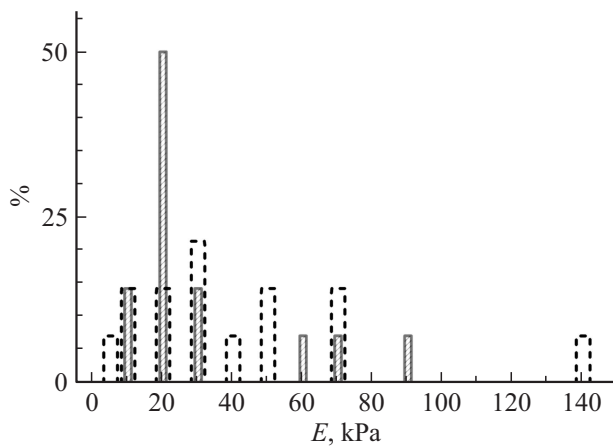
Этот результат представляется значимым. Действительно, метод АСМ позволяет исследовать живые клетки с высоким пространственным разрешением, а получаемые с его помощью данные по механическим свойствам могут проливать свет на молекулярную структуру и функционирование клеток. Например, на механические свойства нейронов влияют структура мембраны, со-



**Рис. 2.** Карты рельефа и модуля Юнга живых нейритов, измеренные в PeakForce QNM-режиме. **Контрольные клетки**, параметры пар изображений топография рельефа/модуль Юнга (размер кадра, перепад шкалы серого соответствующего сигнала): *a/e*,  $(30\ \mu\text{m})^2$ ,  $5\ \mu\text{m}/60\ \text{kPa}$ ; *b/f*,  $(30\ \mu\text{m})^2$ ,  $3.4\ \mu\text{m}/240\ \text{kPa}$ ; *c/h*,  $(30\ \mu\text{m})^2$ ,  $3.4\ \mu\text{m}/80\ \text{kPa}$ ; *d/h*,  $(20\ \mu\text{m})^2$ ,  $2.5\ \mu\text{m}/60\ \text{kPa}$ . **Клетки под воздействием уабаина:** *i/m*,  $(30\ \mu\text{m})^2$ ,  $3.1\ \mu\text{m}/130\ \text{kPa}$ ; *j/n*,  $(30\ \mu\text{m})^2$ ,  $4.2\ \mu\text{m}/100\ \text{kPa}$ ; *k/o*,  $(20\ \mu\text{m})^2$ ,  $3\ \mu\text{m}/90\ \text{kPa}$ ; *l/p*,  $(30\ \mu\text{m})^2$ ,  $3.3\ \mu\text{m}/60\ \text{kPa}$ .

ставляющие цитоскелета (микротрубочки и актиновые филаменты), а также органеллы цитоплазмы. Вследствие этого распределение модуля Юнга, полученное методом АСМ по поверхности клетки, очень неравномерно. Значения модуля упругости, опубликованные в работах [15–17], варьируются от 1 до 140 кПа. В этих экспериментах также отмечалось, что упругость тела клетки (сомы) остается постоянной приблизительно около 1 н, после чего начинает уменьшаться, показывая снижение жесткости цитоскелета клетки. Уменьшение жесткости также может наблюдаться при добавлении нейротоксинов, разрушающих структуру цитоскелета [17]. Наши измерения, как правило, занимали менее 1 н, кроме того,

мы описываем противоположный эффект — увеличение жесткости после активации трансдукторной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в мембране сенсорного нейрона. Инкубация эмбриональных клеток в присутствии уабаина в очень низких эндогенных концентрациях приводит к примерно 30%-ному увеличению значения модуля Юнга по сравнению с контрольными клетками. Из рис. 3 видно, что функция распределения значений модуля Юнга сенсорных нейронов, подвергшихся воздействию уабаина, немного сдвинута вправо в область больших значений. Это действие уабаина в эндогенных концентрациях, которые специфически активируют трансдукторную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, влияет на упругие



**Рис. 3.** Распределение значений модуля Юнга контрольных нейронов (заштрихованные столбики) и нейронов, подвергшихся воздействию уабаина (пустые штриховые столбики). Более жесткие обработанные уабаином нейроны имеют средний внутриклеточный модуль Юнга  $41 \pm 34$  kPa, в то время как контрольные нейроны демонстрируют значение  $31 \pm 23$  kPa.

свойства нейрона. Можно предположить, что активация указанного процесса вызывает в свою очередь также и усиление активности Src- и MAP-киназных систем [18]. Наши результаты показывают, что метод АСМ является многообещающим инструментом для исследования молекулярных механизмов внутриклеточной сигнализации.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования „Конфокальная микроскопия“ института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00677.

## Список литературы

- [1] Xie Z. // *Cel. Mol. Biol.* 2001. Vol. 47. P. 383–390.
- [2] Borovikova L.V., Borovikov D.V., Ermishkin V.V., Revenko S.V. // *Primar. Sensor Neuron.* 1997. Vol. 2. N 1. P. 65–75.
- [3] Gold M.S., Reichling D.B., Shuster M.J., Levine J.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. N 3. P. 1108–1112.
- [4] Krylov B.V., Derbenev A.V., Podzorova S.A., Lyudyno M.I., Kuz'min A.V., Izvarina N.L. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2000. Vol. 30. N 4. P. 431–39.
- [5] Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V. // *Med. Chem.* 2012. Vol. 8. N 1. P. 33–39.
- [6] Hamlyn J.M., Hamilton B.P., Manunta P. // *J. Hypertens.* 1996. Vol. 14. N 2. P. 151–167.
- [7] Butt H.J., Wolff E.K., Gould S.A., Dixon Northern B., Peterson C.M., Hansma P.K. // *J. Struct. Biol.* 1990. Vol. 105. N 1. P. 54–61.
- [8] Häberle W., Hörber J.K., Binnig G. // *J. Vac. Sci. Technol.* 1991. Vol. 9. P. 1210–1213.
- [9] Braet F., Rotsch C. // *Appl. Phys. A.* 1998. Vol. 66. N 1. P. 575–578.
- [10] Chen X., Feng L., Jin H., Feng S., Yu Y. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2009. Vol. 43. N 3. P. 243–251.
- [11] Domke J., Parak W.J., George M., Gaub H.E., Radmacher M. // *Eur. Biophys. J.* 1999. V. 28. N 3. P. 179–186.
- [12] Henderson E., Haydon P.G., Sakaguchi D.S. // *Science.* 1992. Vol. 257. N 5078. P. 1944–1946.
- [13] Nowakowski R., Luckham P., Winlove P. // *Biochem. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1514. N 2. P. 170–176.
- [14] Rotsch C., Radmacher M. // *Biophys. J.* 2000. Vol. 78. N 1. P. 520–535.
- [15] Spedden E., Staii C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. N 8. P. 16124–16140.
- [16] Jiang F.X., Lin D.C., Horkay F., Langrana N.A. // *Ann. Biomed. Eng.* 2011. Vol. 39. N 2. P. 706–713.
- [17] Mustata M., Ritchiea K., McNally H.A. // *J. Neurosci. Methods.* 2010. Vol. 186. N 1. P. 35–41.
- [18] Пенниайнен В.А., Ячнев И.Л., Кипенко А.В., Лопатина Е.В., Крылов Б.В. // *Сенсорные системы.* 2014. Т. 28. С. 90–94.