

УДК: 577.12.577.112.577.2

**Особенности актиновой сети цитоскелета фибробластов,
культивируемых на деформируемой подложке**
Е.В.Кот, Ю.Г.Кот

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
kate.v.kot@gmail.com*

Изучены поведение и морфология фибробластов при их культивировании на деформируемой эластичной подложке. Исследованы особенности системы актиновых микрофиламентов цитоскелета и спектр изоформ актина деформируемых фибробластов. Показано, что механическая деформация клеток приводит к интенсификации синтеза цитоплазматического актина. При этом происходит двухступенчатая реорганизация системы актиновых филаментов – уменьшение количества более протяженных и увеличение пула более коротких структур с последующим образованием стресс-волокон, направленных вдоль тела клетки. Обнаружено изменение соотношения $\beta\gamma$ -изоформ актина цитоскелета деформируемых фибробластов в сторону увеличения доли γ -изоформы. Также в цитоскелете деформируемых клеток показано присутствие α -изоформы актина, не обнаруженной в недеформируемых фибробластах.

Ключевые слова: *механическая деформация, фибробласты, цитоскелет, eGFP-актин.*

**Особливості актинової сітки цитоскелету фібробластів, культивованих на
підложці, що деформується**
К.В.Кот, Ю.Г.Кот

Досліджена поведінка та морфологія фібробластів при їх культивуванні на еластичному підложці, що деформується. Досліджені особливості системи актинових мікрофіламентів цитоскелету та спектр ізоформ актину фібробластів, що деформуються. Показано, що механічна деформація клітин призводить до інтенсифікації синтезу цитоплазматичного актину. При цьому відбувається двоступенева реорганізація сітки актинових філаментів – зменшення кількості більш протяжних і збільшення пулу коротших структур з подальшим утворенням стрес-волокон, спрямованих вздовж тіла клітини. Виявлена зміна співвідношення $\beta\gamma$ -ізоформ актину цитоскелету деформованих фібробластів у бік збільшення γ -актину. Також в цитоскелеті деформованих клітин показана наявність α -ізоформи актину, не виявленої в недеформованих фібробластах.

Ключові слова: *механічна деформація, фібробласти, цитоскелет, eGFP-актин.*

**Features of the actin cytoskeleton network of fibroblasts cultured on
deformable substrate**
K.V.Kot, Yu.G.Kot

The behavior and morphology of fibroblasts, cultured on a deformable elastic substrate, was studied. The features of cytoskeleton actin microfilaments system and actin isoforms range in deformable fibroblasts were investigated. It has been shown that the mechanical deformation of fibroblasts leads to the intensification of cytoplasmic actin synthesis. This process is accompanied by a two-step reorganization of actin filaments: reducing the number of longer structures and increasing the pool of shorter ones with subsequent formation of long stress fibers directed along the long axis of the cell. A change in the cytoskeleton $\beta\gamma$ -actin isoforms ratio in deformable fibroblasts in the direction of increasing the proportion of γ -isoform was detected. Also in the deformable cells cytoskeleton the presence of α -actin isoforms, which were not detected in nondeformable fibroblasts, was shown.

Key words: *mechanical deformation, fibroblasts, cytoskeleton, GFP-actin.*

Введение

Способность к направленному передвижению и поддержанию поляризованной формы является фундаментальным свойством фибробластов различного происхождения. На движении клеток основаны многие процессы в организме: морфогенетические миграции во время эмбрионального развития, движение фибробластов в процессе заживления раны (Ridley, 2004). Процесс движения клетки является объектом изучения многих исследователей, показавших, что способность клетки к передвижению и поляризации обеспечивается ее цитоскелетом, в частности – системой актиновых филаментов (Carlier, 2010). Благодаря динамике цитоскелета фибробласт может менять форму и

направление движений в ответ на изменения факторов окружающей клетки среды – концентрации биологически активных веществ в культуральной среде, характера и свойств подложки. Эти факторы считаются приоритетными модулирующими факторами. Однако помимо этих широко изучаемых влияний, существует еще один важный регулирующий стимул, действующий на фибробласты со стороны их окружения – это механическое напряжение, присутствующее во всех тканях, где фибробласты являются главным или одним из главных клеточных элементов. Чтобы понять роль внешних механических стимулов в механизмах морфогенеза и адаптации этих тканей к нагрузкам, необходимо исследовать поведение фибробластов и организацию их цитоскелета в культуре в условиях внешней механической нагрузки.

В работе были поставлены следующие задачи:

- Проанализировать прижизненное поведение фибробластов и изменения их морфологии при культивировании на деформируемой эластичной подложке.
- Исследовать прижизненную пространственную организацию системы актиновых микрофиламентов при культивировании на деформируемой эластичной подложке.
- Оценить спектр изоформ актина в деформируемых и недеформируемых клетках.

Объект и методы исследования

Культура фибробластов. В работе использовали фибробласты легкого крыс 2-недельного возраста. Получение первичной культуры и субкультивирование проводили согласно (Rittié, Fisher, 2005). Нарботанные клетки на 2-м пассаже замораживали в растворе, содержащем 70% DMEM, 20% FBS и 10% DMSO (Freshney, 2010).

Деформация клеток. Для эксперимента клетки размораживали (Phelan, 1998) и высевали на эластичную подложку. После распластывания клеток на подложке (16 час культивирования) ее подвергали механическому растяжению моноаксиального характера. Подложка (20×15×0,02 мм) представляла собой эластичную пленку из органосовместимого прозрачного латекса (Cláudia et al., 2006; Vendra et al., 2010) с адгезивным покрытием из коллагена и гиалуроната (Hwal Sun, Jong-Eun Lee, 2002). Растяжение подложки с клетками проводили на специально сконструированной установке, поддерживающей в автоматическом режиме параметры культивирования. Условия культивирования клеток на подложке аналогичны условиям субкультивирования (DMEM-10% FBS, 37°C, 95% влажности, 5% CO₂). Удлинение подложки составляло 0,1% ее длины.

Визуализация клеток и актина. Морфологию клеток оценивали фазово-контрастной микроскопией. За организацией системы актиновых микрофиламентов фибробластов прижизненно наблюдали с помощью флуоресцентной микроскопии после eGFP-актинспецифичной трансфекции (eGFP-Effectene Transfection Reagent, QIAGEN (США), эмиссия 495–509 нм, возбуждение 395 нм). По интенсивности флуоресценции eGFP-актина судили об уровне экспрессии актина в фибробластах (Ballestrem et al., 1998; Small et al., 1999). По полученным флуоресцентным фотографиям после их цифровой обработки при помощи программы Image J 1.45s оценивали пространственное расположение и площадь системы актиновых филаментов, а также проводили измерения длин визуально четких обособленных актиновых элементов цитоскелета и строили распределения по диапазонам их длин.

Выделение актина из клеток. Выделение тотального актина из клеток, снятых с подложки (9×10⁶), проводили после их лизиса, как описано в работе (Sakiyama et al., 1981) методом аффинной колоночной хроматографии на DNase-I-агарозе (Pharmacia). Затем проводили дополнительную очистку элюатов на Sephadex G-50 fine (Pharmacia, предел эксклюзии 30 кД). Далее проводили осаждение полимеров ацетоном и их лиофилизирование. Полученный лиофилизат использовали для определения соотношения изоформ актина методом изоэлектрического фокусирования.

Изоэлектрическое фокусирование. Изоэлектрическое фокусирование проводили по методу (Изоэлектрофокусирование ...) в капиллярах (17×0,15 см), заполненных 10% полиакриламидным гелем с градиентом pH 10–3 (амфолиты Bio-Rad). В лунку геля (0,5×0,1 см) помещали 0,21 мкг лиофилизата, суспендированного в 15 мкл солюбилизирующего буфера (Rubenstein, 1977). Изоэлектрофокусировку проводили 12 ч – при 300В и 4 ч – при 600 В. Затем гели окрашивали кумасси голубым. Окрашенные гели сканировали и проводили анализ с помощью пакета программ TotalLab 2.01.

Статистика. Расчет среднего и его доверительного интервала (M±m) проводили, используя пакет программ Statistica for Windows.

Результаты и обсуждение

Фибробласты, посеянные на недеформируемой эластичной подложке, через 2 часа начинали процесс радиального распластывания (рис. 1). Они имели дисковидную неполяризованную форму. Их

актиновые фибриллы были представлены кольцевым пучком, ассоциированным с крупными зонами концентрации актина (скорее всего, фокальными контактами, ориентированными радиально). К 6 часам культивирования клетки по всему периметру формировали псевдоподии, кольцевой пучок актина постепенно замещался продольно-параллельными пучками актиновых фибрилл. На 10–12 час культивирования клетки начинали мигрировать по подложке. Эти клетки представляют собой «классические фибробласты». Они хорошо поляризованы и имеют четко различимые активные и стабильные края (рис. 1).

На рис. 1. хорошо видно, что на 6 час культивирования, помимо образования продольных пучков актиновых филаментов, происходит формирование двух центров концентрации актина, соответствующих образующимся в дальнейшем (10 час) полюсам клетки. Центр концентрации (полимеризации) актина сдвигается по мере выдвигания ведущего активного края – ламеллы (12 час культивирования). При этом актиновые пучки становились мощными и протяженными и были направлены вдоль длинной оси клетки.

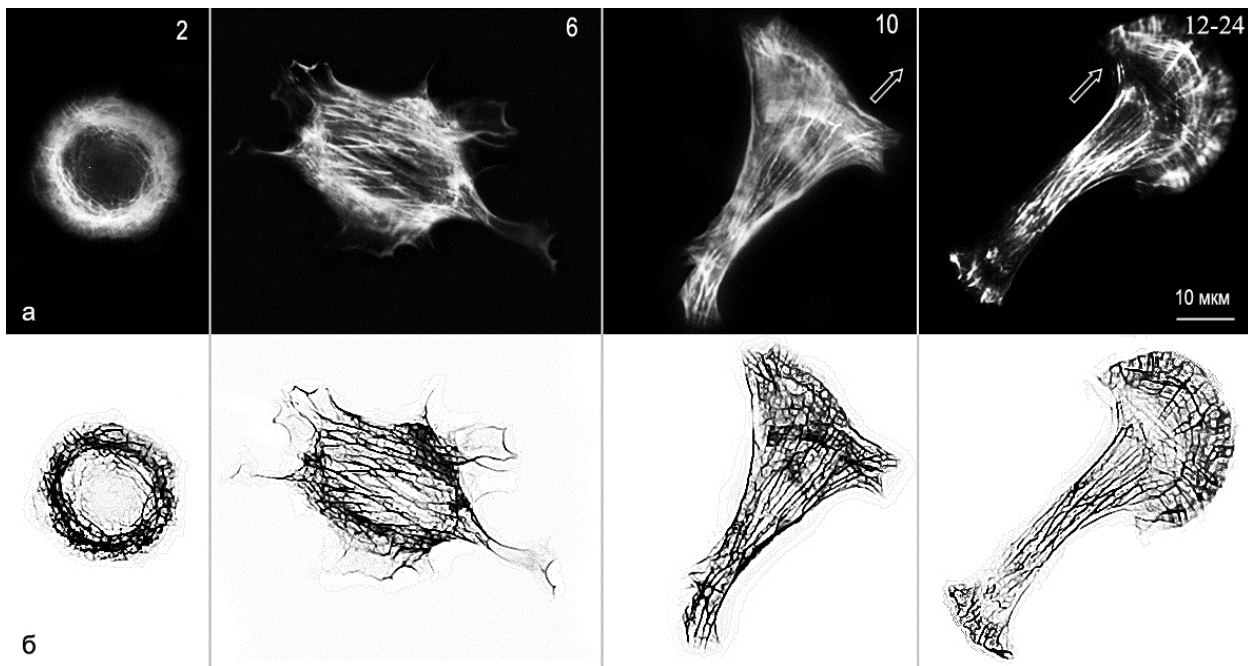


Рис. 1. Распластывание и поляризация фибробластов на недеформируемой подложке, а также организация сети их актиновых филаментов

Примечания: цифрами указаны часы культивирования (время от посева клеток). Стрелкой указано направление перемещения клеток. Флуоресцентная микроскопия (а) и фазово-контурное контрастирование (б), ×1600

Растяжение подложки (16 час культивирования) с распластавшимися и мигрирующими на ней клетками вызвало активную миграцию клеток. Через 6 часов после деформации подложки фибробласты стали ориентированными по линии приложенной силы (рис. 2).

Характер образования ведущего края (ламеллообразующая активность) деформируемых клеток был несколько иным, чем у недеформированных клеток. Через 2–3 часа после деформации подложки ламеллообразующая активность не распространялась на весь ведущий край (полюс) клетки, а начинали формироваться длинные отростки с ламеллоподиями. По мере подтягивания тела клетки «ведущая зона» деформированных клеток увеличивалась, при этом активный край занимал до 70% общего периметра клетки (20 час культивирования), в то время как у недеформированных поляризованных клеток эта зона занимала не более 45–50%. При этом визуально количество продольно-параллельных стресс-фибрилл уменьшалось, а их локализация ограничивалась задним «неактивным» краем клетки.

Через 4 часа (22 час культивирования) миграция клеток останавливается, краевая активность и точки (центры) концентрации актина распространяются на весь периметр клетки, однако это перераспределение неравномерно, формируется два активных ведущих края. Формируются параллельные актиновые тяжи вдоль тела клетки. Но кроме этих филаментов, перпендикулярных

активным краям клетки, формируются параллельные им тяжи, локализованные как в активных краях, так и в теле клетки. В течение последующих 2-х часов происходит окончательное образование ведущих и неактивных краев, и на 24 час культивирования формируются биполярно активные клетки. Их система актиновых элементов цитоскелета характеризуется мощными актиновыми тяжами вдоль всего тела клетки.

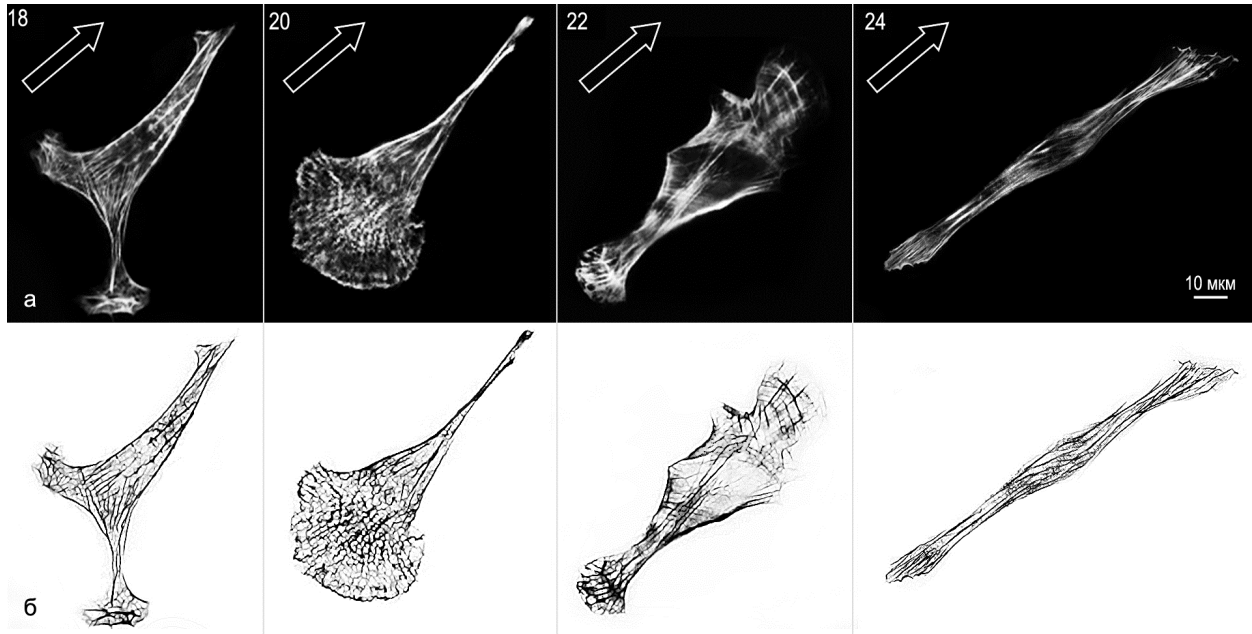


Рис. 2. Изменения формы и организации системы актиновых микрофиламентов цитоскелета фибробластов при растяжении подложки

Примечания: цифрами указаны часы культивирования (время от посева клеток). Стрелкой указано направление растяжения (удлинения) подложки. Флуоресцентная микроскопия (а) и фазово-контурное контрастирование (б), $\times 1600$

В табл. 1 приведены результаты морфометрического анализа контура проекции клеток и системы их актиновых филаментов. Поскольку все изображения клеток были получены при равных условиях и используемые величины были относительны, значения, выраженные в пикселях, не переводили в традиционные единицы измерения.

Таблица 1. Морфометрический анализ клеток, культивируемых на недеформируемой и деформируемой подложке

	Состояние подложки				
	Без деформации	Деформация			
Время культивирования, часы	10–24	18	20	22	24
S_k , площадь клетки, пикс. $\times 10^3$	12,3 \pm 0,3 – 13,4 \pm 0,3	11,8 \pm 0,4	17,1 \pm 0,5*	18,4 \pm 0,5*	17,6 \pm 0,4*
S_a , площадь, занимаемая актином, пикс. $\times 10^3$	2,6 \pm 0,3 – 3,1 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2*	5,1 \pm 0,3*	5,4 \pm 0,3*	5,3 \pm 0,3*
S_a/S_k	0,21–0,23	0,31	0,30	0,29	0,30
Интенсивность флуоресценции, отн.ед./клетку	1,4 \pm 0,1 – 1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2*	3,0 \pm 0,1*	2,8 \pm 0,2*

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) относительно отсутствия деформации.

Площадь проекции на подложку клеток, подвергнутых деформации, увеличивается. При этом увеличивается как площадь, занимаемая в них актиновым компонентом цитоскелета, так и интенсивность флуоресценции актина, что свидетельствует об интенсификации его синтеза в деформируемых клетках. Кроме визуального наблюдения реорганизации системы актиновых фибрилл, были построены распределения по их длинам (рис. 3).

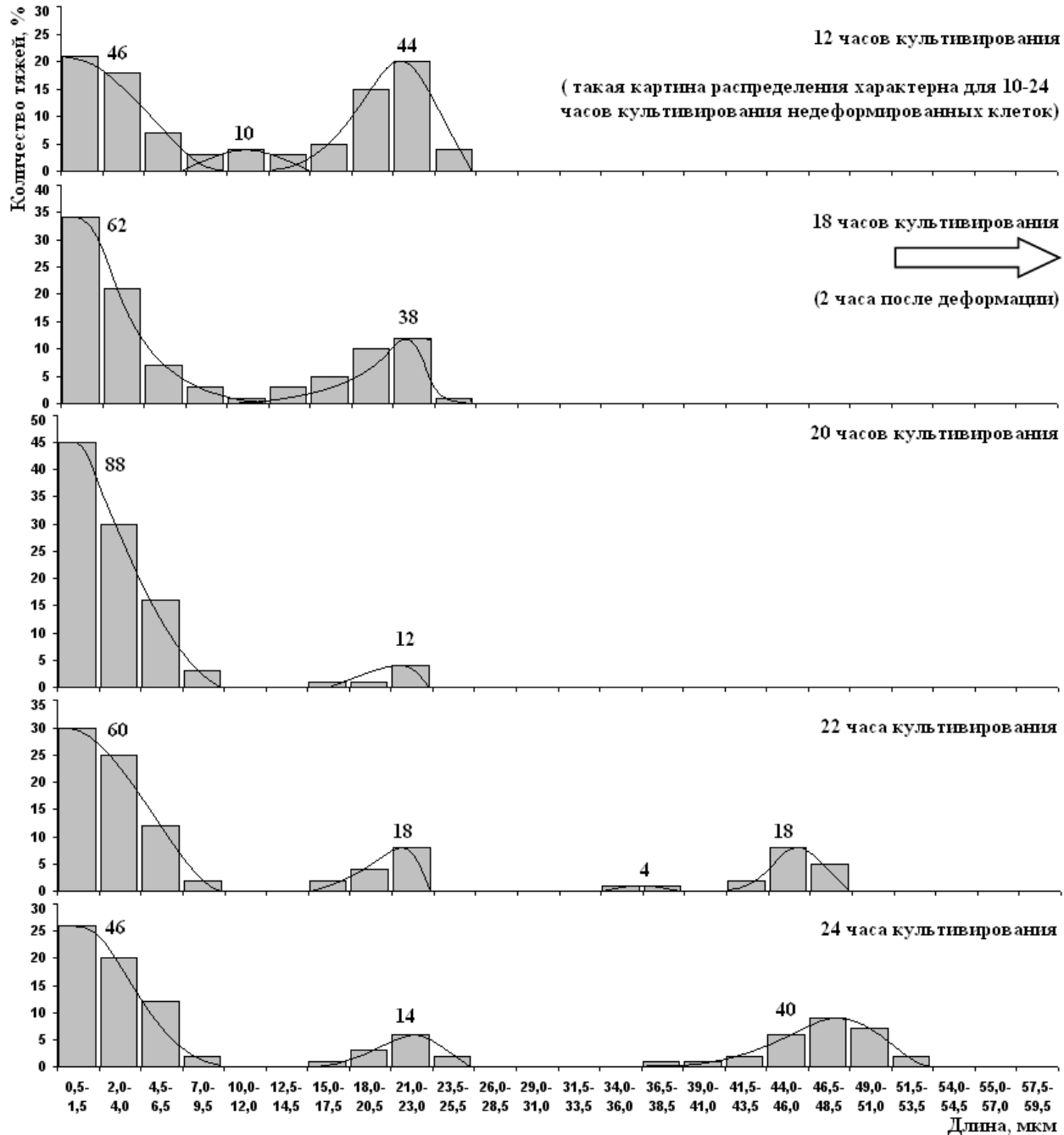


Рис. 3. Распределение актиновых тяжей по их длинам

Примечание: числа над пиками – доля соответствующего пика (%) от общего числа (100%) актиновых структур.

Видно, что реорганизация системы актиновых филаментов проходит в два этапа – сначала происходит уменьшение количества более протяженных и увеличение пула более коротких структур, а затем увеличение количества более длинных тяжей актина.

В связи с наблюдаемыми перестройками в актиновой сети цитоскелета представляет интерес исследовать спектр изоформ актина в деформированных фибробластах. На рис. 4 приведены изоэлектрофореграммы изоформ актина фибробластов, а в табл. 2 – данные их численной обработки.

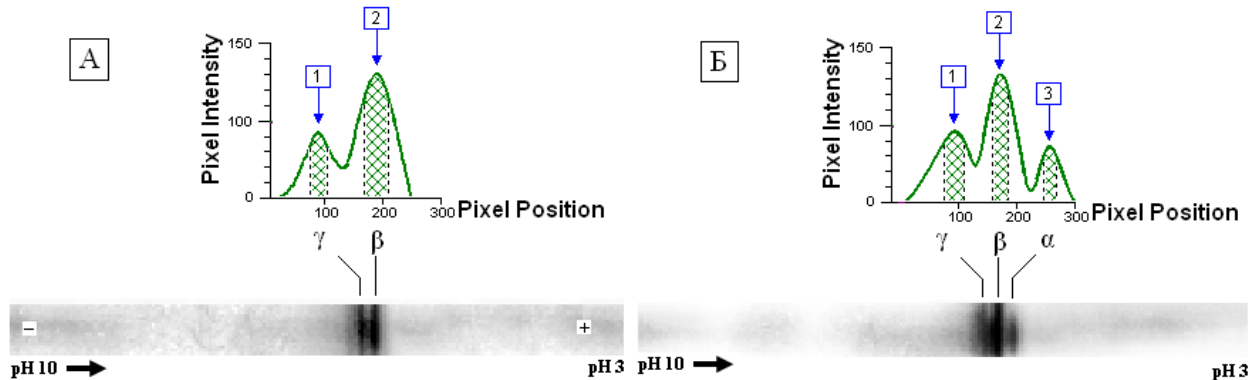


Рис. 4. Изоэлектрофореграмма актина (0,21 мкг в пробе) недеформированных (А) и деформированных (Б) фибробластов (22 час культивирования)

Актин недеформированных фибробластов, используемых в работе, представлен 2-мя изоформами – β и γ , соотношение между которыми составляет 2,7. Этот соответствует литературным данным, приводимым рядом авторов (Хайтлина, 2007) для немышечных клеток млекопитающих (1,7–2,9). На электрофореграмме актина деформируемых фибробластов, кроме β - и γ -полос, присутствует еще одна полоса, смещенная в область кислых рН, соответствующая положению α -изоформы актина (Rubenstein, 1977).

Таблица 2.

Данные анализа изоэлектрофореграмм актина клеток, культивируемых на недеформируемой и деформированной подложке

	Пик	Изоформа	Площадь пика, пикс. $\times 10^3$	Общая площадь, пикс. $\times 10^3$	β/γ
Без деформации	1	γ	$1,52 \pm 0,01$	5,6	2,7
	2	β	$4,10 \pm 0,02$		
Деформация	1	γ	$2,03 \pm 0,01^*$	5,6	1,6
	2	β	$3,26 \pm 0,02^*$		
	3	α	$0,41 \pm 0,01$		

*Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) относительно отсутствия деформации.*

В принципе, α -изоформа актина не характерна для дифференцированных немышечных клеток, в которых основными изоформами являются β - и γ -актины, соотношение между которыми поддерживается на постоянном уровне, и основной является регуляция их пространственного распределения. Однако, существуют работы (Tomasek et al., 2002; Wang, 2003), в которых показана именно механоиндуцированная дифференцировка эмбриональных и зрелых фибробластов в миофибробласты, для которых характерно наличие α -изоформа актина. Как обсуждалось выше, деформация фибробластов приводит к образованию мощных актиновых пучков, направленных вдоль тела клетки, – по-видимому, стресс-фибрилл. Это предположение может быть подтверждено присутствием более высокой доли γ -изоформы актина в клетках, подвергнутых деформации (55%), по сравнению с недеформированными фибробластами (26%), так как именно стресс-фибриллы считают основным местом локализации γ -изоформы цитоплазматического актина (Хайтлина, 2007).

Таким образом, ранним ответом фибробластов на действие деформации является изменение метаболизма, которое приводит к реорганизации сетки актина и его состава в цитоскелете и образованию протяженных актиновых стресс-фибрилл, ориентированных вдоль стабильного края клетки.

Список литературы

- Изоэлектрофокусирование. Протокол. [Электронный документ]. (<http://195.178.207.228/work/FILES/19/2D-PAGE.pdf>) /Izoelektrofokusirovaniye. Protokol. [Elektronnyy dokument]./ Хайтлина С.Ю. Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке // Цитология. – 2007. – Т.49, №5. – 348с. /Khaytlina S.Yu. Mekhanizmy segregatsii izoform aktina v kletke // Tsitologiya. – 2007. – Т.49, №5. – 348s./
- Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Imhof B. Actin dynamics in living mammalian cells // Journal of Cell Science. – 1998. – №111. – P. 1649–1658.
- Carlier M.-F. Actin-based motility: cellular, molecular and physical aspects. – Springer, 2010. – P. 97–121.
- Cláudia A.C., Lamano-Carvalho T.L., Lacerda S.A. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats // Journal of Oral Science. – 2006. – Vol.48, №4. – P. 201–205.
- Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized. – Wiley-Blackwell Inc., 2010. – P.163.
- Hwal Sun, Jong-Eun Lee Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix // Yonsei Medical Journal. – 2002. – Vol.43, №2. – P. 193–202.
- Phelan M.C. Basic techniques for mammalian cell tissue culture // In: Current protocols in cell biology. – John Wiley & Sons Inc., 1998. – P. 82–83.
- Ridley A. Cell motility: from molecules to organisms. – Wiley Press, 2004. – P.13–16.
- Rittié L., Fisher G.J. Isolation and culture of skin fibroblasts // Methods in Molecular Medicine. – 2005. – Vol.117. – P. 83–98.
- Rubenstein P. Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol.74, №1. – P.120.
- Sakiyama S., Fujimura S., Sakiyama H. Absence of γ -actin expression in the mouse fibroblast cell line // JBC. – 1981. –Vol.256, №1. – P.31.
- Small J., Rottner K., Hahne P., Anderson K. Visualizing the actin cytoskeleton // Microscopy research and technique. – 1999. – №47. – P. 3–17.
- Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B. et al. Myofibroblast and mechanoregulation of connective tissue remodeling // Molecular Cell Biology. – 2002. – Vol.3. – P.352.
- Venkat K.Vendra, Lin Wu, Sitaraman Krishnan. Polymer thin films for biomedical application // Nanomaterials for the Life Sciences. – 2010. – Vol.5. – P. 122–134.
- Wang J. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts // Am. J. Physiol. – 2003. – Vol.285, №5. – H1871–H1881.

Представлено: Т.В.Горбач / Presented by: T.V.Gorbach

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 07.11.2011