

УДК 576.5

АНАЛИЗ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АЛЬФА-AKТИНИНА-4 И СИГНАЛЬНОГО БЕЛКА RhoA В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ ADH-MSC, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. Д. Ф. Гончарова¹, А. В. Полянская¹, А. С. Мусорина², Г. Г. Полянская², Д. Е. Бобков², *

¹Кафедра биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: bobkov@incras.ru

Поступила в редакцию 14.12.2020 г.

После доработки 26.12.2020 г.

Принята к публикации 28.12.2020 г.

В работе проведен молекулярный анализ некоторых механизмов реорганизации актинового цитоскелета в процессе длительного культивирования мезенхимных стволовых клеток человека. С помощью методов иммунофлуоресценции и анализа конфокальных изображений исследовано распределение актин-связывающего белка α -актинина-4 и малой ГТФазы RhoA в мезенхимных стволовых клетках линии ADH-MSC, выделенных из эпикардиальной жировой ткани взрослого человека. Установлено, что в процессе репликативного старения на протяжении 8–17 пассажей в этих клетках происходит перераспределение исследуемых белков из цитоплазмы в ядра клеток, которое сопровождается изменениями в организации актинового цитоскелета. Для оценки организации актинового цитоскелета использовали коэффициент локальной связанной фрактальной размерности (LCFD), который характеризует локальные нарушения геометрии неоднородных геометрических объектов и является косвенной мерой оценки структурной целостности такого сложного геометрического объекта, каким является актиновый цитоскелет распластанных клеток. С помощью измерения LCFD конфокальных изображений клеток, окрашенных родамин-фаллоидином, количественно оценивали изменения структурной целостности актинового цитоскелета в процессе репликативного старения. Обнаружено, что с 8-ого по 11 пассаж происходит частичная разборка актинового цитоскелета с последующей сборкой к 17-му пассажу.

Ключевые слова: актиновый цитоскелет, α -актинин-4, RhoA, мезенхимные стволовые клетки, репликативное старение

DOI: 10.31857/S0041377121020036

Актуальной задачей клеточной и молекулярной биологии является получение и сравнительные характеристики МСК человека, выделенных из разных источников. В настоящее время наблюдается тенденция к расширению и углублению исследований по различным характеристикам МСК. Этому посвящено множество работ, перечисленных в недавно вышедшей обзорной статье (Бобков, Полянская, 2020). Эта тенденция отражает значимость таких работ как для понимания функционирования различных клеточных систем, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине.

Одной из характеристик, свойственной всем неморализованным клеточным линиям, включая МСК, является репликативное старение, на завершающей стадии которого, как правило, происходит дегенерация и гибель клеток. Но известны и случаи как длительного существования живых клеток с очень низкой пролиферативной активностью без спонтанного приобретения неограниченного пролиферативного потенциала, так и возможного переключения клеток на другой метаболический путь (Hauflick, 1965; Matsumura et al., 1979; Гаврилов, Гаврилова, 1991).

Репликативное старение МСК человека, наступающее в процессе длительного культивирования клеточных популяций, представляет собой комплексный динамический процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими нарушениями

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки; LCFD — локальная связанная фрактальная размерность.

(Бобков, Полянская, 2020). Одной из характеристик, широко не освещенных в литературе, является состояние цитоскелета в процессе репликативного старения. В нашей предыдущей работе, проведенной на клетках линии MSCWJ-1, полученной из Вартонова студня пупочного канатика человека, было показано, что на поздних стадиях репликативного старения в клетках увеличивается структурная целостность акто-миозиновой сократительной системы, увеличивается концентрация малой ГТФазы RhoA в цитоплазме, изменяется характер клеточного движения (миграция) – оно становится более прямолинейным (Bobkov et al., 2020).

Представленная работа является продолжением предыдущих исследований. В работе исследована роль α -актинина-4 и RhoA в организации актинового цитоскелета. Молекулы малых ГТФаз Rho, к которым относится RhoA, образуют сигнальную сеть, которая получает и обрабатывает информацию от клеточного микроокружения, а затем регулирует перестройку актинового цитоскелета. RhoA, в частности, принимает непосредственное участие в регуляции образования актиновых стресс-фибрилл и сокращения актомиозина (Kim et al., 2018; Aslan, 2019). Роль α -актинина-4 заключается в том, что он связывает актиновые микрофиламенты в пучки и способствует постоянному обновлению актиновых фибрилл, конкурируя с тропомиозином (Kemp, Brieher, 2018).

В работе стояли следующие задачи: 1) длительное культивирование клеток линии ADH-MSC, выделенных из эпикардиальной жировой ткани человека; 2) характеристика процесса репликативного старения с помощью сравнительного анализа доли клеток, проявляющих активность фермента β -галактозидазы на различных пассажах; 3) анализ колоколизации белков RhoA и альфа-актинин-4 как с F-актином, так и с ядрами; 4) измерение локальной связной фрактальной размерности актинового цитоскелета с целью численной оценки его структурной целостности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Клеточная линия мезенхимных стволовых клеток ADH-MSC, выделенная из эпикардиальной жировой ткани человека в процессе аортокоронарного шунтирования, получена и охарактеризована в ЦКП “Коллекции культур клеток позвоночных” ИИЦ РАН (Санкт-Петербург) (Мусорина и др., 2019). Микробиологический анализ подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации в полученной линии. Линию клеток культивировали, используя ростовую среду, состоящую из 85% среды α -MEM (Биолот, Россия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США), 5 нг/мл фактора роста β -FGF (Sigma-Aldrich, США).

Морфологический анализ. Клетки исследуемой линии в процессе длительного культивирования анализировали с помощью инвертированного микроскопа, оснащенного объективами с увеличением 20 \times и 40 \times (Nicon, Япония).

Репликативное старение клеток. Оценивали активность фермента β -галактозидазы. Клетки ADH-MSC выращивали в чашках Петри диаметром 3.5 см до образования субконфлюента. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов (Senescence β -galactosidase staining kit; Cell Signaling, США) согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу репликативного старения, цитоплазма имеет ярко-синюю окраску. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа (Nicon, Япония) на 9-, 12- и 17-м пассажах. Долю окрашенных клеток (%) определяли путем подсчета более 700 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия для выявления белков RhoA и α -актинина-4. Перед иммунофлуоресцентным окрашиванием клетки ADH-MSC, выращенные на стеклах, фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида на фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в течении 10 мин при комнатной температуре. Пермеабиллизацию клеток проводили 10 мин в растворе 0.1%-ного Triton-X100 в PBS. Для предотвращения неспецифического связывания антител стекла с клетками выдерживали 20 мин в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела, выработанные против синтетического пептида, соответствующего аминокислотному участку 28–38 α -актинина-4 человека (Enzo Biochem, США) и кроличьи поликлональные антитела к аминокислотному участку 177–189 белка RhoA человека (Sigma-Aldrich, США). Вторичными антителами были козьи антитела, выработанные против антител кролика, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США). Время инкубирования клеток с первичными и вторичными антителами – 1 ч. Далее клетки инкубировали 20 мин в PBS, содержащем родамин-фаллоидин (50 мкг/мл), для визуализации актинового цитоскелета (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst33342 в концентрации 1.5 мкг/мл (Thermo Fisher Scientific, США). После каждого этапа окрашивания клетки трижды промывали PBS. Препарат с клетками монтировали на стекло с помощью ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, США).

Изображения окрашенных клеток получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TSC SP8 (Германия), используя 63-кратный объектив с масляной иммерсией (Leica, Германия). Для возбуждения флуоресценции родамин-фаллоидина и Alexa Fluor 488 использовали HeNe- (543 нм) и аргоновый (488 нм) лазер соответ-

ственно. Для возбуждения флуоресценции Hoechst 33342 использовали диодный лазер (405 нм). Флуоресценцию детектировали с помощью фотоумножителей в следующих спектральных диапазонах: 493–540 нм для Alexa Fluor 488, 552–792 нм для родамин-фаллоидина и 410–500 нм для Hoechst 33342. Ширина оптического среза (пинхол) составляла 100 мкм. Производили раздельное сканирование в трех каналах: Alexa Fluor 488, родамин-фаллоидин, Hoechst 33342.

Анализ колокализации RhoA и α -актинина-4 с ядром и с актиновым цитоскелетом. Для анализа колокализации использовали изображения с разрешением 1024×1024 пикселя. В программе ImageJ 1.52i на изображениях выделяли вручную области интереса с помощью функции ROI (Rueden et al., 2017). С помощью плагина Coloc2 в выбранных ROI рассчитывали непараметрический коэффициент корреляции Кендалла (bTau) в качестве коэффициента колокализации. Был выбран именно коэффициент Кендалла, так как ранее в нашей работе с клетками линии MSCWJ-1 было показано, что этот коэффициент лучше остальных отражает изменения колокализации актин-связывающих белков (Bobkov et al., 2020). В качестве отрицательного контроля вычисляли коэффициент bTau для оценки колокализации сигналов от конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 вторичных антител (без применения первичных) с родамин-фаллоидином или Hoechst 33342. Для регистрации изображений использовали те же настройки конфокального микроскопа.

Оценка локальной связной фрактальной размерности актинового цитоскелета. Чтобы охарактеризовать морфологию цитоскелета, оценивали коэффициент, называемый локальной связной фрактальной размерностью актинового цитоскелета (local connected fractal dimension – LCFD). Коэффициент LCFD характеризует локальные нарушения геометрии неоднородных геометрических объектов. В отличие от глобальной фрактальной размерности, рассчитываемой для всего изображения, набор значений локальной фрактальной размерности рассчитывается для каждого пикселя, принадлежащего анализируемому объекту (Waliszewski, 2016). Измерение коэффициента LCFD является косвенной мерой связности для количественной оценки такого сложного геометрического объекта, как актиновый цитоскелет любой фибробластоподобной клетки при монослойном культивировании (Qian et al., 2012; Alhusein et al., 2016; Bobkov et al., 2020). Этот коэффициент изменяется в диапазоне от 0 до 2 в зависимости от степени сложности структуры (от количества деталей в структуре). LCFD актинового цитоскелета считали с помощью плагина FgacLac в программе ImageJ (Karperien, 2013). Обработывали конфокальные изображения в разрешении 1024×1024 пикселя, полученные при регистрации сигнала от родамин-фаллоидина, на которых вручную выделяли с помощью функции ROI области интереса, содержащие распластанные клетки.

Методы статистического анализа. Результаты по оценке репликативного старения обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$. Сбор информации для статистической обработки остальных результатов происходил с помощью электронных таблиц Office Excel 2016 (Microsoft, США). Учитывали следующие данные для клеток каждого пассажа: коэффициент колокализации (bTau) RhoA с ядром, RhoA с F-актином, α -актинина-4 с ядром и α -актинина-4 с F-актином (для каждого эксперимента число повторов $n = 20$), а также параметр LCFD. Всю статистическую обработку результатов вели в свободной программной среде R версии 3.6.3 (Team, 2020). Данные, полученные при анализе колокализации, не прошли тест Шапиро–Уилка (Shapiro, Francia, 1972) на нормальность распределения, объем выборки был небольшим ($n < 100$), поэтому для выявления достоверных отличий между группами измерений использовали непараметрический метод Вилкоксона (Wilcoxon, 1945). Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология клеток. Проведенная в процессе культивирования оценка морфологии клеток линии ADH-MSC показала однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками, проявляющими тенденцию к увеличению размеров и распластанности в процессе репликативного старения (данные не представлены).

Репликативное старение. Процесс репликативного старения клеток линии ADH-MSC оценивали по активности β -галактозидазы в клеточных популяциях (табл. 1). Уже на 9-м пассаже обнаружена небольшая доля стареющих клеток, которая существенно увеличивается к 12-му пассажу ($P < 0.01$). Процесс репликативного старения протекает быстро, и к 17-му пассажу доля стареющих клеток увеличивается в 3.2 раза по сравнению с пассажем 9 ($P < 0.01$), что свидетельствует о наступлении активного репликативного старения. Эти результаты совпадают с полученными ранее для клеток этой же линии (Мусорина и др., 2019; Воронкина и др., 2020).

Колокализация. Чтобы проследить за динамикой реорганизации сократительного аппарата в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC, мы использовали метод иммуофлуоресценции. Были получены изображения клеток на 8–17-ом пассажах, окрашенных на белки RhoA и α -актинин-4, актиновый цитоскелет и ядра. Примеры таких изображений представлены на рис. 1. На изображениях можно видеть клетки с характерно окрашенными ядрами (крупные объекты овальной формы; рис. 1а, г), а также с окрашенным актиновым цитоскелетом (нити филаментов, тянущиеся через всю клетку и

Таблица 1. Доля клеток (%) с выраженной активностью β -галактозидазы (β -гал) в процессе культивирования клеток ADH-MSC

Пассажи	Число проанализированных клеток	Доля клеток, окрашенных на β -гал, %
9	743	17.6 ± 1.4
12	726	32.8 ± 1.7
17	1287	56.5 ± 1.4

Примечание. Даны средние значения и их ошибки для доли клеток на каждом пассаже.

собранные в пучки в областях, близких к цитоплазматической мембране; рис. 1*в, е*) и с окрашенными белками RhoA и α -актинином-4 (точечные объекты, концентрирующиеся преимущественно в цитоплазме и в ядрах; рис. 1*б, д*).

При дальнейшем анализе полученных результатов была построена линейная регрессия для коэффициентов колокализации RhoA и α -актина-4 с ядром и F-актином клетки с целью выяснения их распределения относительно ядра и актиновых фибрилл в процессе длительного культивирования клеточной линии. В результате было обнаружено, что

по мере культивирования с увеличением номера пассажа происходит снижение колокализации с F-актином как α -актина-4, так и RhoA на 8–17 пассажах (рис. 2*в, г*; табл. 2). Колокализация α -актина-4 и RhoA с ядрами, наоборот, увеличивается при увеличении номера пассажа (рис. 2*а, б*; табл. 2).

Значения коэффициентов корреляции b_{Tau} в каждом эксперименте и результат непараметрического теста Вилкоксона на значимость отличий средних значений коэффициентов b_{Tau} от начального, измеренного на 8-ом пассаже, представлены в табл. 3. Большинство значений b_{Tau} для разных пассажей достоверно отличаются от пассажа 8. Средние значения (и стандартное отклонение) отрицательного контроля для коэффициентов колокализации составляли 0.03 ± 0.03 для колокализации с ядром, 0.03 ± 0.07 для колокализации с F-актином ($n=10$).

Локальная связная фрактальная размерность цитоскелета. Анализ LCFD актинового цитоскелета при культивировании клеток линии ADH-MSC от 8-го до 17-го пассажа свидетельствует об изменении параметра LCFD в процессе репликативного старения (рис. 3). Приведенные в табл. 4 средние значения коэффициента LCFD для пассажей 8–11 свидетельствуют о его постепенном снижении. На 11-м пассаже его значение минимально. После пассажа 11 наблюдается повышение коэффициента LCFD,

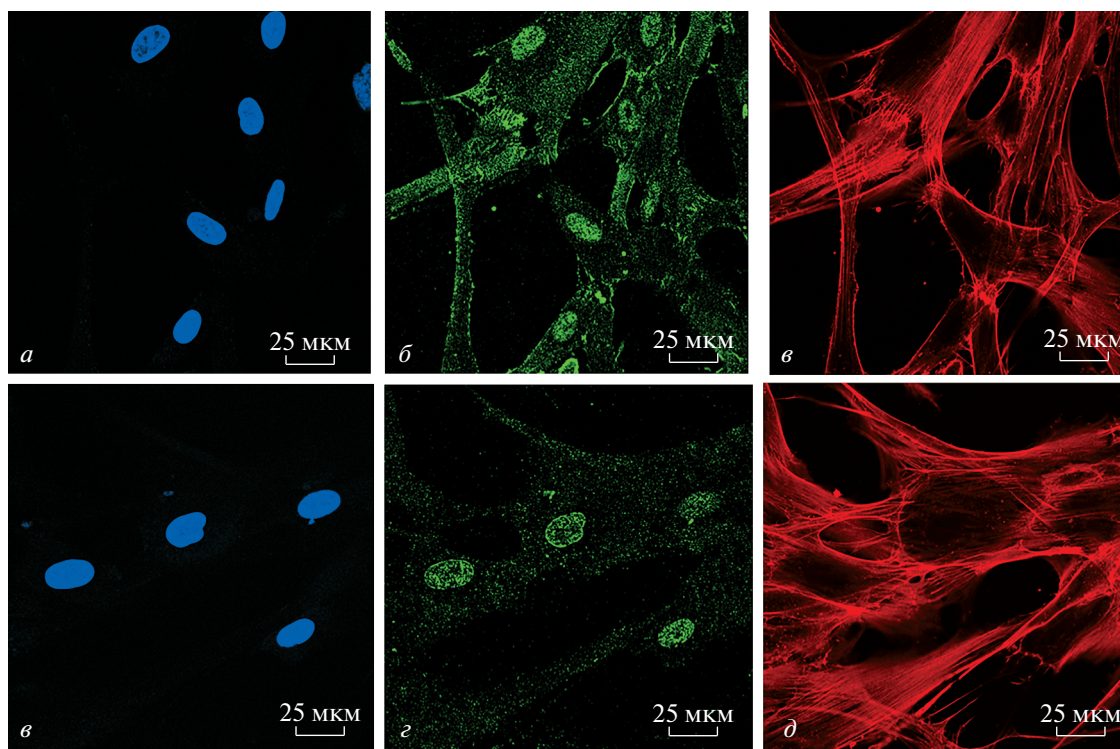


Рис. 1. Конфокальные изображения клеток линии ADH-MSC, выращенных на стеклах и зафиксированных на 16-ом пассаже. Клетки окрашены красителем Hoechst 33342 для визуализации ядер (*а, с*), флуоресцентно мечеными антителами против α -актина-4 (*б*) и против малой ГТФазы RhoA (*д*), а также родамин-фаллоидином для окраски F-актина (*в, е*). Масштабный отрезок : 25 мкм.

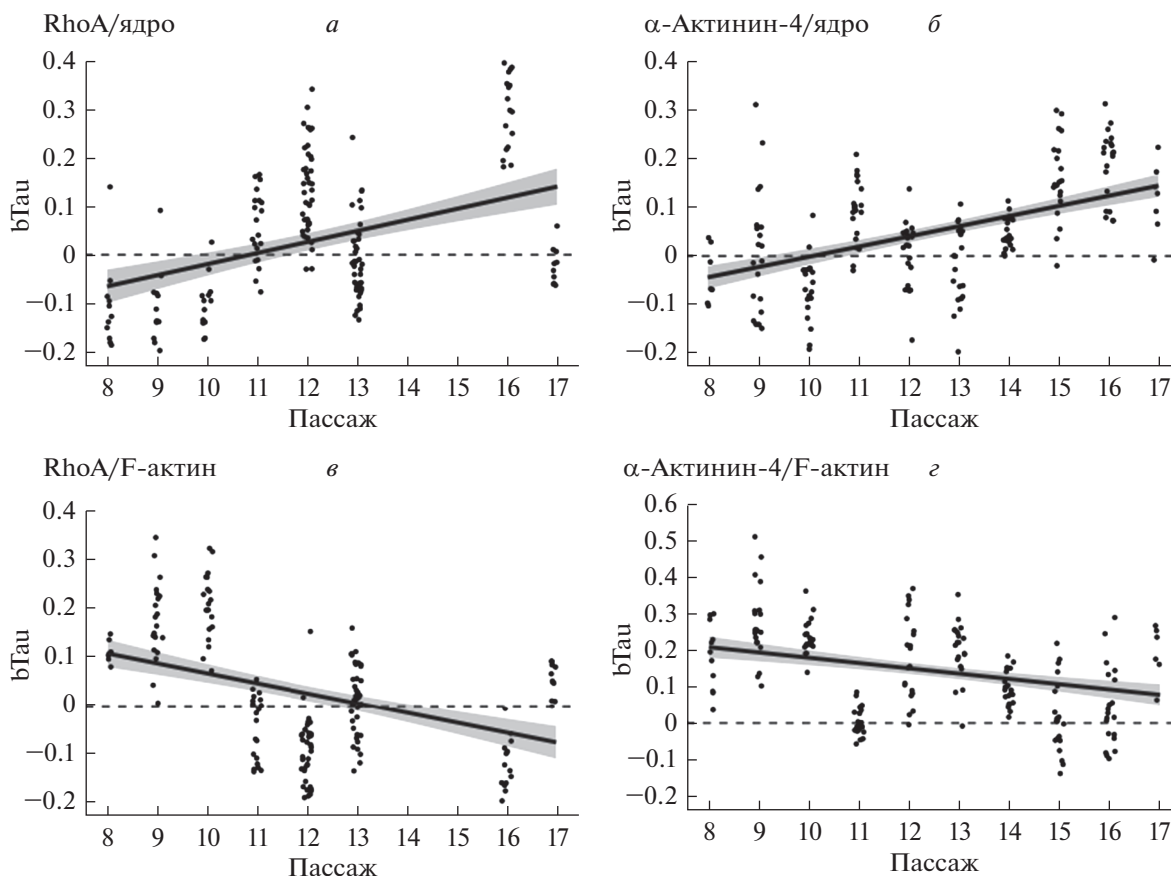


Рис. 2. Зависимость коэффициента колокализации $b\tau_{\text{ау}}$ от времени культивирования (номера пассажа) в клетках ADH-MSC в процессе репликативного старения. На диаграммах *точками* представлены результаты измерений коэффициента колокализации RhoA (а) и α -актинина-4 (б) с ядром, RhoA (в) и α -актинина-4 (з) с F-актином. Номера пассажей считали от выделения клеток из ткани донора. *Прямые линии* – результат расчета линейной регрессии коэффициентов $b\tau_{\text{ау}}$ в зависимости от номера пассажа. *Вдоль линий регрессии серая полоса* показывает 95%-ые доверительные области. *Штриховая линия* – уровень $b\tau_{\text{ау}} = 0$.

который к пассажиру 14 достигает значения, не отличающегося от пассажа 8, и остается на этом уровне до пассажа 17 (рис. 3). Таким образом, коэффициент LCFD на пассаже 8 значительно отличается от других значений только на пассажах 9–13.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тенденция клеток линии ADH-MSC к увеличению размеров и расплывчатости в процессе репликативного старения была наглядно продемонстрирована ранее (Мусорина и др., 2019).

Таблица 2. Параметры линейной регрессии коэффициентов колокализации $b\tau_{\text{ау}}$ в зависимости от номера пассажа в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC

Колокализация	Параметр регрессии a	Параметр регрессии b	R^2	P
RhoA с F-актином	0.308	-0.024	0.220	1.407e-12
RhoA с ядром	-0.357	0.031	0.265	3.816e-15
α -Актинин-4/F-актин	0.324	-0.015	0.112	7.431e-07
α -Актинин-4/ядро	-0.218	0.021	0.294	<2.2e-16

Примечание. Представлены параметры a, b уравнения линейной регрессии $y = (a + b)x$, где x – номера пассажей, y – коэффициент колокализации $b\tau_{\text{ау}}$. Для каждой линейной регрессии указаны коэффициент детерминации (R^2) и уровень значимости P . Экстремально низкие значения P представлены в экспоненциальной нотации.

Таблица 3. Значения коэффициента b_{Tau} , вычисленные для колокализации с F-актином или ядром белка RhoA и α -актинина-4 в клетках ADH-MSC, выращенных на стеклах и зафиксированных на различных пассажах

Пассаж	RhoA–F-актин	RhoA–ядро	α -Актинин-4–F-актин	α -Актинин-4– ядро
8	0.113 ± 0.044	-0.111 ± 0.078	0.188 ± 0.073	-0.025 ± 0.073
9	$0.177 \pm 0.084^{\text{б}}$	-0.161 ± 0.094	$0.274 \pm 0.104^{\text{б}}$	0.009 ± 0.128
10	$0.218 \pm 0.084^{\text{г}}$	-0.152 ± 0.087	$0.235 \pm 0.048^{\text{а}}$	$-0.079 \pm 0.083^{\text{а}}$
11	$-0.045 \pm 0.067^{\text{г}}$	$0.058 \pm 0.073^{\text{г}}$	$0.003 \pm 0.039^{\text{г}}$	$0.092 \pm 0.066^{\text{г}}$
12	$-0.109 \pm 0.076^{\text{г}}$	$0.133 \pm 0.091^{\text{г}}$	0.180 ± 0.116	0.005 ± 0.068
13	$0.010 \pm 0.070^{\text{г}}$	$-0.008 \pm 0.081^{\text{г}}$	0.199 ± 0.080	-0.021 ± 0.081
14	–	–	$0.094 \pm 0.046^{\text{г}}$	$0.049 \pm 0.032^{\text{б}}$
15	–	–	$0.017 \pm 0.101^{\text{г}}$	$0.160 \pm 0.084^{\text{г}}$
16	$-0.160 \pm 0.078^{\text{г}}$	$0.312 \pm 0.082^{\text{г}}$	$0.043 \pm 0.110^{\text{г}}$	$0.187 \pm 0.073^{\text{г}}$
17	$0.049 \pm 0.036^{\text{г}}$	$-0.027 \pm 0.043^{\text{б}}$	0.190 ± 0.083	$0.112 \pm 0.067^{\text{г}}$

Примечание к табл. 3 и 4. Представлены средние значения и стандартные отклонения. Значимость отличий от пассажа 8 (тест Вилкоксона на множественную проверку гипотез): ^а $P < 0.05$, ^б $P < 0.01$, ^в $P < 0.001$, ^г $P < 0.0001$.

По результатам исследования колокализации RhoA и α -актинина-4 с ядром и актиновым цитоскелетом можно предположить, что в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC участники реорганизации цитоскелета RhoA и α -актинин-4 частично выходят из цитоплазмы, перестают взаимодействовать с актиновым цитоскелетом и направляются в ядро. При этом результаты измерений параметра LCFD свидетельствуют о том, что снижение содержания α -актинина-4 в цитоплазме не приводит к уменьшению структурной целостности актинового цитоскелета. Мы предполагаем, что такой эффект может объясняться тем, что на поздних пассажах основную роль в стабилизации пучков актиновых микрофиламентов в клетках этой линии на-

чинают играть другие актин-связывающие белки, например α -актинин-1 или различные изоформы тропомиозинов, что, как следствие, может изменять параметры клеточной подвижности. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные эксперименты.

О роли белков RhoA и α -актинина-4 в цитоплазме известно достаточно много (Ridley, Hall, 1992; Burridge, Wennerberg, 2004; Senger et al., 2019), тогда как функции этих белков в ядре в настоящее время активно изучаются (Хотин и др., 2009; Guilluy et al., 2011; Dubash et al., 2011). Можно предположить, что RhoA и α -актинин-4 в процессе репликативного старения направляются в ядро для регуляции организации ядерного актинового цитоскелета. Известно, что актин является частью ядерного протеома, хотя в ядре он выявляется в значительно меньшем количестве, чем в цитоплазме (Grosse, Vartiainen, 2013). В ядрах клеток самых разных организмов был обнаружен актин как в G-, так и в F-форме. Актин в ядре способен влиять на такие процессы, как регуляция транскрипции, репарация ДНК, регуляция клеточного цикла и апоптоз (Miyamoto et al., 2011; Miyamoto, Gurdon, 2013; Parisi et al., 2017; Kelsch, Tootle, 2018; Plessner, Grosse, 2019).

Следует отметить, что RhoA и α -актинин-4 могут направляться в ядро для участия в процессах, не связанных с актиновым цитоскелетом. В недавнем исследовании на клетках остеосаркомы было показано, что α -актинин-4 может активировать сигнальный путь транскрипционного фактора NF- κ B (Huang et al., 2020). Ранее на раковых клеточных линиях было показано, что RhoA способен связываться с анти-апоптотическим фактором P50 (компонент NF- κ B) в ядре и частично в ядрышках (Xu et al., 2013). Позже было выяснено, что ядрышковая локализация RhoA может быть связана с активным синтезом рРНК, ингибирование которого вызывает пе-

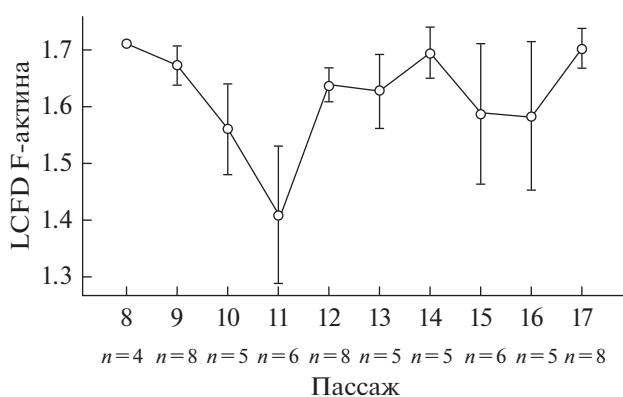


Рис. 3. Изменение коэффициента локальной связной фрактальной размерности (LCFD) актинового цитоскелета на различных пассажах в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC. По вертикальной оси представлены значения LCFD, по горизонтальной оси — номера пассажей клеточной культуры. Показаны средние значения и стандартные отклонения (вертикальные отрезки) значений LCFD. n — число независимых измерений на каждом пассаже.

перераспределение ядрышкового RhoA в нуклеоплазме (Li et al., 2016).

Следует подчеркнуть, что картина изменений локализации RhoA и α -актина-4 с ядром в клетках линии ADH-MSC, выявленная в данном исследовании, значительно отличается от тех результатов, которые были получены нами ранее при исследовании репликативного старения клеток линии MSCWJ-1. В клетках MSCWJ-1 мы обнаружили, что на поздних пассажах и RhoA, и α -актинин-4 в значительной мере выходят из ядра и локализуются, в основном, в цитоплазме (Bobkov et al., 2020), а в настоящей работе эти белки, наоборот, к поздним пассажам накапливаются в ядрах. Кроме того, клетки линий MSCWJ-1 и ADH-MSC выделены из разных источников, клетки линии MSCWJ-1 выделены из Вартонова студия пупочного канатика здорового донора, а клетки линии ADH-MSC — из эпикардиальной жировой ткани донора при аортокоронарном шунтировании, т.е. донора с сердечным заболеванием.

Подробный анализ линии ADH-MSC показал, что она существенно отличается по ряду других характеристик от МСК, выделенных из разных других источников, но от здоровых доноров. К таким характеристикам относятся: преждевременное репликативное старение, существенные цитогенетические нарушения, изменение содержания белков ВКМ и активностей металлопротеиназ при репликативном старении. Возможно, причиной таких различий является нездоровое микроокружение, в котором клетки находились еще до перевода в состояние *in vitro* (Мусорина и др., 2019; Воронкина и др., 2020). Для того, чтобы понять, является ли характер ядерно-цитоплазматического распределения актин-связывающих белков в процессе репликативного старения специфическим признаком конкретной линии, или является признаком линий клеток, выделенных из здорового микроокружения, необходимо проведение исследований линий МСК, полученных из разных источников, но от здоровых доноров.

Результаты измерения параметра LCFD актинового цитоскелета свидетельствуют о том, что в ходе репликативного старения в клетках линии ADH-MSC происходит обратимая реорганизация структур актинового цитоскелета: с 8 по 11 пассаж происходит частичная разборка актинового цитоскелета с последующей сборкой к пассажи 17. Можно предположить, что такая реорганизация актинового цитоскелета может быть связана с сигнальными событиями, сопровождающими изменение активности малых ГТФ-аз и их эффекторов и обусловленные генетическими или эпигенетическими факторами. Для проверки этого предположения необходимы дальнейшие исследования по сравнительному анализу роли малых ГТФ-аз в процессе репликативного старения в различных клеточных линиях МСК.

Таблица 4. Значения коэффициента LCFD F-актина в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MS

Пассаж	LCFD F-актина
8	1.712 ± 0.005
9	1.675 ± 0.043 ^a
10	1.562 ± 0.066 ^b
11	1.408 ± 0.119 ^b
12	1.640 ± 0.036 ^b
13	1.628 ± 0.054 ^a
14	1.697 ± 0.037
15	1.588 ± 0.118
16	1.585 ± 0.106
17	1.704 ± 0.043

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bobkov D.E., Polyanskaya G.G. 2020. Клеточные и молекулярные характеристики репликативного старения мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 11. С. 782. (Bobkov D.E., Poljanskaya G.G. 2020. Cellular and molecular characteristics of replicative senescence of human mesenchymal stem cells. Tsitologiya. V. 62. P. 782.)
- Воронкина И.В., Смагина Л.В., Бильдюг Н.Б., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. 2020. Динамика активности матричных металлопротеиназ и содержания белков внеклеточного матрикса в процессе репликативного старения линий мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 3. С. 210. (Voronkina I.V., Smagina L.V., Bilydug N.B., Musorina A.S., Polyanskaya G.G. 2020. Dynamics of matrix metalloproteinases activity and extracellular matrix proteins content of human mesenchymal stem cell lines during replicative aging. Tsitologiya. V. 62. № 3. P. 210 (Cell. Tiss. Biol. V. 14. P. 349).)
- Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. 1991. Биология продолжительности жизни. М.: Наука. 280 с. (Gavrilov L.A., Gavrilova N.S. 1991. The biology of life span: A quantitative approach. M.: Nauka. 280 pp.)
- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммortalизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардиальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. № 4. С. 272. (Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2019. Characterization of a nonimmortalized mesenchymal stem cell

- line isolated from human epicardial adipose tissue. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya)* V. 13. № 4. P. 247).
- Хотин М.Г., Туроверова Л.В., Подольская Е.П., Краснов И.А., Соловьёва А.В., Аксенова В.Ю., Магнуссон К.-Э., Пинаев Г.П., Тентлер Д.Г.* 2009. Исследование ядерных белковых комплексов α -актинина-4 методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. *Цитология*. Т. 51. № 8. С. 684. (*Khotin M.G., Turoverova L.V., Podolskaya E.P., Krasnov I.A., Solovyeva A.V., Aksenova V.Y., Magnusson K.E., Pinaev G.P., Tentler D.G.* 2009. Analysis of nuclear protein complexes comprising α -actinin-4 by 2D-electrophoresis and mass spectrometry. *Cell Tiss. Biol.* V. 3. № 5. P.431. <https://doi.org/519X09050058>) <https://doi.org/10.1134/S1990>
- Alhussein G., Shanti A., Farhat I.A.H., Timraz S.B.H., Alwahab N.S.A., Pearson Y.E., Martin M.N., Christoforou N., Teo J.C.M.* 2016. A spatiotemporal characterization method for the dynamic cytoskeleton. *Cytoskeleton*. V. 73. P. 221. <https://doi.org/10.1002/cm.21297>
- Aslan J.E.* 2019. Platelet Rho GTPase regulation in physiology and disease. *Platelets*. V. 30. P. 17. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1475632>
- Bobkov D., Polyanskaya A., Musorina A., Lomert E., Shabelnikov S., Poljanskaya G.* 2020. Replicative senescence in MSCWJ-1 human umbilical cord mesenchymal stem cells is marked by characteristic changes in motility, cytoskeletal organization, and RhoA localization. *Mol. Biol. Rep.* V. 47. P. 3867. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05476-6>
- Burridge K., Wennerberg K.* 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*. V. 116. P. 167. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00003-0)
- Dubash A.D., Guilluy C., Srougi M.C., Boulter E., Burridge K., García-Mata R.* 2011. The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS One*. V. 6. P. e17380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017380>
- Grosse R., Vartiainen M.K.* 2013. To be or not to be assembled: Progressing into nuclear actin filaments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 14. P. 693. <https://doi.org/10.1038/nrm3681>
- Guilluy C., Dubash A.D., García-Mata R.* 2011. Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat. Protoc.* V. 6. P. 2050. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.411>
- Hayflick L.* 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* V. 37. P. 614.
- Huang Q., Li X., Huang Z., Yu F., Wang X., Wang S., He Z., Lin J.* 2020. ACTN4 promotes the proliferation, migration, metastasis of osteosarcoma and enhances its invasive ability through the NF- κ B pathway. *Pathol. Oncol. Res.* V. 26. P. 893. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00637-w>
- Karperien A.* 2013. FracLac for ImageJ. Charles Sturt University. Colombo. <https://doi.org/10.13140/2.1.4775.8402>
- Kelsch D.J., Tootle T.L.* 2018. Nuclear actin: From discovery to function. *Anatomical Record*. V. 301. P. 1999. <https://doi.org/10.1002/ar.23959>
- Kemp J.P., Briehar W.M.* 2018. The actin filament bundling protein α -actinin-4 actually suppresses actin stress fibers by permitting actin turnover. *J. Biol. Chem.* V. 293. P. 14520. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004345>
- Kim J.G., Islam R., Cho J.Y., Jeong H., Cap K.C., Park Y., Hosain A.J., Park J.B.* 2018. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway. *J. Cell. Physiol.* V. 233. P. 6381. <https://doi.org/10.1002/jcp.26487>
- Li Y., Hu Y., Che L., Jia J., Chen M.* 2016. Nucleolar localization of Small G protein RhoA is associated with active RNA synthesis in human carcinoma HEP-2 cells. *Oncol. Lett.* V. 11. P. 3605. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4450>
- Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L.* 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* V. 34. P. 328.
- Miyamoto K., Gurdon J.B.* 2013. Transcriptional regulation and nuclear reprogramming: Roles of nuclear actin and actin-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 70. P. 3289. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1235-7>
- Miyamoto K., Pasque V., Jullien J., Gurdon J.B.* 2011. Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. *Genes Dev.* V. 25. P. 946. <https://doi.org/10.1101/gad.615211>
- Parisis N., Krasinska L., Harker B., Urbach S., Rossignol M., Camasses A., Dewar J., Morin N., Fisher D.* 2017. Initiation of DNA replication requires actin dynamics and formin activity. *EMBO J.* V. 36. P. 3212. <https://doi.org/10.15252/embj.201796585>
- Plessner M., Grosse R.* 2019. Dynamizing nuclear actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 56. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.08.005>
- Qian A.R., Li D., Han J., Gao X., Di S.M., Zhang W., Shang P.* 2012. Fractal dimension as a measure of altered actin cytoskeleton in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity using 3-D/2-D clinostats. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* V. 59. P. 1374. <https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2187785>
- Ridley A.J., Hall A.* 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. V. 70. P. 389. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7)
- Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W.* 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Shapiro S.S., Francia R.S.* 1972. An approximate analysis of variance test for normality. *J. Am. Stat. Assoc.* V. 67. P. 215. <https://doi.org/10.1080/01621459.1972.10481232>
- Senger F., Pitaval A., Ennomani H., Kurzawa L., Blanchoin L., Théry M.* 2019. Spatial integration of mechanical forces by alpha-actinin establishes actin network symmetry. *J. Cell Sci.* V. 132. P. 236604. <https://doi.org/10.1242/jcs.236604>
- Team R.C.* 2020. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/index.html>
- Xu J., Li Y., Yang X., Chen Y., Chen M.* 2013. Nuclear translocation of small G protein RhoA via active transportation in

gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* V. 30. P. 1878.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2638>

Waliszewski P. 2016. The quantitative criteria based on the fractal dimensions, entropy, and lacunarity for the spatial distribution of cancer cell nuclei enable identification of low or high aggressive prostate carcinomas. *Front. Physiol.* V. 7. P. 34.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00034>

Wilcoxon F. 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin.* V. 1. P. 80.
<https://doi.org/10.2307/3001968>

Analysis of Nuclear-Cytoplasmic Redistribution of Actin-Binding Protein α -Actinin-4 and Signaling Protein RhoA in the Process of Replicative Senescence of Human Epicardial Adipose Tissue-Derived ADH-MS C Cell Line

D. F. Goncharova^a, A. V. Polyanskaya^a, A. S. Musorina^b, G. G. Poljanskaya^b, and D. E. Bobkov^{b, *}

^a*Saint Petersburg State Polytechnic University, Department of Biophysics, St. Petersburg, 194064 Russia*

^b*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

**e-mail: bobkov@incras.ru*

In this work, a molecular analysis of some mechanisms of the actin cytoskeleton reorganization in the process of long-term cultivation of human mesenchymal stem cells was carried out. The distribution of actin-binding protein α -actinin-4 and small GTPase RhoA in mesenchymal stem cells of the ADH-MS C line isolated from adipose tissue of an adult human was studied using immunofluorescence methods and analysis of confocal images. It was found that in the process of replicative senescence during 8–17 passages in ADH-MS C cells, the redistribution of the studied proteins from the cytoplasm to the cell nuclei occurs, which is accompanied by changes in the organization of the actin cytoskeleton. To assess the organization of the actin cytoskeleton, we used the coefficient of local connected fractal dimension (LCFD), which characterizes local disturbances in the geometry of heterogeneous geometric objects and is an indirect measure for assessing the structural integrity of such a complex geometric object as the actin cytoskeleton of spread cells. By measuring the LCFD of confocal images of cells stained with rhodamine phalloidin, changes in the structural integrity of the actin cytoskeleton during replicative senescence were quantified. It was found that from passages 8 to 11, a partial reversible disassembly of the actin cytoskeleton occurs, followed by assembly by the passage 17.

Keywords: actin cytoskeleton, local connected fractal dimension, α -actinin-4, RhoA, mesenchymal stem cells, replicative senescence