

УДК: 577.12.577.112.577.2

Связь между вынужденными колебаниями интегринов, степенью полимеризации актина цитоскелета и содержанием свободного Ca^{2+} фибробластов**Е.В.Кот, Ю.Г.Кот, К.В.Седова, Е.Э.Перский***Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
kate.v.kot@gmail.com*

На модели вынужденных циклических колебаний $\alpha(2)\beta(1)$ -интегринов с использованием интегрин-специфических магнитных микрочастиц, которые после связывания с клетками подвергали воздействию магнитного поля, изучено влияние колебаний интегринов на содержание внутриклеточного кальция в условиях нативной сети актиновых микрофиламентов и при их деполімеризации. Показано, что $\alpha(2)\beta(1)$ -интегрины принимают участие в ответе фибробластов на действие механической деформации, активируя депозависимый выход кальция в цитоплазму клеток. При этом в реализации такого ответа через эти рецепторы задействованы актиновые микрофиламенты цитоскелета, целостность которых необходима для нормального функционирования депозависимого механизма выхода Ca^{2+} в цитоплазму деформируемых фибробластов.

Ключевые слова: *механическая деформация, фибробласты, интегрины, актин, кальций.*

Зв'язок між вимушеними коливаннями інтегринів, ступенем полімеризації актину цитоскелету та вмістом вільного Ca^{2+} фібробластів**К.В.Кот, Ю.Г.Кот, К.В.Сєдова, Є.Е.Перський**

На моделі вимушених циклічних коливань $\alpha(2)\beta(1)$ -інтегринів з використанням інтегрин-специфічних магнітних мікрочасток, котрі після зв'язування з клітинами піддавали дії магнітного поля, вивчено вплив коливань інтегринів на вміст внутрішньоклітинного кальцію в умовах нативної сітки актинових мікрофіламентів та при їх деполімеризації. Показано, що $\alpha(2)\beta(1)$ -інтегрини беруть участь у відповіді фібробластів на дію механічної деформації, активуючи депозалежний вихід кальцію в цитоплазму клітини. При цьому в реалізації такої відповіді через ці рецептори беруть участь актинові мікрофіламенти цитоскелету, цілісність яких необхідна для нормального функціонування депозалежного механізму виходу Ca^{2+} у цитоплазму деформованих фібробластів.

Ключові слова: *механічна деформація, фібробласти, інтегрини, актин, кальцій.*

Connection between integrins forced fluctuations, the degree of cytoskeleton actin polymerization and the content of free Ca^{2+} in fibroblasts**K.V.Kot, Yu.G.Kot, K.V.Sedova, Ye.E.Persky**

The integrins fluctuations influence on intracellular calcium in conditions of native actin microfilaments network and when they are depolymerized was studied on a model of $\alpha(2)\beta(1)$ -integrins forced cyclic fluctuations with the use of integrin-specific magnetic microparticles, that were exposed to magnetic field after binding to cells. It has been shown that $\alpha(2)\beta(1)$ -integrins are involved in the response of fibroblasts to the action of mechanical deformation, activating depot-dependent entry of calcium into cytoplasm. At the same time in realization of such a response through these receptors cytoskeletal actin microfilaments whose integrity is essential for normal functioning of the depot-dependent mechanism of Ca^{2+} entry in cytoplasm of deformable fibroblasts are involved.

Key words: *mechanical deformation, fibroblasts, integrins, actin, calcium.*

Введение

На настоящее время устройство цепи передачи сигнала о механическом напряжении от места приложения силы к синтетическому аппарату клеток практически не известно. Естественно, что эта цепь должна включать в себя звенья, связанные с мембраной и в цитоплазме.

В работе (Кот, Кот, 2011) было показано, что деформация фибробластов под действием внешнего механического напряжения приводит к изменениям синтеза внутриклеточного актина, содержания его изоформ и степени полимеризации.

Известно, что важнейшую роль в сигнальной трансдукции клеток млекопитающих играет связка интегрины-актин-кальций (Juliano, 2002).

Универсальность этих звеньев в качестве модулирующих элементов меж- и внутриклеточного сигналинга делают эту связку наиболее реальным претендентом на участие и в механозависимом ответе клетки.

Целью данной работы было изучение на примере фибробластов связи между степенью полимеризации актиновых фибрилл цитоскелета и содержанием свободного внутриклеточного кальция при искусственно вызванных деформациях $\alpha(2)\beta(1)$ -интегринов – одних из самых распространенных адгезионных рецепторов мембраны этих клеток.

Для её достижения была разработана модель вынужденных циклических колебаний рецепторов мембраны фибробластов – $\alpha(2)\beta(1)$ -интегринов, пригодная для непосредственного наблюдения за ответом клеток. На этой модели было изучено влияние колебаний интегринов на содержание внутриклеточного кальция в условиях нативной сети актиновых микрофиламентов и при их деполимеризации.

Методы исследования

Культура фибробластов. В работе использовались фибробласты легкого крыс 2-недельного возраста. Получение первичной культуры и субкультивирование проводили согласно (Rittié, Fisher, 2005). Нароботанные клетки на 2-м пассаже замораживали в растворе, содержащем 70% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 20% (FBS Fetal bovine serum) и 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Freshney, 2010). Для эксперимента клетки размораживали (Phelan, 1998) и вводили в эксперимент.

Модель вынужденных циклических колебаний интегринов, позволяющая подвергать их механическому напряжению. Механическую деформацию интегринов проводили при помощи интегрин-специфичных магнитных микрочастиц, которые после связывания с клетками подвергали циклическим колебаниям в магнитном поле на специально сконструированной установке.

Магнитные микрочастицы (chemicell SiMAG particles – см. ссылку: Материалы 1) представляют собой частицы из оксида железа диаметром 1 мкм, инкапсулированные в оболочку из золота и являющиеся суперпарамагнетиками во избежание эффекта остаточного намагничивания. Для работы частицы поставлялись с покрытием из белка А, предназначенного для иммобилизации антител, в том числе и на $\alpha(2)\beta(1)$ -интегрины, использованные в работе. Иммобилизацию антител проводили согласно протоколу (см. ссылку: Протокол 1). В работе были использованы антитела Rat Anti-Integrin $\alpha2\beta1$ Antibody Chemicell (Millipore – см. ссылку: Материалы 2).

Принцип конструкции установки для деформации интегринов под действием циклического магнитного поля на основе 6-луночного планшета для визуализации клеток NanoECM™ (см. ссылку: Материалы 3) показан на рис. 1.

Клетки высевались в лунку 1. После образования монослоя с плотностью 75–85 % добавляли интегрин-специфичные магнитные частицы и инкубировали 3 часа (бессывороточная среда Quantum-333, 37°C, 95% влажности, 5% CO₂). Затем монослой клеток дважды промывали культуральной средой для удаления не связавшихся с их мембраной частиц.

Магнитные частицы, прикрепленные к интегринам (рис. 2), подвергали циклическим колебаниям магнитным полем, которое создавали в лунке с культурой при помощи двух электромагнитов (Magnetic Sensor Systems, 0,25 мТ – см. ссылку: Материалы 4), расположенных, как показано на рис. 1. Электромагниты включались поочередно по 4 раза каждый. Период и частота колебаний магнитного поля составляли 350 миллисекунд и $2,8 \times 10^{-3}$ Гц соответственно. Общее время влияния магнитного поля – 1,4 с. Во время работы магнитов микрочастица совершала круговое колебательное движение с максимальным отклонением приблизительно на 1–1,5 мкм, как показано на рис. 3.

Исследование содержания внутриклеточного кальция. Перед деформацией монослой клеток инкубировали 30 мин в культуральной среде, содержащей 20 мМ флуоресцентного зонда специфичного к Ca²⁺, – Fluo3-AM. Инкубацию проводили в темноте с последующей отмывкой от красителя согласно (см. ссылку: Протокол 2). О содержании внутриклеточного кальция судили по интенсивности флуоресценции, наблюдаемой в флуоресцентном микроскопе (Carl Zeiss Telaval, возбуждающий лазер – $\lambda=473$ нм, эмиссия $\lambda=530$ нм) и флуоресцентного сканирования dna лунки с

монослоем клеток на микропланшетном флуориметре Bio-Tek FL600 (возбуждение – $\lambda=488$ нм, эмиссия – $\lambda=530$ нм). Интенсивность флуоресценции выражали в относительных единицах флуоресценции – r.f.u. (relative fluorescence units). В случае сканирования лунки в флуориметр предварительно помещалась планшет-установка с установленной временной задержкой включения магнитов, для чего в конструкции был предусмотрен таймер (рис. 1).

Деполимеризация актина. В эксперименте по изучению влияния степени полимеризации актина на содержание кальция в деформированных клетках за сутки до деформации в лунку с культурой вносили цитохалазин Д (10 мкг на мл среды) и инкубировали 24 часа (37°C , 10% CO_2). В использованной концентрации цитохалазин Д вызывает деполимеризацию актиновых филаментов цитоскелета (Schliwa, 1982). Для наблюдения за системой актиновых микрофиламентов в присутствии цитохалазина Д одновременно с посевом клеток в опытную лунку проводили посев клеток в контрольный планшет для дальнейшей фиксации и обработки моноклональными FITC-конъюгированными антителами на β -актин согласно протоколу (см. ссылку: Протокол 3).

Результаты и обсуждение

Общее время наблюдения культуры без и после воздействия составляло 1,5 часа. При этом за все время исследования содержание внутриклеточного кальция не изменяется в культуре, не подверженной действию магнитного поля. На рис. 4–5 видно, что механическая деформация интегринів, в условиях нативного цитоскелета с развитой системой актиновых фибрилл (рис. 5), приводит к увеличению содержания внутриклеточного кальция, проявляющегося в увеличении флуоресценции в 1,3 раза на 4 с после начала деформации по сравнению клетками до деформации (0 с).

Такое увеличение содержания ионов кальция внутри клетки, по-видимому, происходит за счет их высвобождения из внутриклеточных депо, связанных с саркоплазматическим ретикулумом. В дальнейшем интенсивность флуоресценции продолжает расти, достигая максимума на 10 с после начала деформации (увеличение в 2,1 раза), после чего начинает снижаться. Это может быть связано с активацией обратного транспорта Ca^{2+} из цитоплазмы АТФазами. На 20 с наблюдения флуоресценция остается увеличенной в 1,3 раза и снижается, достигая исходного уровня, только на 60–65 минуте наблюдения.

Деполимеризация актиновых фибрилл цитоскелета (рис. 6) приводит к менее выраженному депозависимому выходу кальция в цитоплазму клеток при механическом «раздражении» интегринів. Максимальное увеличение флуоресценции в 1,6 раза наблюдается на более поздних сроках (12 с). При этом возврат к исходному уровню флуоресценции наблюдается на 17 с после деформации. Таким образом, цитохалазин Д, как агент, нарушающий структуру актиновых микрофиламентов, значительно подавляет депозависимый выход кальция при деформации интегринів. Однако незначительное, но всё же увеличение содержания кальция внутри деформированной клетки с деполимеризованным актином, может указывать на то, что существует не единственный путь механозависимой активации внутриклеточных депо кальция, который не ингибируется полностью нарушением целостности актиновых фибрилл цитоскелета.

Анализ литературы показывает (Крутецкая и др., 2001; Berridge et al., 2000), что такая модель работает в случае активации кальциевых депо химическими агентами. Так, например, у макрофагов агенты, нарушающие структуру микротрубочек (винбластин, колхицин и колцемид) и актиновых микрофиламентов (цитохалазины и фаллоидин), существенно уменьшают фазу мобилизации Ca^{2+} из депо и практически полностью подавляют депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином. В то же время эти соединения не влияют на вызываемую АТФ или УТФ мобилизацию Ca^{2+} из депо, что свидетельствует о том, что освобождение Ca^{2+} из депо с участием фосфоинозитидной системы остается без изменений. Возможно, что подобный механизм имеет место и в случае ответа фибробластов на действие механического напряжения.

Выводы

1. $\alpha(2)\beta(1)$ -интегрины принимают участие в ответе фибробластов на действие механической деформации, активируя депозависимый вход кальция в клетки.
2. В реализации такого ответа через эти рецепторы задействованы актиновые микрофиламенты цитоскелета.

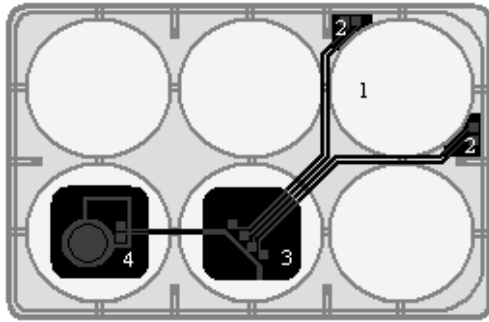


Рис.1. Принцип установки.
 1 – лунка с культурой клеток.
 2 – электромагниты (0,25мТ).
 3 – блок микросхем управления магнитами.
 4 – батарея и таймер электропитания.

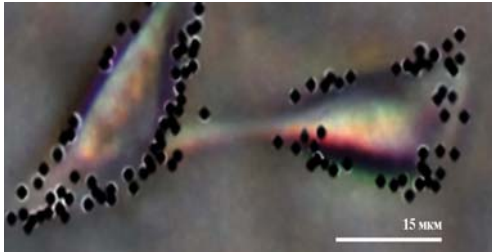


Рис. 2. Магнитные частицы, ассоциированные с интегринами на поверхности мембраны фибробластов. Фазово-контрастная микроскопия. ×800.

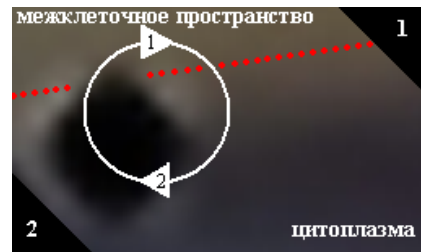


Рис. 3. Траектория колебания* магнитной микрочастицы при поочередном (1→2) включении магнитов 1 и 2.
 - граница тела клетки

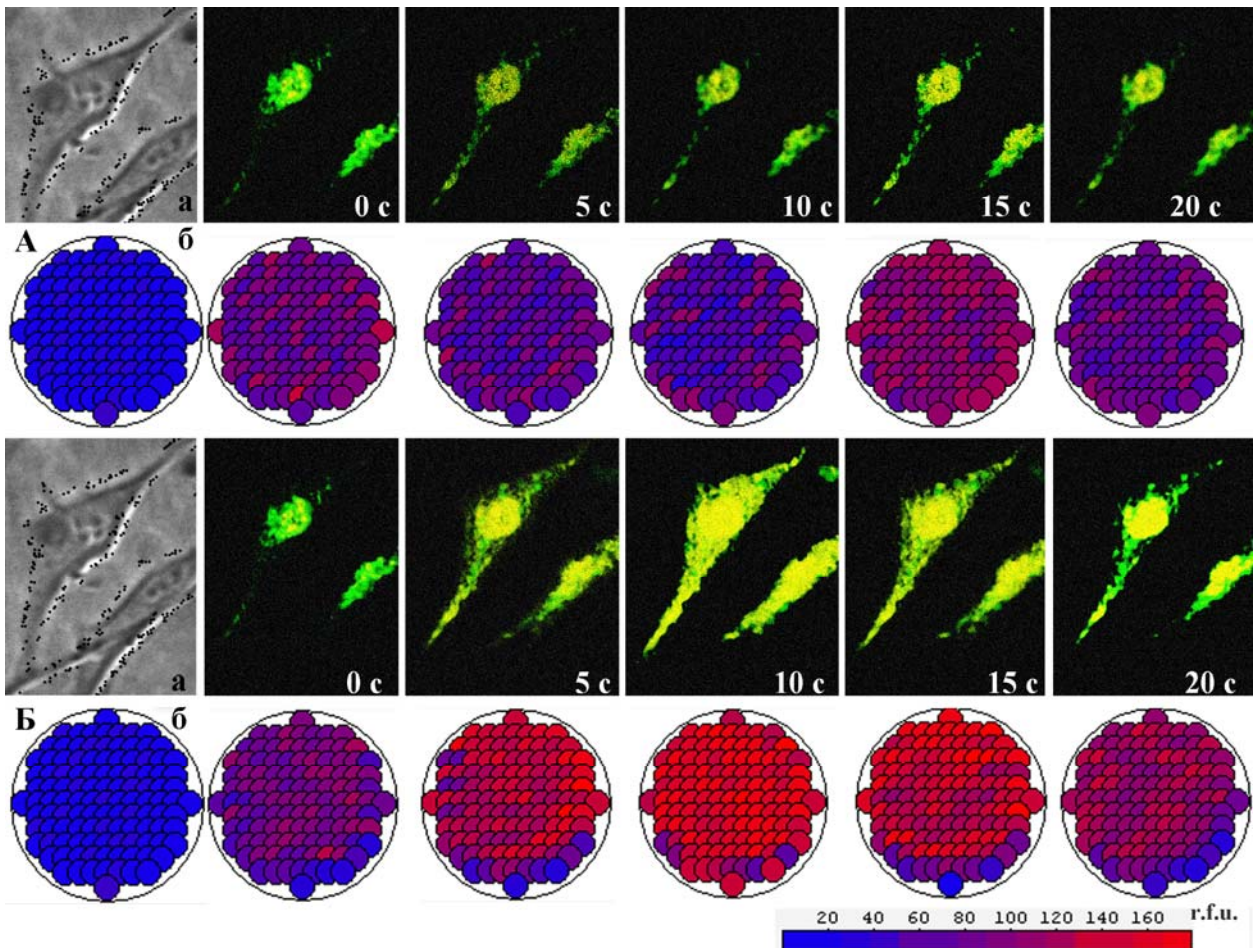


Рис. 4. Изменение содержания внутриклеточного кальция фибробластов без (А) и при колебании интегрinov (Б) изученное при помощи флуоресцентной микроскопии и флуоресцентного сканирования культуры с использованием кальций-специфического красителя Fluo3-AM. Обозначения: а – фазово-контрастное фото клеток с интегрин-ассоциированными магнитными частицами, б – контрольное сканирование лунки без культуры, r.f.u. – относительные единицы флуоресценции.

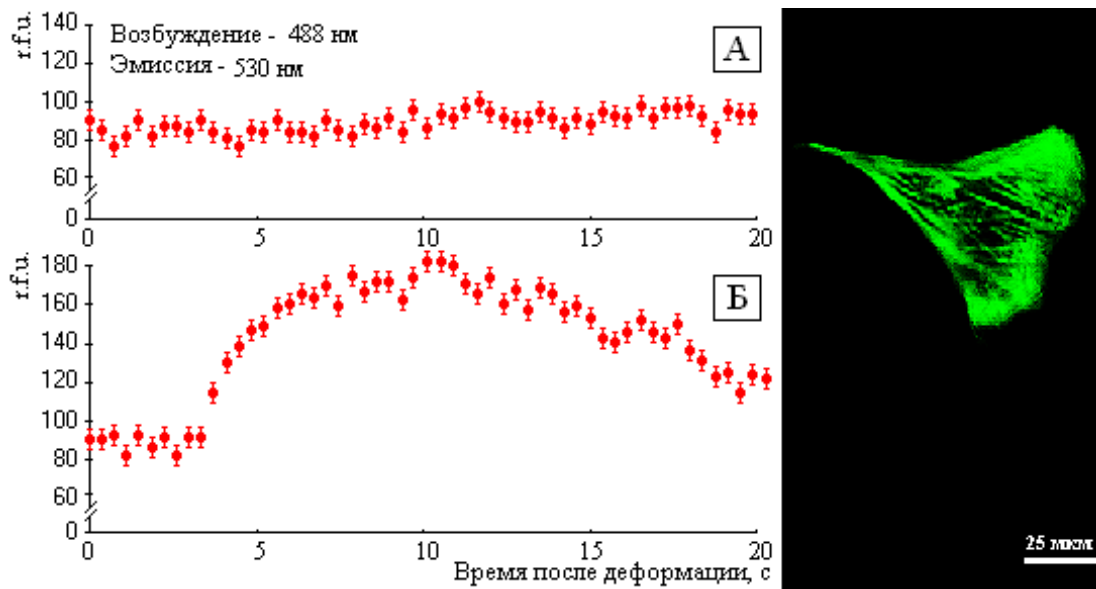


Рис. 5. Влияние вынужденного колебания интегринов фибробластов на содержание внутриклеточного кальция в условиях нативного цитоскелета. Обозначения: А – без деформации, Б – после деформации, *r.f.u.* – относительные единицы флуоресценции.

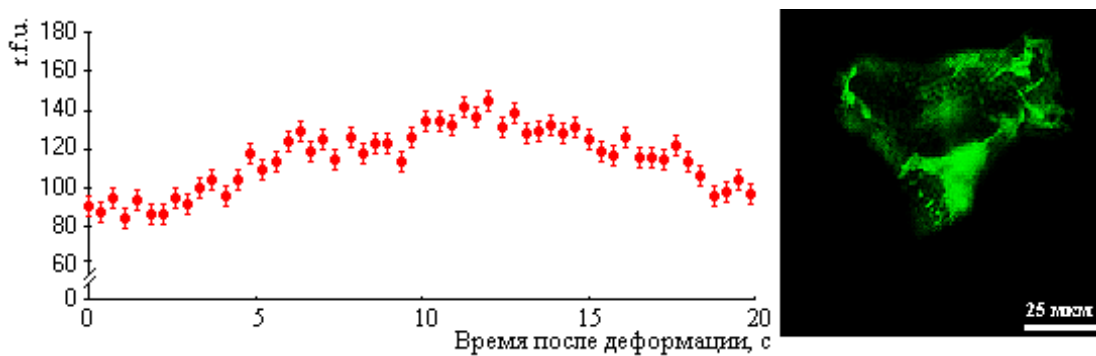


Рис. 6. Влияние вынужденного колебания интегринов фибробластов на содержание внутриклеточного кальция в условиях деполимеризации цитоскелета, *r.f.u.* – относительные единицы флуоресценции.

3. Для нормального функционирования депозависимого механизма выхода Ca^{2+} в цитоплазму деформируемых фибробластов необходима целостность их цитоскелета.

Список литературы

- Кот Е.В., Кот Ю.Г. Особенности актиновой сети цитоскелета фибробластов, культивируемых на деформируемой подложке // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2011. – Вип.14, №971. – С. 20–26. /Kot Ye.V., Kot Yu.G. Osobennosti aktinovy seti tsitoskeleta fibroblastov, kul'tiviruyemykh na deformiruyemoy podlozhke // Visnyk Kharkiv'skogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2011. – Vyp.14, №971. – S. 20–26./
- Крутецкая З.И., Крутецкая Н.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. Роль структур цитоскелета в регуляции Ca^{2+} -ответов в макрофагах // Цитология. – 2001. – № 1. – С. 61–71. /Krutetskaya Z.I., Krutetskaya N.I., Lebedev O.Ye., Kurilova L.S. Rol' struktur tsitoskeleta v regulyatsii Ca^{2+} -otvetov v makrofagakh // Tsitologiya. – 2001. – №1. – S. 61–71./
- Материалы 1. Chemicell SiMAG particles. Электронный документ:
<http://www.chemicell.com/products/microparticles/simag-affinity/index.html>
- Протокол 1. Иммунизация антител на магнитных частицах. Электронный документ:
<http://www.sileks.com/ru/production.php?folder=29>
- Материалы 2. Rat Anti-Integrin $\alpha 2\beta 1$ Antibody Chemicon (Millipore). Электронный документ:
<http://www.millipore.com/catalogue/item/mab2141z>
- Материалы 3. NanoECM™ plate. Электронный документ:
<http://www.nanofibersolutions.com/products.html#NanofiberPlates>
- Материалы 4. Magnetic Sensor Systems. Электронный документ:
<http://www.solenoidcity.com/electromagnet/electromagnetcatalog.htm>
- Протокол 2. Fluo Calcium Indicators. The Molecular Probes® Handbook. Электронный документ:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
- Протокол 3. Anti-beta Actin antibody [AC-15] (FITC). Электронный документ:
<http://www.abcam.com/beta-Actin-antibody-AC-15-FITC-ab6277.html>
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling // Nature Reviews. Molecular Cellbiology. – 2000. – Vol.1. – С. 11–21.
- Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized. – Wiley-Blackwell Inc., 2010. – P.163.
- Juliano R.L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2002. – Vol.42. – P. 283–323.
- Phelan M.C. Basic techniques for mammalian cell tissue culture // In: Current protocols in cell biology. – John Wiley & Sons Inc., 1998. – P. 82–83.
- Rittié L., Fisher G.J. Isolation and culture of skin fibroblasts // Methods in Molecular Medicine. – 2005. – Vol.117. – P. 83–98.
- Schliwa M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks // The Journal of Cell Biology. – 1982. – Vol.92., №1. – P. 79–91.

Представлено: О.П.Бєлєзоров / Presented by: O.P.Belozorov

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

Подано до редакції / Received: 13.04.2012