

УДК: 577.12.577.112.577.2

**Изменение спектра изоформ актина цитоскелета нормальных и модифицированных TGF- $\beta$ 1 фибробластов под действием механической деформации**  
Ю.Г.Кот

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
kot\_jurij@inbox.ru*

Исследована динамика спектра изоформ актина деформируемых нормальных фибробластов легкого и фибробластов, модифицированных действием TGF- $\beta$ 1. Показано, что механическая деформация приводит к появлению  $\alpha$ -изоформы актина, не обнаруживаемой в недеформируемых фибробластах. При этом показано, что увеличение количества  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 интегринов на поверхности модифицированных TGF- $\beta$  фибробластов приводит к появлению  $\alpha$ -изоформы актина на более ранних сроках при деформации клеток.

**Ключевые слова:** *механическая деформация, фибробласты, актин, TGF- $\beta$ 1.*

**Зміна спектру ізоформ актину цитоскелету нормальних і модифікованих TGF- $\beta$ 1 фібробластів під дією механічної деформації**  
Ю.Г.Кот

Досліджена динаміка спектру ізоформ актину деформованих нормальних фібробластів легень і фібробластів, модифікованих дією TGF- $\beta$ 1. Показано, що механічна деформація призводить до появи  $\alpha$ -ізоформи актину, яка не спостерігається в недеформованих фібробластах. При цьому виявлено, що збільшення  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 інтегринів на поверхні модифікованих TGF- $\beta$  фібробластів призводить до появи  $\alpha$ -ізоформи актину на більш ранніх строках при деформації клітин.

**Ключові слова:** *механічна деформація, фібробласти, актин, TGF- $\beta$ 1.*

**Change of cytoskeleton actin isoforms spectrum in normal and modified by TGF- $\beta$ 1 fibroblasts at mechanical deformation**  
Yu.G.Kot

The dynamics of actin isoforms spectrum in normal deformed lung fibroblasts and fibroblasts modified by the action of TGF- $\beta$ 1 has been investigated. It has been shown that mechanical deformation leads to the appearance of  $\alpha$ -actin isoform not detectable in non-deformed fibroblasts. It has been also shown that increase of  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrins on the surface of modified by TGF- $\beta$  fibroblasts leads to the appearance of  $\alpha$ -actin isoform at an earlier stage at the deformation of cells.

**Key words:** *mechanical deformation, fibroblasts, actin, TGF- $\beta$ 1.*

**Введение**

Проблема направленной дифференцировки клеток внешними воздействиями – одна из наиболее актуальных в клеточной биологии. Основным объектом исследований в этой области являются мезенхимальные стволовые клетки. В то же время фибробласты, будучи не полностью дифференцированными, также могут быть полезны для выяснения механизмов, лежащих в основе дифференцировки. В работе изучена в культуре возможность дифференцировки фибробластов в направлении миобластов путём раздельного и сочетанного действия механического напряжения и TGF- $\beta$ 1.

**Объект и методы исследования**

**Культура фибробластов.** В работе использовались 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).

**Деформація кліток.** Для експеримента клітки разморозували (Phelan, 1998) і висевали на еластичні підложки. Після распластывания кліток на підложках (16 час культивування) їх підвергали механічному растяженню моноаксiального характера. Підложка (20×15×0,02 мм) представляла собою еластичну плівку з органосовместимого прозачного латекса (Cláudia et al., 2006; Vendra et al., 2010) з адгезивним покриттям з колагена і гіалуроната (Hwal Sun, Jong-Eun Lee, 2002). Растяження підложки з клітками проводили на спеціально сконструйованній установці, підтримуючій в автоматичному режимі параметри культивування. Умовля культивування кліток на підложці аналогічні умовам субкультування (DMEM – 10% FBS, 37°C, 95% вологості, 5% CO<sub>2</sub>). Удлинение підложки складало 0,1% її довжини. Общее время культивування кліток на деформуваних підложках складало 6 годин.

**Модифікація кліток.** За 48 годин до посєва на еластичну підложку фібробласти оброблялись TGF- $\beta$ 1 в концентрації 2 нг/мл культуральної середовища (Thannickal et al., 2003). Трансформуючий фактор росту  $\beta$ 1 являється усилителем експресії генів  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 інтегринов, важливих адгезійних рецепторів фібробластів різних тканин млекопитаючих (Streuli et al., 1993). Результат дії TGF- $\beta$ 1 спостерігали при допомозі флуоресцентної мікроскопії після обробки кліток наночастицями, кон'югованими з FITC-антителами на  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 інтегрини (Chemicell.com). Обробку і візуалізацію проводили згідно протоколу (Протокол 1).

Через кожні 60 хвилин підложку з клітками спостерігали з растяження і досліджували, як описано нижче.

**Візуалізація кліток і актина.** Морфологію кліток оцінювали фазово-контрастною мікроскопією. За системою актинових мікрофіламентів фібробластів спостерігали після їх фіксації і обробки моноклональними FITC-кон'югованими антителами на  $\beta$ -актин і TRITC-кон'югованими на  $\alpha$ -актин згідно протоколу (Протокол 2, 3).

**Виділення актина з кліток.** Виділення тотального актина з кліток, снятих з підложки ( $9 \times 10^6$ ), проводили після їх лизиса, як описано в роботі (Sakiyama et al., 1981) методом афінної колоночної хроматографії на DNase-I-агарозі (Pharmacia). Далі проводили додаткову очищення елюатів на Sephadex G-50 fine (Pharmacia, межа ексклюзії 30 кД). Далі полімери осаджували ацетоном і ліофілізували. Отриманий ліофілізат використовували для визначення співвідношення ізоформ актина методом ізоелектричного фокусування.

**Ізоелектричне фокусування.** Ізоелектричне фокусування проводили по методу (Протокол 4) в капілярах (17×0,15 см), заповнених 10% поліакриламідним гелем з градієнтом рН 10–3 (амфоліти Bio-Rad). В лунку геля (0,5×0,1 см) поміщали 0,21 мкг ліофілізата, суспендованого в 15 мкл солюбілізувального буфера (Rubenstein, 1977). Ізоелектрофокусування проводили 12 ч – при 300В і 4 ч – при 600 В. Далі гелі фарбували кумасі голубим. Фарбовані гелі сканували і проводили аналіз з допомогою пакета програм TotalLab 2.01.

### Результати дослідження

На рис. 1 наведені ізоелектрофореграми актина фібробластів. Як видно, актин недеформованих фібробластів (0 час культивування) представлений двома ізоформами –  $\beta$  і  $\gamma$ . На 5 час культивування на електрофореграмі актина деформованих фібробластів, крім  $\beta$ - і  $\gamma$ -полос, з'являється ще одна полоса, зміщена в область кислих рН, відповідна положенню  $\alpha$ -ізоформи (Rubenstein, 1977).

В принципі,  $\alpha$ -ізоформа актина не характерна для диференційованих нем'язцевих кліток, в яких основними ізоформами є  $\beta$ - і  $\gamma$ -актини, співвідношення між якими підтримується на постійному рівні, і основною є регуляція їх просторового розподілу. Однак, існують роботи (Tomasek et al., 2002; Wang, 2003), в яких показано саме механоіндуційована диференційовка ембріональних і зрілих фібробластів в міофібробласти, для яких характерно наявність  $\alpha$ -ізоформи актина.

Величина сигналу, запускує такі механозалежні зміни в якості складу актинового компонента цитоскелета, повинна залежати від ступеня адгезії кліток з внеклітинним субстратом і, як наслідок, з іншим. Як видно на рис. 2, передобробка кліток TGF- $\beta$ 1 призводила до збільшення кількості  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 інтегринів на поверхні фібробластів.

Наявність цієї ізоформи актина в фібробластах, підвергнутих деформації після обробки TGF- $\beta$ 1 підтверджується також імунохімічно (рис. 3).

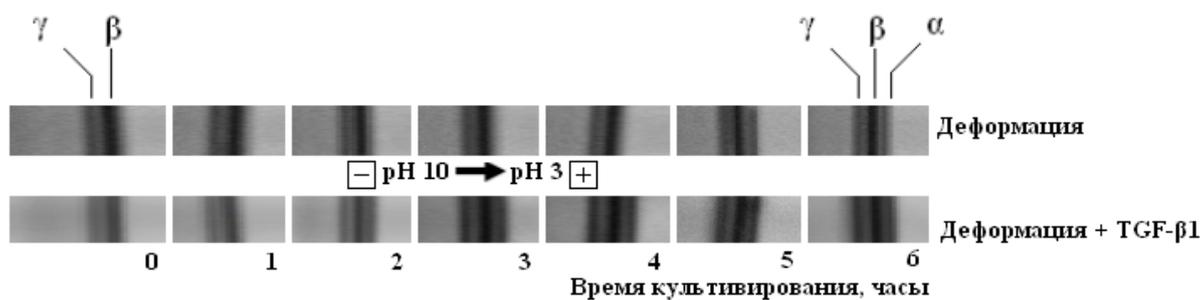


Рис. 1. Изоэлектрофореграммы актина фибробластов, культивируемых в условиях деформации и в условиях деформации после предобработки клеток TGF-β1

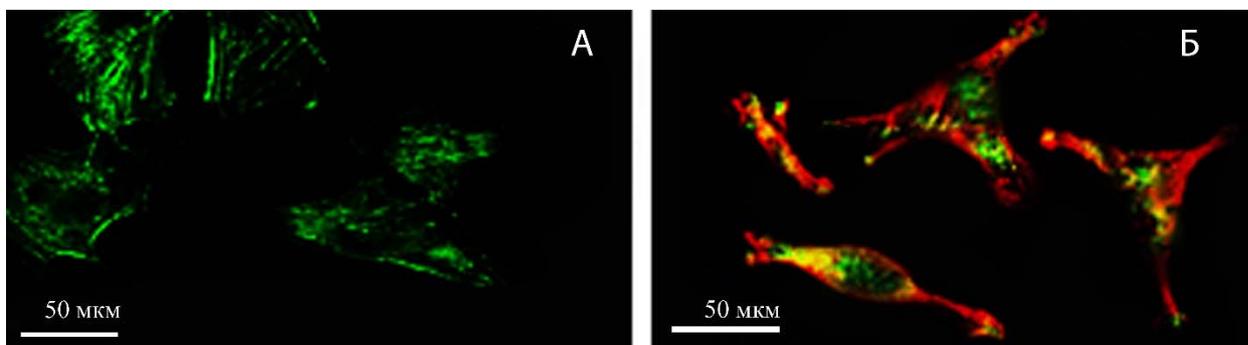


Рис. 2. Иммунохимическое окрашивание β-изоформы актина FITC (зеленый) и α-изоформы актина TRITC (красный) в недеформируемых (А) и деформируемых (Б) фибробластах на 6 час культивирования

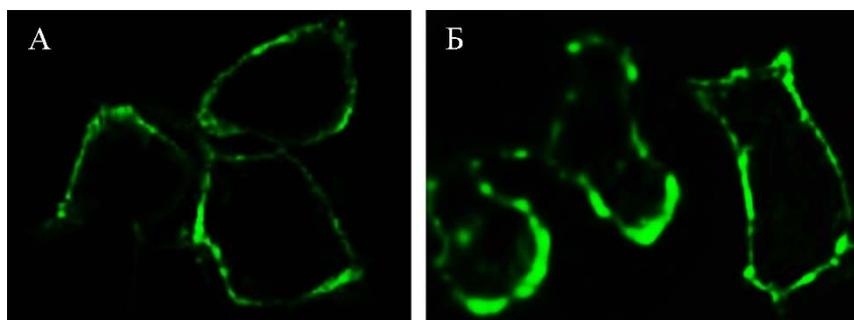


Рис. 3. Визуализация α2 и β1 интегринов на поверхности фибробластов без (А) и после обработки (Б) TGF-β1

При деформации клеток с более высоким пулом адгезионных рецепторов также наблюдалось появление  $\alpha$ -изоформы актина, однако, в отличие от клеток, не подвергавшихся действию трансформирующего фактора, эта изоформа проявлялась уже на 2–3 час культивирования (рис. 1.). Это, по-видимому, является результатом запуска механизма сигналинга, зависящего от адгезии, в котором количество адгезионных рецепторов на мембране клетки напрямую влияет на эффективность передаваемых внутрь нее механозависимых сигналов.

### Выводы

Фибробласты лёгкого 2-недельных крыс в культуре под воздействием как механического напряжения, так и TGF- $\beta$ 1 начинают синтезировать  $\alpha$ -изоформу актина, не характерную для фибробластов, но специфическую для миобластов. Сочетанное действие обоих внешних факторов увеличивает количество  $\alpha$ -изоформы актина в клетках. Это свидетельствует о том, что использованные воздействия изменяют характер дифференцировки фибробластов в направлении мышечных клеток.

### Список литературы

- Протокол 1. Электронный ресурс. (<http://www.chemicell.com/products/fluorescent/index.html>)
- Протокол 2. Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit. Электронный ресурс.
- Протокол 3. Электронный ресурс.  
(<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/dual/fitctritc/fitctritcindex.html>)
- Протокол 4. Изоэлектрофокусирование. Электронный ресурс.  
(<http://195.178.207.228/work/FILES/19/2D-PAGE.pdf>)
- Chemicell.com. Электронный ресурс.  
([http://www.chemicell.com/products/Magnetic\\_Nanoparticle/Magnetic\\_Nanoparticles.html](http://www.chemicell.com/products/Magnetic_Nanoparticle/Magnetic_Nanoparticles.html))
- 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.
- 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  $\gamma$ -actin expression in the mouse fibroblast cell line // *JBC.* – 1981. – Vol.256, №1. – P.31.
- Streuli C.H., Schmidhauser C., Kobrin M. et al. Extracellular matrix regulates expression of the TGF- $\beta$ 1 gene // *The Journal of Cell Biology.* – 1993. – Vol. 120. – № 1. – P.253-260.
- Thannickal V.J., Lee D.Y., White E.S. et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor- $\beta$ 1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – Vol.278, №14. – P. 12384–12389.
- Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B. et al. Myofibroblast and mechanoregulation of connective tissue remodeling // *Molecular Cell Biology.* – 2002. – Vol.3. – P.352.
- Vendra K.V., Wu Lin, Krishnan S. 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: О.П.Білозоров / Presented by: O.P.Bilozorov**

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

*Подано до редакції / Received: 24.10.2013*