

UDC 577.12.577.112.577.2

**Relation between Integrins Forced Oscillation, Degree of Actin Cytoskeleton Polymerization and Content of Free Ca<sup>2+</sup> of Fibroblasts**<sup>1</sup> Ekaterina V. Kot<sup>2</sup> Yuriy G. Kot<sup>3</sup> Maria A. Grytsenko<sup>4</sup> Liubov V. Altukhova<sup>5</sup> Yevgen E. Persky

<sup>1-5</sup> V.N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine  
61022, Kharkiv, Svobody Sq. 4

<sup>1</sup> Lecturer

E-mail: kate.v.kot@gmail.com

<sup>2</sup> PhD (Biology), Senior Researcher

E-mail: kot\_jurij@inbox.ru

<sup>3</sup> Lecturer

E-mail: marija\_gricenko@rambler.ru

<sup>4</sup> PhD student

<sup>5</sup> Dr. (Biology), Professor

E-mail: evg.persky@gmail.com

**Abstract.** The impact of integrins oscillation on intracellular calcium in conditions of native actin microfilaments network and under depolymerization was studied on the 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 being cell-attached. It proved that  $\alpha(2)\beta(1)$ -integrins are involved in the response of fibroblasts to mechanical deformation, activating depot-dependent calcium efflux in cytoplasm. Cytoskeletal actin microfilaments are also involved in the response via these receptors, which integrity is essential for normal functioning of the depot-dependent mechanism of Ca<sup>2+</sup> efflux in cytoplasm of deformable fibroblasts.

**Keywords:** 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 [1] 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 интегрин-актин-кальций [2].

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 распространённых 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 и методы исследования.

Культура фибробластов. В работе использовались фибробласты лёгкого крыс 2-недельного возраста. Получение первичной культуры и субкультивирование проводили согласно [3]. Нарботанные 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) [4]. Для эксперимента клетки размораживали [5] 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) [6] 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(2) $\beta$ (1) -интегрины, использованные в работе. Иммобилизацию антител проводили согласно протоколу [7]. В работе были использованы антитела Rat Anti-Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 Antibody Chemicon (Millipore) [8].

Принцип конструкции установки для деформации интегринов под действием циклического магнитного поля на основе 6-луночного планшета для визуализации клеток NanoЕСМ™ [9] 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 % CO<sub>2</sub>). Затем монослой клеток дважды промывали культуральной средой для удаления не связавшихся с их мембраной частиц.

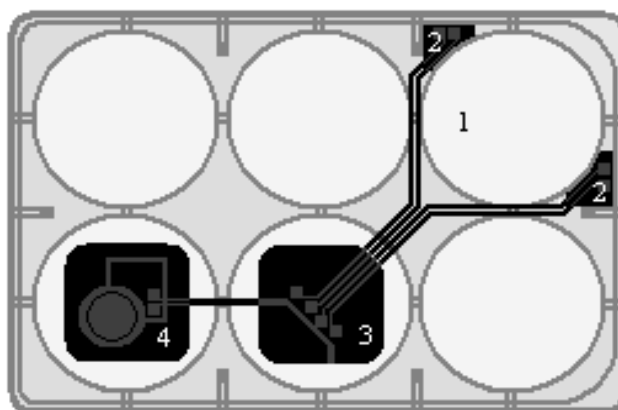


Рис. 1. Принцип установки: 1 – лунка с культурой клеток; 2 – электромагниты (3В; 1А; 0,5мТ); 3 – блок микросхем управления магнитами; 4 – батарея и таймер электропитания

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) [10], расположенных, как показано на рис. 1. Электромагниты включались поочередно по 4 раза каждый. Период и частота колебаний магнитного поля составляли 350 миллисекунд и  $108^{-3}$  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 20μМ флуоресцентного зонда, специфичного к Ca<sup>2+</sup>, – Fluo3-AM. Инкубацию проводили в темноте с последующей отмывкой от красителя согласно протоколу [11]. 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 дна 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).

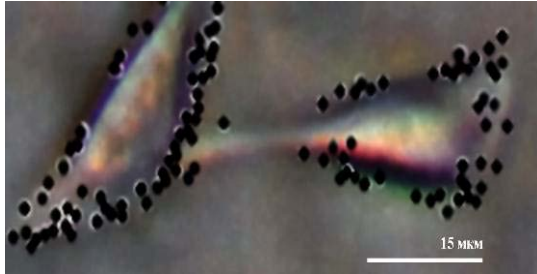
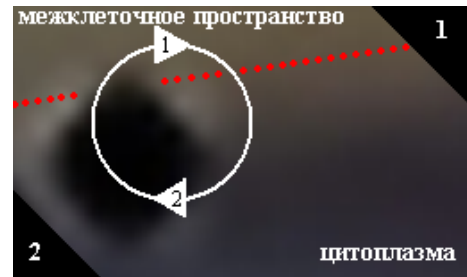


Рис. 2. Магнитные частицы, ассоциированные с интегринами на поверхности мембраны фибробластов.  
Фазово-контрастная микроскопия.  $\times 800$



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

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 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 10 %  $\text{CO}_2$ ). В использованной концентрации цитохалазин Д вызывает деполимеризацию актиновых филаментов цитоскелета [12]. 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  $\beta$ -актин согласно протоколу [13].

**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 интегринов, 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).

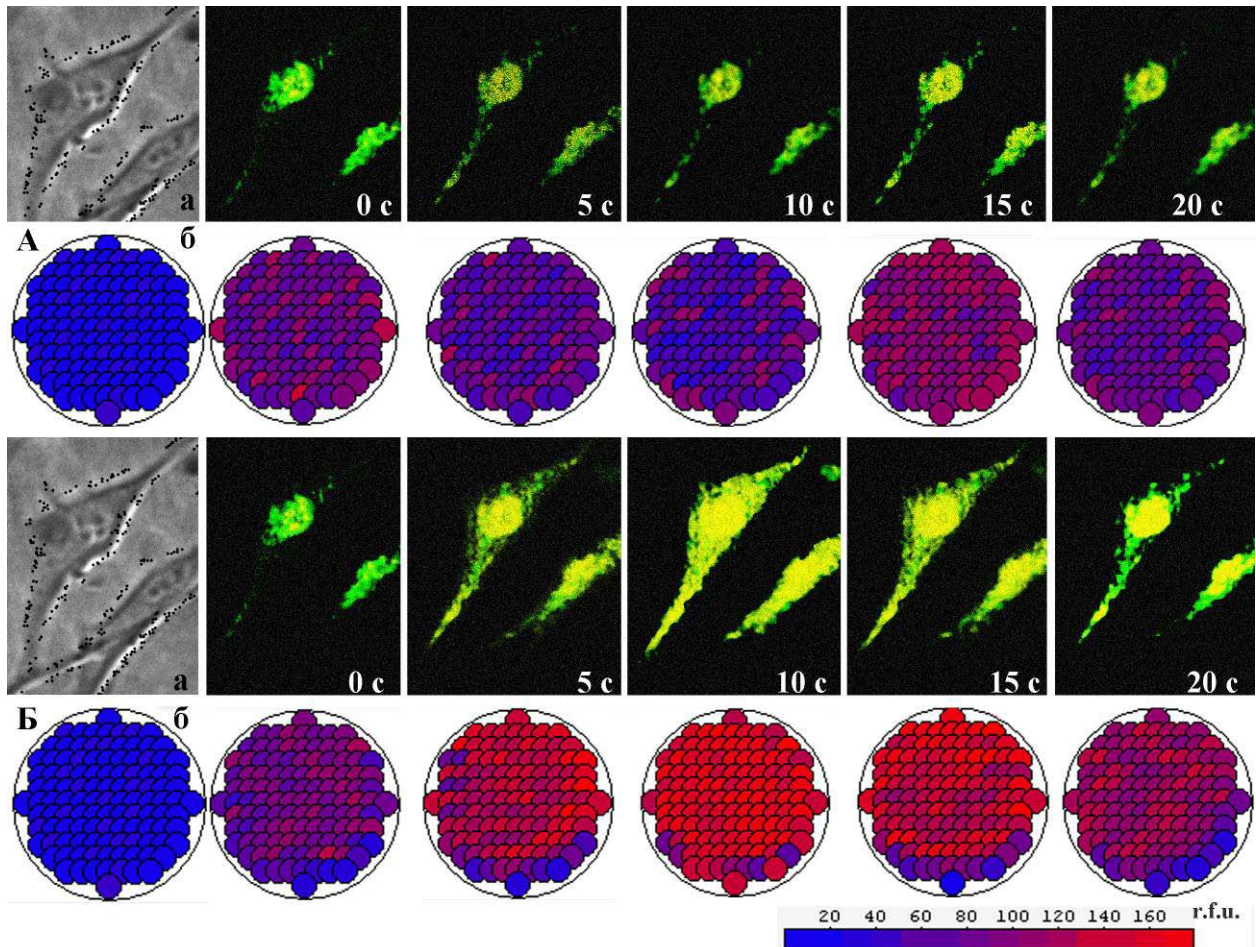


Рис. 4. Изменение содержания внутриклеточного кальция фибробластов без (А) и при колебании интегринов (Б) изученное при помощи флуоресцентной микроскопии и флуоресцентного сканирования культуры с использованием кальций-специфичного красителя Fluo3-AM

Обозначения: а – фазово-контрастное фото клеток с интегрин-ассоциированными магнитными частицами, б – контрольное сканирование лунки без культуры, r.f.u. – относительные единицы флуоресценции.

Такое увеличение содержания ионов кальция внутри клетки, по-видимому, происходит за счёт 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  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы АТФазами. На 20 с наблюдения флуоресценция остаётся 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» интегринов.

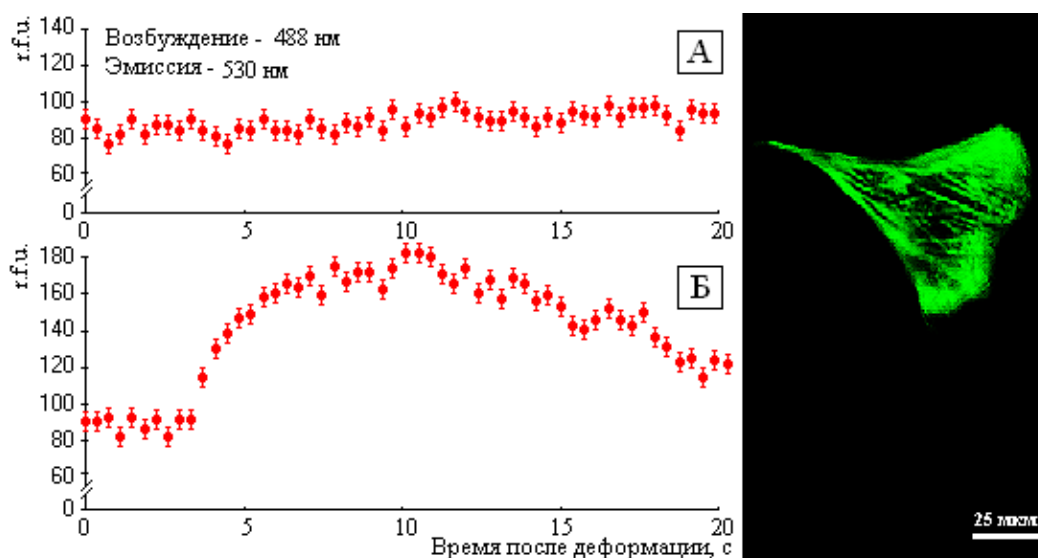


Рис. 5. Влияние колебаний интегринов фибробластов на содержание внутриклеточного кальция в условиях нативного цитоскелета

Обозначения: А – без деформации, Б – после деформации, r.f.u. – относительные единицы флуоресценции.

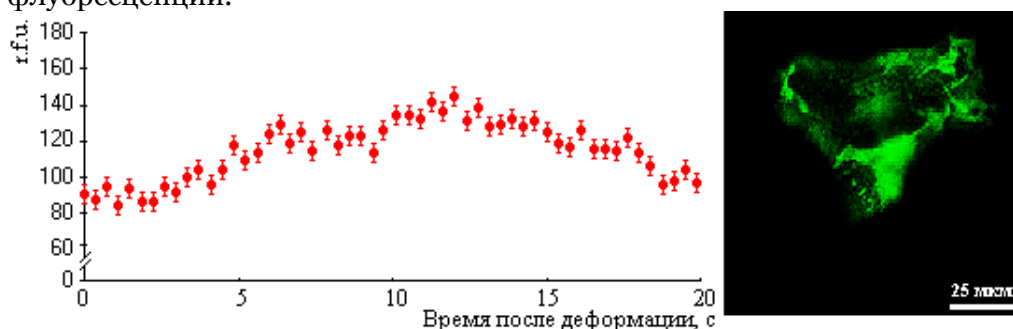


Рис. 6. Влияние колебания интегринов на содержание внутриклеточного кальция в условиях модификации цитоскелета

Обозначения: А – без деформации и деполимеризации актина, Б – после деформации в условиях деполимеризации актина, r.f.u. – относительные единицы флуоресценции.

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 интегринов. 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 [14, 15], 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  $\text{Ca}^{2+}$  из депо и практически полностью подавляют депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированный тапсигаргином. В то же время эти соединения не влияют на вызываемую АТФ или УТФ мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, что свидетельствует о том, что освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из депо с участием фосфоинозитидной системы остаётся без изменений. Возможно, что подобный механизм имеет место и в случае ответа фибробластов на действие механического напряжения.



**Заклучение.**  $\alpha(2)\beta(1)$ -интегрины принимают участие в ответе фибробластов на действие механической деформации, активируя депозависимый вход кальция в клетки. В реализации такого ответа через эти рецепторы задействованы актиновые микрофиламенты цитоскелета. Для нормального функционирования депозависимого механизма выхода  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму деформируемых фибробластов необходима целостность их цитоскелета.

**Примечания:**

1. Кот Е.В. Особенности актиновой сети цитоскелета фибробластов, культивируемых на деформируемой подложке / Е.В. Кот, Ю.Г. Кот // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 2011. Вип. 14, № 971. С. 20–26.
2. Juliano R.L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton / R.L. Juliano // Annu. Rev. Pharm. Toxicol. 2002. Vol. 42. P. 283–323.
3. Rittié L. Isolation and culture of skin fibroblasts / L. Rittié, G.J. Fisher // Methods in Molecular Medicine. 2005. Vol. 117. P. 83–98.
4. Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized. Wiley-Blackwell Inc., 2010. P. 163.
5. Phelan M.C. Basic techniques for mammalian cell tissue culture / M.C. Phelan // Current protocols in cell biology. Wiley & Sons Inc. 1998. P. 82–83.
6. Chemicell SiMAG particles [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.chemicell.com/products/microparticles/simag-affinity/index.html>
7. Иммунизация антител на магнитных частицах [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.sileks.com/ru/production.php?folder=29>
8. Rat Anti-Integrin  $\alpha2\beta1$  Antibody Chemicon (Millipore) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.millipore.com/catalogue/item/mab2141z>
9. NanoECM™ plate [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.nanofibersolutions.com/products.html#NanofiberPlates>
10. Magnetic Sensor Systems [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.solenoidcity.com/electromagnet/electromagnetcatalog.htm>
11. Fluo Calcium Indicators. The Molecular Probes® Handbook [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
12. Schliwa M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks / M. Schliwa // The Journal of Cell Biology. 1982. Vol. 92. № 1. P. 79–91.
13. Anti-beta Actin antibody [AC-15] (FITC) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.abcam.com/beta-Actin-antibody-AC-15-FITC-ab6277.html>
14. Крутецкая З.И. Роль структур цитоскелета в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов в макрофагах / З.И. Крутецкая, Н.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев и др. // Цитология. 2001. № 1. С. 61–71.
15. Berridge M.J. The versatility and universality of calcium signaling / M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman // Nature Reviews. Molecular Cellbiology. 2000. Vol. 1. P. 11–21.

УДК 577.12.577.112.577.2

**Связь между вынужденными колебаниями интегринов, степенью полимеризации актина цитоскелета и содержанием свободного  $\text{Ca}^{2+}$  фибробластов**

<sup>1</sup>Екатерина Васильевна Кот  
<sup>2</sup>Юрий Григорьевич Кот  
<sup>3</sup>Мария Андреевна Гриценко  
<sup>4</sup>Любовь Вадимовна Алтухова  
<sup>5</sup>Евгений Эфроимович Перский

<sup>1-5</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, Украина  
 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4

<sup>1</sup> Преподаватель

E-mail: kate.v.kot@gmail.com

<sup>2</sup> Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

E-mail: kot\_jurij@inbox.ru

<sup>3</sup> Преподаватель

E-mail: marija\_gricenکو@rambler.ru

<sup>4</sup> Аспирант

<sup>5</sup> Доктор биологических наук, профессор

E-mail: evg.persky@gmail.com

**Аннотация.** На модели вынужденных циклических колебаний  $\alpha(2)\beta(1)$ -интегринов с использованием интегрин-специфичных 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 деполимеризации. 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.