

УДК 571.27

Индукция экспрессии ICAM-1 в эмбриональных фибробластах мышцы при их культивировании на губчатых фиброин-желатиновых скаффолдах

М. А. Носенко^{1,2,4}, Н. В. Малюченко¹, М. С. Друцкая^{1,2}, А. Ю. Архипова¹, И. И. Агапов³, С. А. Недоспасов^{1,2,4}, М. М. Мойсенович^{1*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

³Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, лаборатория бионанотехнологий, 123182, Москва, Щукинская ул., 1

⁴Немецкий ревматологический исследовательский центр, 10117, Берлин, Шаритеплатц, 1, Германия

*E-mail: mmoisenovich@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2016

Принята к печати 26.05.2017

РЕФЕРАТ Культивирование клеток в трехмерных условиях на биорезорбируемых каркасах (скаффолдах) – важнейший этап создания тканеинженерных конструкций, предназначенных для использования в регенеративной медицине, а также в качестве модельных систем для исследования механизмов клеточной дифференцировки и межклеточных взаимодействий. Искусственные субстраты могут модулировать фенотип и функциональную активность иммобилизованных на них клеток. Изучение таких изменений важно как для понимания фундаментальных процессов, лежащих в основе взаимодействия клеток в трехмерном микроокружении, так и для совершенствования тканеинженерных конструкций. В представленной работе исследована экспрессия молекулы адгезии ICAM-1 в эмбриональных фибробластах мышцы (МЭФ), культивируемых в фиброин-желатиновых скаффолдах. Повышенный уровень экспрессии ICAM-1 в МЭФ детектировали исключительно в условиях трехмерного культивирования на уровне как мРНК, так и белка. При этом культивирование МЭФ на различных субстратах не влияло на экспрессию MAdCAM-1, что свидетельствует об избирательности воздействия созданных трехмерных условий на экспрессию ICAM-1. Один из возможных механизмов индукции ICAM-1 в МЭФ связан с активацией AP-1, поскольку экспрессия *Fos* и *Junb* (но не *Jun* и *Jund*) в 3D повышалась. При культивировании фибробластов в 2D условиях уровень экспрессии компонентов AP-1 не изменялся.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА МЭФ, биоинженерия, полимерный матрикс, стромальные клетки, ICAM-1, 3D.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 2D – двумерные условия; 3D – трехмерные условия; МЭФ – эмбриональные фибробласты мышцы; ФЖ – фиброинный скаффолд, содержащий 30% желатина.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами был создан фиброин-желатиновый губчатый скаффолд, формирующий субстрат для адгезии и пролиферации клеток различных типов [1]. Фрагменты этого скаффолда размером 200–400 мкм при подкожном введении в область, прилегающую к ране, способствовали регенерации полнослойной раны кожи мышцы, по-видимому, из-за их иммуномодулирующей активности [2]. Одним из возможных ме-

ханизмов, лежащих в основе регенеративной активности фиброин-желатиновых скаффолдов, может быть усиление экспрессии фибробластами после их контакта с поверхностью скаффолдов молекул адгезии, вовлеченных в иммунные реакции. Одной из таких молекул является ICAM-1. В норме ICAM-1 представлена на фибробластах в небольшом количестве, а ее экспрессия может быть индуцирована в результате изменения микроокружения. Например, при воспа-

лении экспрессия ICAM-1 в тканеспецифичных фибробластах значительно возрастает и способствует миграции иммунных клеток к очагу воспаления [3, 4]. ICAM-1 важна для функционирования лимфоидных органов, где молекула обеспечивает контактные взаимодействия между клетками иммунной системы, стромальными и эндотелиальными клетками [5]. Воспроизведение этих и других взаимодействий, опосредованных трехмерным окружением, как *in vitro*, так и *in vivo* представляет важный этап в конструировании искусственной лимфоидной ткани [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Первичную культуру МЭФ и губчатые фиброинные скаффолды, содержащие 30% желатина (3D ФЖ), получали как описано ранее [1]. Для 2D культивирования использовали скаффолды, выполненные в виде пленок из водного раствора того же состава, или культуральный пластик Nunc (Thermo Fisher Scientific, США).

РНК из МЭФ выделяли по стандартному протоколу с использованием TRI Reagent (Sigma Aldrich, США), наборов для обратной транскрипции (Thermo

Scientific, EN0521 и K1621) и ПЦР в реальном времени («Синтол», М-440), руководствуясь при этом рекомендациями производителей. Качество реакций оценивали по кривой плавления и электрофорезу в 1.8% агарозном геле продуктов амплификации. Снимки гелей проводили с помощью GelDoc™XR+System (BioRad, США). В качестве положительного контроля при анализе экспрессии гена *Madcam1* использовали суммарную РНК, выделенную из лимфатических узлов мыши. Работу проводили на приборе 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems, США).

Иммунофлуоресцентный анализ проводили с применением антител α ICAM1-Cy5 (КАТ1), ядерного красителя SYTOX orange, конъюгата фаллоидин-ФИТЦ для визуализации полимеризованного актина. Образцы заключали в Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc., США). Полученные препараты исследовали с использованием электронного микроскопа Camscan Series II (Cambridge Instruments) в режиме SEI и на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corp., Япония) и объективом Apo TIRF 60 \times /1.49 Oil или CFI Plan Apo VC 20 \times /0.75.

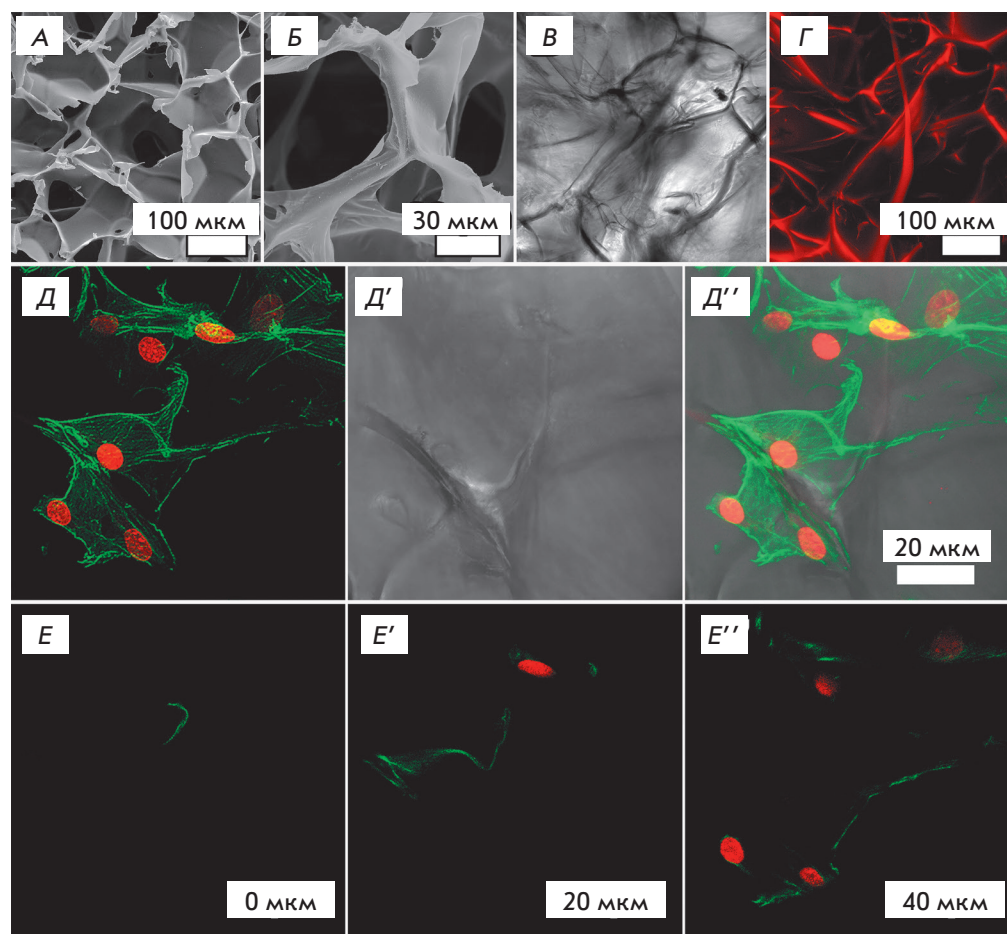


Рис. 1. Микроструктура скаффолдов и анализ цитоскелета МЭФ в условиях 3D культивирования. Изображения скаффолда получены на сканирующем электронном микроскопе (А, Б); в водной среде с использованием конфокальной системы в проходящем свете (DIC, В); проекция 150 оптических срезов с интервалом 1.2 мкм (Г). Материал скаффолда выявлен ТРИТЦ. Объектив CFI Plan Apo VC 20 \times /0.75. Д–Д'' – трехмерная реконструкция в виде горизонтальной проекции 242 оптических срезов с интервалом 281 нм (68.002 мкм). Е–Е'' – оптические срезы на расстоянии 0, 20 и 40 мкм от первого оптического среза. Зеленым показан цитоскелет клеток (фаллоидин-ФИТЦ), красным – ядра (SYTOX orange). Объектив Apo TIRF 60 \times /1.49 Oil

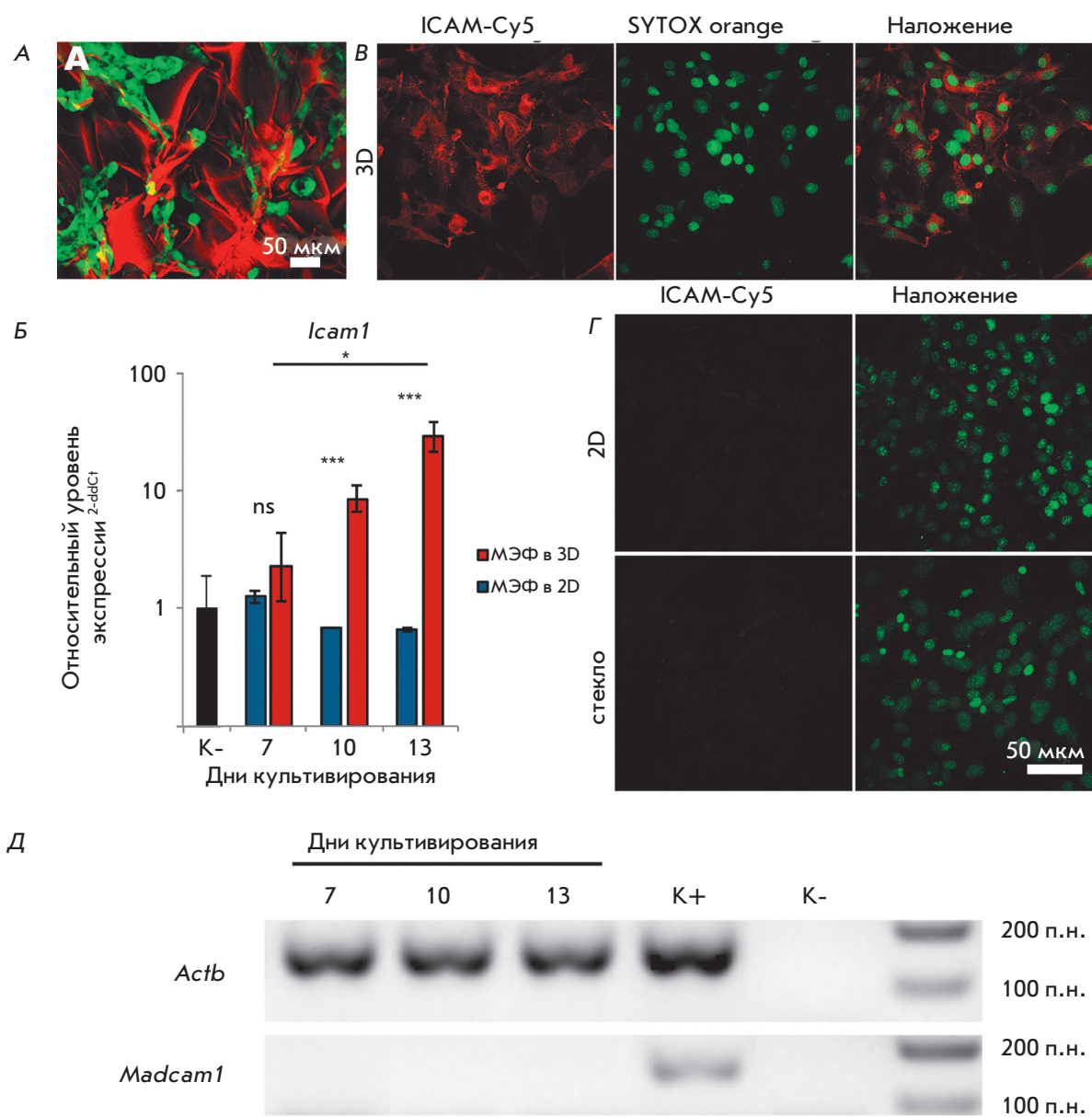


Рис. 2. Экспрессия ICAM-1 в МЭФ. **А** – распределение GFP⁺ МЭФ при культивировании на 3D скаффолдах. Материал скаффолда выявлен ТРИТЦ. **Б** – экспрессия *Icam1* в культуре МЭФ в 2D (на пластике) и в 3D ФЖ. Значения рассчитаны относительно уровня экспрессии генов в МЭФ до начала эксперимента (обозначен К-). Данные репрезентативны для трех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$; ns – незначимая разница. **В, Г** – иммунофлуоресцентное окрашивание ICAM-1 в культуре МЭФ в 3D условиях (**В**), а также на 2D подложке из фибрина (**Г**, верхний ряд) и поверхности культурального пластика (**Г**, нижний ряд). Объектив – CFI Plan Apo VC 20×/0.75. **Д** – экспрессия гена *Madcam1* в культуре МЭФ в 3D ФЖ. Представлены результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР со специфическими праймерами к указанным генам. Положительный контроль (К+) – материал лимфатических узлов мыши, в отрицательном контроле (К-) отсутствовала матрица для ПЦР

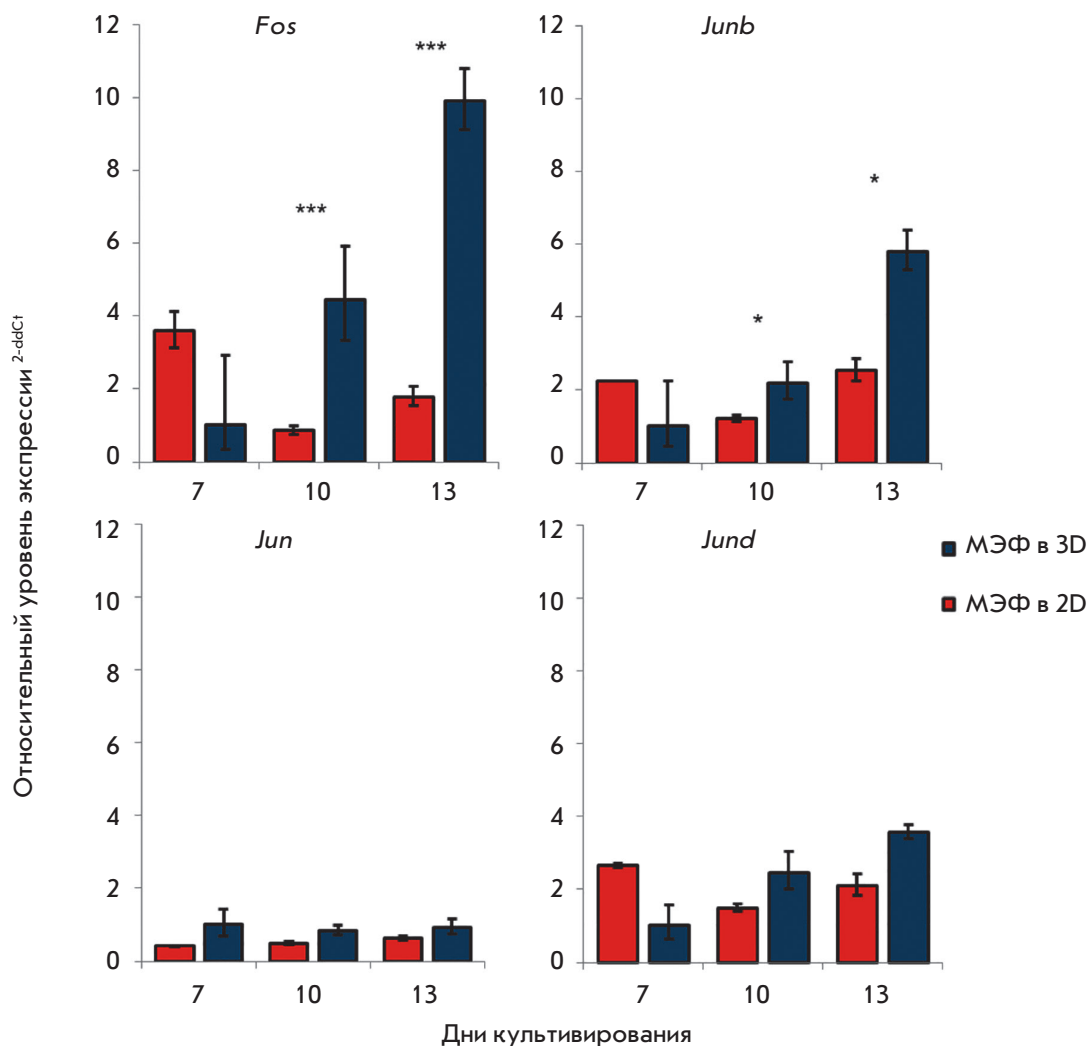


Рис. 3. Экспрессия генов AP-1. Экспрессия генов транскрипционного фактора AP-1 в культуре МЭФ при культивировании на пластике (2D) и на фиброиновых скаффолдах (3D). Значения рассчитаны относительно уровня экспрессии генов на седьмой день в МЭФ в 3D условиях. * – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3D ФЖ скаффолд имеет трехмерную пористую структуру со сложной внутренней и внешней топографией (рис. 1А–Г). Важно, что при культивировании МЭФ на скаффолдах взаимодействие клеточных структур с субстратом осуществляется в различных плоскостях (рис. 1Д,Е’). Распределение клеток на поверхности трехмерного скаффолда также представлено на рис. 2А.

Поскольку молекулы адгезии играют важнейшую роль во взаимодействии клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом, для изучения влияния условий культивирования на свойства МЭФ была проанализирована экспрессия гена молекулы адгезии ICAM-1 в 3D и 2D культурах. Известно, что цитоплазматический домен молекулы ICAM-1 взаимодействует с актиновым цитоскелетом [7], а кластеризация ICAM-1 индуцирует ассоциацию ICAM-1

с актинсвязывающими адаптерными белками и связывает ICAM-1 с F-актиновым цитоскелетом [8]. Мы предположили, что перестройки цитоскелета, вызванные культивированием МЭФ в трехмерных фиброиновых скаффолдах, могут приводить к изменению экспрессии ICAM-1. Действительно, при длительном культивировании МЭФ на фиброиновых скаффолдах, но не на культуральном пластике, наблюдается значительное увеличение экспрессии гена *Icam1* (рис. 2Б). В соответствии с данными по экспрессии гена интенсивное окрашивание МЭФ антителами к ICAM-1 наблюдали только в условиях 3D культивирования (рис. 2В). При этом при 2D культивировании фибробластов на ФЖ-пленках или на стекле сигнал практически отсутствовал (рис. 2Г). Наличие очень слабого сигнала, по-видимому, обусловлено базовым уровнем экспрессии мРНК *Icam1* в 2D культуре (рис. 2Б).

Чтобы убедиться в специфичности наблюдаемого эффекта и отсутствии его связи с общим повышением уровней экспрессии различных генов в процессе культивирования на 3D субстратах, была проанализирована экспрессия гена другой молекулы адгезии – MAdCAM-1. MAdCAM-1, как и ICAM-1, экспрессируется на стромальных и эндотелиальных клетках и является одним из ключевых участников в миграции иммунных клеток в лимфоидные органы, а также в барьерные ткани, однако для нее характерна специфическая индукция при активации некоторых цитокиновых рецепторов [9].

Продукты экспрессии гена *Madcam1* в культуре МЭФ на скаффолдах не были выявлены, что свидетельствует об избирательности влияния трехмерных условий культивирования на экспрессию генов молекул адгезии (рис. 2Д).

Известно, что промоторная область гена *Icam-1* содержит три сайта связывания транскрипционного фактора AP-1, который участвует в его регуляции [10]. Один из возможных механизмов индукции ICAM-1 в МЭФ может быть связан с изменением активности фактора AP-1. Анализ экспрессии генов, кодирующих субъединицы AP-1 (*Fos*, *Jun*, *Jund*, *Junb*) (рис. 3) показал значимое увеличение уровня экспрессии *Fos* и *Junb* в условиях 3D культивирования по сравнению с 2D. Экспрессия генов *Jun* и *Jund* не зависела от условий культивирования и не изменялась статистически значимо.

В дальнейшем предстоит понять, какие сигнальные пути, начиная с механорецепции трехмерного скаффолда или межклеточных взаимодействий, приводят к экспрессии AP-1 и затем, по-видимому, к появлению ICAM-1. Также нельзя исключать участия других транскрипционных факторов в индукции экспрессии ICAM-1. Так, например, известно, что в этот процесс вовлечено семейство транскрипционных факторов NF-κB [11].

ВЫВОДЫ

Культивирование МЭФ в трехмерных фиброин-желатиновых скаффолдах приводит к существенному повышению экспрессии ICAM-1.

Усиление экспрессии ICAM-1 связано с трехмерной организацией скаффолда, а не с влиянием продуктов деградации фиброина, так как культивирование на двумерном фиброиновом матриксе не влияло на экспрессию молекулы.

Увеличение экспрессии ICAM-1 сопряжено с усилением экспрессии генов AP-1 – *Fos* и *Junb*, но не *Jun* и *Jund*. ●

Работа осуществлена при поддержке РФФИ
(грант № 15-29-04903)
и гранта Президента РФ для ведущих научных
школ (НШ-10014.2016.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moisenovich M.M., Arkhipova A.Y., Orlova A.A., Drutskaya M.S., Volkova S.V., Zacharov S.E., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 1. P. 96–101.
- Архипова А.Ю., Носенко М.А., Малюченко Н.В., Зварцев Р.В., Мойсенович А.М., Жданова А.С., Васильева Т.В., Горшкова Е.А., Агапов И.И., Друцкая М.С., Недоспасов С.А., Мойсенович М.М. // *Биохимия*. 2016. Т. 81. № 11. С. 1494–1504.
- Couture P., Paradis-Massie J., Oualha-Morin N., Thibault G. // *Exp. Cell Res.* 2009. V. 315. № 13. P. 2192–2206.
- Zandvoort A., van der Geld Y.M., Jonker M.R., Noordhoek J.A., Vos J.T., Wesseling J., Kauffman H.F., Timens W., Postma D.S. // *Eur. Respir. J.* 2006. V. 28. № 1. P. 113–122.
- Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. // *Annu. Rev. Immunol.* 2008. V. 26. P. 627–650.
- Nosenko M.A., Drutskaya M.S., Moisenovich M.M., Nedospasov S.A. // *Acta Naturae*. 2016. V. 8. № 2. P. 10–23.
- Carpen O., Pallai P., Staunton D.E., Springer T.A. // *J. Cell. Biol.* 1992. V. 118. P. 1223–1234.
- Schaefer A., Te Riet J., Ritz K., Hoogenboezem M., Anthony E.C., Mul F.P., de Vries C.J., Daemen M.J., Figdor C.G., van Buul J.D., Hordijk P.L. // *J. Cell. Sci.* 2014. V. 127. № 22. P. 4470–4482.
- Ando T., Langley R.R., Wang Y., Jordan P.A., Minagar A., Alexander J.S., Jennings M.H. // *BMC Physiol.* 2007. V. 14. № 7. P. 10.
- Voraberger G., Schafer R., Stratowa C. // *J. Immunol.* 1991. V. 147. № 8. P. 2777–2786.
- Roebuck K.A., Finnegan A. // *J. Leukoc. Biol.* 1999. V. 66. № 6. P. 876–888.