

УДК 576.3

Влияние перестройки компонентов клеточной механотрансдукции на транслокацию транскрипционных факторов RUNX2 и RELA при моделировании эффектов микрогравитации на МСК *in vitro*

Якубец Данила Александрович^(*)
Буравкова Л.Б.

lizard_96@mail.ru

ГНЦ РФ — ИМБП РАН, Москва, Россия

Аннотация. Проанализированы изменения компонентов клеточной механотрансдукции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) — от фокальных адгезий и основных компонентов цитоскелета до комплекса линкера цитоскелета и нуклеоскелета (LINC) и нуклеоскелета, и их влияние на транслокацию транскрипционных факторов RUNX2 и RELA — субъединицы р65 фактора NF- κ B при моделировании микрогравитации в течение пяти суток. На основании данных конфокальной микроскопии выявлены изменения содержания и распределения актина, тубулина, виментина, неспринов 1 и 3, белка SUN1 и ламина А/С. Обнаружено снижение содержания общего RUNX2 с компенсаторными изменениями его транслокации в ядро, а также волнообразное изменение содержания RELA со стабильно повышенной относительно статического контроля транслокацией. Регрессионный анализ показал, что транслокация RUNX2 в большей степени зависит от состояния звеньев механотрансдукции, чем транслокация RELA. Полученные данные могут свидетельствовать о снижении остеогенного потенциала МСК и повышении их провоспалительной активации при моделировании микрогравитации, что на уровне костной ткани в условиях реального космического полета может приводить к смещению гомеостаза в сторону остеорезорбции.

Ключевые слова: МСК, моделирование микрогравитации, механочувствительность, RUNX2, NF- κ B, остеорезорбция, остеогенез

Введение. Одним из негативных последствий длительного пребывания человека в условиях невесомости является развитие остеопении, индуцированной гравитационной разгрузкой. Несмотря на широкое исследование и разработку мер противодействий этому процессу, клеточные механизмы данного явления мало изучены. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) — одна из популяций прогениторных клеток взрослого организма. Эти клетки способны к дифференцировке в остеогенном направлении, а также к синтезу биологически активных паракринных факторов, регулируя таким образом гомеостаз и возобновление костной ткани [1]. Существуют данные о том, что в условиях реальной и моделированной микрогравитации происходят изменения звеньев механотрансдукции клеток: от поверхностных рецепторов до цитоскелета и нуклеоскелета. Предположительно, эти перестройки могут влиять на изменение функционирования клеточных сигнальных каскадов [2]. В условиях микрогравитации снижается способность МСК

к дифференцировке в остеогенном направлении, ключевым регулятором которой является транскрипционный фактор RUNX2, работа которого зависит от состояния цитоскелета [3]. Есть свидетельства, перестройки цитоскелета могут оказывать влияние и на функционирование фактора NF- κ B [4, 5]. В контексте остеогенеза эти два фактора во многом антагонистичны, поэтому от баланса их работы будет зависеть смещение гомеостаза костной ткани в сторону остеогенеза, либо остеорезорбции [6, 7]. Поэтому необходимо понимать, каким образом перестройки цитоскелета во время воздействия микрогравитации могут влиять на работу сигнальных каскадов, в частности на транслокацию транскрипционных факторов внутрь ядра.

Целью данной работы был анализ изменений, происходящих со звеньями клеточной механотрансдукции, и сравнение их влияния на транслокацию транскрипционных факторов RUNX2 и RELA.

Материалы и методы, результаты. Моделирование эффектов микрогравитации осуществляли с помощью 3D-клиностата Gravite® (Space Bio-Laboratories Co.,Ltd., Япония). В качестве контроля использовали клетки, находящиеся в термостате в статических условиях. С помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM-900 получали изображения клеток с флуоресцентно меченными паксиллином, актином, тубулином, виментином, белками комплекса LINC — несприном-1, несприном-3 и SUN-1, а также ядерным ламином A/C. Также проводили мечение транскрипционных факторов RUNX2 и RELA — субъединицы p65 фактора NF- κ B. Анализ изображений проводили с помощью программ CellProfiler, Cellpose и ImageJ. В ходе анализа измеряли морфометрические параметры клеток и среднюю интенсивность флуоресценции меченных белков, оценивали сложность организации волокон цитоскелета. Также получали характеристики распределения в клетке окрашенных белков, такие как смещение массы и ядерно-цитоплазматическое соотношение средней интенсивности флуоресценции метки транскрипционных факторов для анализа их транслокации в ядро. Всего проанализировали более 37000 клеток.

Было обнаружено снижение содержания тубулина в среднем на 24 %, а виментина и несприна-3 — на 40 % в клетках экспериментальной группы, начиная с третьих суток моделирования микрогравитации. Содержание белка SUN1 в ядрах клеток было снижено на всех сроках экспозиции до половины от контрольного значения. Содержание ламина A/C снижалось на 33 % относительно статического контроля в первые сутки экспозиции, однако к третьим суткам не отличалось от контроля. Концентрация актина была ниже статического контроля на протяжении первых трех суток экспозиции, однако к пятым суткам превышала его в 1,5 раза. У несприна-1 наблюдалась обратная динамика: пик его содержания в клетках пришелся на третьи сутки экспозиции и почти в два раза превышал контрольные значения, однако к пятым суткам его концентрация снижалась до половины значения статического контроля. Количество точек фокальных адгезий снижалось с третьих суток моделирования микрогравитации.

Обнаружено снижение общего содержания RUNX2 в МСК на всех сроках экспозиции, с минимумом к 72 часам экспозиции (43 % от контроля) и последующей тенденцией к увеличению его содержания (85 % от контроля) к пятым суткам экспозиции). При этом, ядерно-цитоплазматическое соотношение транскрипционного фактора в условиях микрогравитации возрастала до 153 % на первые сутки экспозиции, к третьим суткам снижалось до 75 %, и к пятым суткам снова повышалось до 120 %. Содержание RELA также снижалось до 50 % к 72 часам моделирования микрогравитации, однако в остальных временных точках значимо не отличалось от статического контроля. Транслокация RELA была стабильно выше в экспериментальной группе в среднем на 10–13 % на протяжении всего срока экспозиции. Далее с помощью пошагового регрессионного анализа выявлено, что с высокой вероятностью ($p < 0,0001$) на значение ядерно-цитоплазматического соотношения RUNX2 влияют общее содержание актина, белков несприна-1, SUN1, ламина A/C, и виментина, количество точек фокальных адгезий в клетке, и полученная модель описывает 88,34 % вариабельности значения ядерно-цитоплазматического соотношения RUNX2 ($\text{adj.}R^2 = 0,8834$). При этом, вероятными предикторами для значения ядерно-цитоплазматического соотношения RELA являлись содержание несприна-1, SUN1, тубулина и количество точек фокальных адгезий, однако данная модель описывает лишь 50,4 % вариабельности ($\text{adj.}R^2 = 0,5040$). Полученные результаты свидетельствуют о большей зависимости сигнального пути RUNX2 от состояния звеньев цепи механотрансдукции, чем сигнального пути NF- κ B.

Заключение. Моделирование эффектов микрогравитации на МСК приводит к угнетению как синтеза, так и транслокации транскрипционного фактора RUNX2, что приводит к ослаблению дифференцировки МСК в остеогенном направлении. При этом сигнальный путь NF- κ B не претерпевает подобных изменений в той же степени, что формирует провоспалительный фенотип МСК при моделировании микрогравитации. Синергия сниженного остеогенного потенциала и провоспалительная активация МСК может приводить к смещению баланса костного гомеостаза в сторону остеорезорбции.

*Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований
ГНЦ РФ — ИМБП РАН, проект FMFR-2024-0032.*

Список источников

- [1] Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Григорьев А.И. *Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки человека при «физиологической» гипоксии in vitro*. Москва, ГНЦ РФ — ИМБП РАН, 2016, 256 с.
- [2] Fajardo-Cavazos P., Nicholson W.L. Mechanotransduction in prokaryotes: a possible mechanism of spaceflight adaptation. *Life (Basel)*, 2021, vol. 7, no. 11 (1), art. no. 33. <https://doi.org/10.3390/life11010033>
- [3] Birks S., Uzer G. At the nuclear envelope of bone mechanobiology. *Bone*, 2021, vol. 151, art. no. 116023. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116023>

-
- [4] Mikenberg I., Widera D., Kaus A., Kaltschmidt B., Kaltschmidt C. Transcription factor NF- κ B is transported to the nucleus via cytoplasmic dynein/dynactin motor complex in hippocampal neurons. *PLoS ONE*, 2007, vol. 2 (7), art. no. e589.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000589>
 - [5] Sero J.E., Sailem H.Z., Ardy R.C., Almuttaqi H., Zhang T., Bakal C. Cell shape and the microenvironment regulate nuclear translocation of NF- κ B in breast epithelial and tumor cells. *Mol Syst Biol.*, 2015, vol. 11 (3), art. no. 790.
<https://doi.org/10.15252/msb.20145644>
 - [6] Chang J., Liu F., Lee M., Wu B., Ting K., Zara J.N., Soo C., Hezaimi K.AL, Zou W., Chen X., Mooney D.J., Wang C. NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β -catenin degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, vol. 110 (23), pp. 9469–9474. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300532110>
 - [7] Amarasekara D.S., Kim S., Rho J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 11, no. 22 (6), art. no. 2851.
<https://doi.org/10.3390/ijms22062851>