

## EVALUACIÓN DE FUERZA DE TRACCIÓN CELULAR Y CINÉTICA DE DISOCIACIÓN DE PROTEÍNAS ADHESIVAS MEDIANTE MICROSCOPIA MULTIDIMENSIONAL

Lorena Sigaut (1,3), Micaela Bianchi (2), Lía I. Pietrasanta (1,2,3)

(1) Departamento de Física & Instituto de Física de Buenos Aires, FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina. (2) Centro de Microscopías Avanzadas, FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina. (3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. Email: [lorena@df.uba.ar](mailto:lorena@df.uba.ar), [lia@df.uba.ar](mailto:lia@df.uba.ar)

Las células *sensan* activamente la rigidez de su entorno, ejerciendo fuerzas de tracción a través de complejos macromoleculares denominadas adhesiones focales (AF), que unen físicamente componentes del citoesqueleto con la matriz extracelular, y sirven como puntos de integración para las señales químicas y mecánicas. La regulación de la adhesión celular a la matriz extracelular y la generación de fuerzas de tracción son cruciales para el mantenimiento de la forma celular, la migración y la mecanotransducción; y tienen un rol importante en varios procesos biológicos, como por ejemplo cicatrización, inflamación, embriogénesis o metástasis. La Microscopía de Fuerza de Tracción (TFM) es una técnica que permite cuantificar las fuerzas de tracción generadas por las células adheridas a un sustrato elástico, a partir del procesamiento y análisis de imágenes de nanomarcadores fluorescentes embebidos en el sustrato que actúan como referencia<sup>1</sup>. Si el sustrato es suficientemente blando, la fuerza que ejerce la célula lo deforma entre decenas y centenares de nanómetros, y mediante el análisis de velocimetría por imágenes de partículas (PIV), es posible calcular el campo de deformaciones del sustrato a partir de las imágenes de fluorescencia. Para obtener las fuerzas de tracción generadas por las células basándose en las deformaciones del sustrato y sus propiedades elásticas, se resuelve un problema inverso de mecánica de medios continuos, empleando un método de Regularización de Tikhonov<sup>2</sup>. Con el fin de estudiar los efectos de la elasticidad del sustrato en la generación de fuerzas cultivamos células de epitelio mamario de ratón (HC11) sobre sustratos de poliacrilamida de diferente elasticidad. A partir de los experimentos de TFM confeccionamos mapas de fuerzas de tracción sobre diferentes sustratos, observando que la magnitud de la fuerza generada por las células aumenta al cultivarlas sobre sustratos más rígidos. La cinética de la proteína zixina, considerada la una de las proteínas mecanosensoras de adhesión focal, fue evaluada mediante la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP)<sup>3</sup>. Asumiendo que la cinética de disociación de la zixina desde la adhesión focal es mucho más lenta que la difusión de la proteína libre, el análisis de la curva de recuperación de la fluorescencia nos permitió estimar la constante de disociación de la zixina. De esta manera, el análisis de la cinética de la zixina mediante FRAP reveló una disminución de la constante de disociación a medida que aumenta la rigidez del sustrato. Con el objetivo de correlacionar la posición de las adhesiones focales, las fuerzas ejercidas por las células y la cinética de la proteína zixina, se implementaron en forma conjunta TFM y FRAP en células transfectadas que expresan la proteína zixina fusionada a EGFP. El análisis de los datos indicaría una posible correlación (a nivel de adhesión focal) entre la cinética de disociación de zixina y la magnitud de las fuerzas de tracción ejercida por una adhesión focal: sugiriendo que ejercerían mayor fuerza de tracción las adhesiones focales que presentan una menor constante cinética de disociación para la zixina.

### REFERENCIAS

- [1] Dembo M., Oliver T., Ishihara A., Jacobson K., (1996) "Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method" *Biophys J.* 70(4):2008-2022.
- [2] Hansen P.C., (2007) "Regularization tools version 4.0 for Matlab 7.3" *Numerical Algorithms* 46(2):189-194.
- [3] Lele T., Oh P., Nickerson J.A., Ingber D.E., (2004) "An improved mathematical model for determination of molecular kinetics in living cells with FRAP" *Mechanics & Chemistry of Biosystems* 1(3):181-190.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por ANPCyT, CONICET y UBA. M.B. es becaria doctoral CONICET; L.S. y L.I.P. son investigadoras de CONICET.

## FIGURAS

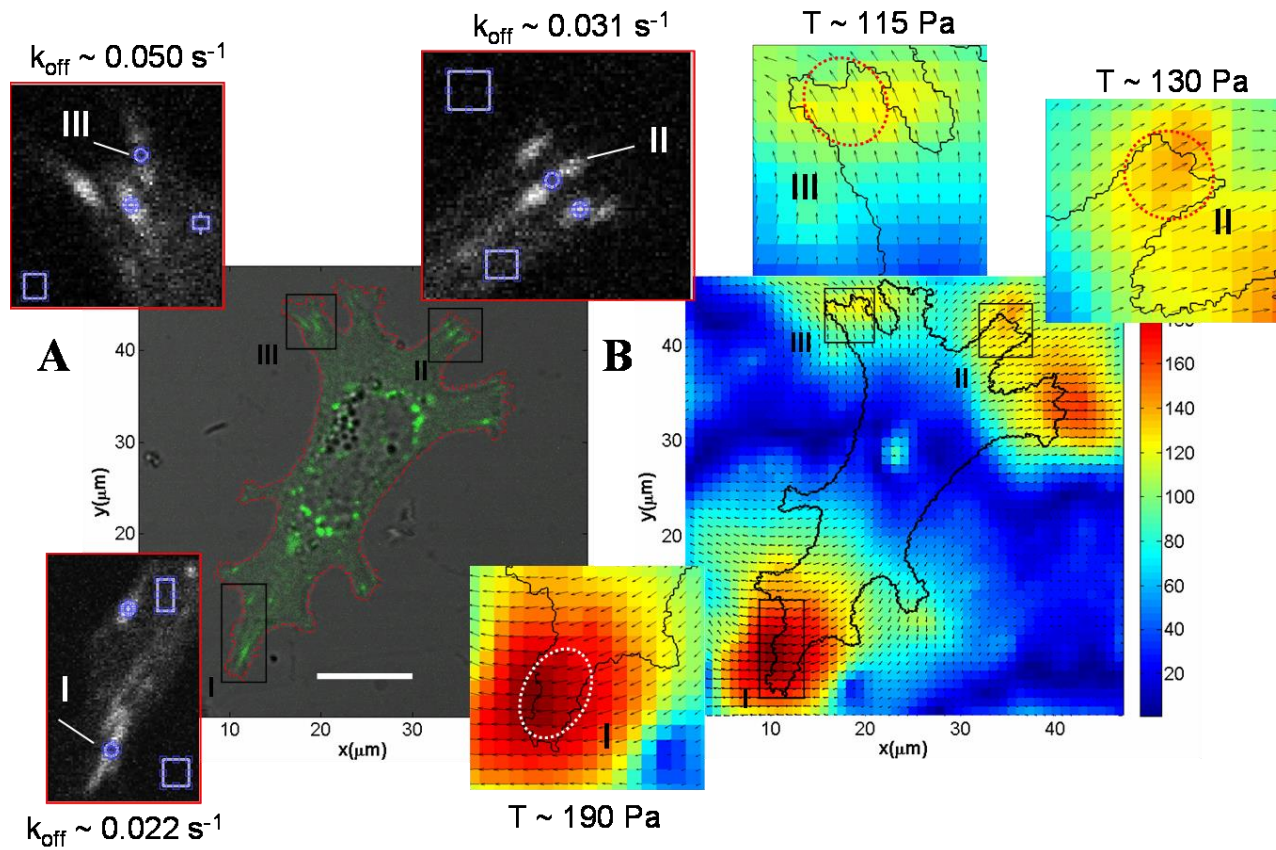


Figura 1: (A) Superposición de las imágenes de transmisión y de fluorescencia de una célula HC11 cultivada sobre un gel de poliacrilamida de elasticidad 4.5kPa expresando la proteína zixina-GFP. I, II y III: ampliaciones de las regiones indicando las adhesiones focales seleccionadas, en cada región se expresa el valor de la constante de disociación de zixina calculada mediante FRAP. Barra de escala 10 $\mu$ m. (B) Mapa de tracción. I, II y III: ampliaciones de las regiones seleccionadas en (A) donde se calcula la tracción promedio en la región indicada. Escala de colores en Pa.