

## МИКРОТРУБОЧКИ НЕОБХОДИМЫ ДЛЯ ВТЯГИВАНИЯ ЛАМЕЛЛЫ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ VERO

© Е. А. Добринских,<sup>1</sup> \* И. А. Воробьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета и <sup>2</sup> Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Москва; \* электронный адрес: eadobrinsk@mail.ru

Методом видеомикроскопии с усилением контраста исследовали изменение поведения фибробластоподобных клеток Vero при воздействии на них 2,3-бутандион монооксида (BDM) и участие структур цитоскелета в этом процессе. BDM является ингибитором полимеризации актина на активном крае в клетках BS-C-1 и Swiss3T3 (Yarrow et al., 2003) и вызывает втягивание ламеллы в клетках PtK2 (Cramer, Mitchison, 1995). Следовательно, он является удобным инструментом для влияния на систему актиновых филаментов в клетке. Воздействие BDM приводит к постепенному уменьшению площади соприкосновения клеток с субстратом — через 5 мин воздействия клетки подтягивают ламеллу, а через 60 мин площадь клеток уменьшается примерно на 70 %. При этом пучки актина деполимеризуются, а сеть микротрубочек, напротив, становится более плотной. Если частично разрушить систему актиновых филаментов, воздействуя на клетки латрункулином В в концентрации 5 нМ, клетки практически не изменяют своей формы и система микротрубочек остается интактной, однако под воздействием BDM такие клетки втягивают ламеллы значительно быстрее. Если деполимеризовать микротрубочки нокодазолом, то площадь клеток уменьшается примерно на 20 % и пучки микрофиламентов гипертрофируются. В отсутствие микротрубочек под воздействием BDM клетки не изменяют своей формы и пучки актина деполимеризуются медленнее, чем в присутствии микротрубочек. Через 1 ч пучки актина остаются гипертрофированными. Полностью пучки актиновых филаментов разрушаются через 24 ч после начала воздействия в 90 % клеток. Если после совместного воздействия нокодазола и BDM удалить из среды инкубации нокодазол, то ламеллы клеток начинают поджиматься через 6 мин, что соответствует времени частичного восстановления системы микротрубочек. Полученные данные позволяют заключить, что в процессе ретракции ламеллы клеток Vero ведущую роль играют микротрубочки, но не стресс-фибриллы.

Ключевые слова: сокращение клеток, ламелла, актин, микротрубочки, 2,3-бутандион монооксид, нокодазол.

Принятые сокращения: BDM — 2,3-бутандион монооксид.

Способность к направленному передвижению и поддержанию поляризованной формы является фундаментальным свойством животных клеток. На движении клеток основаны многие процессы в организме: морфогенетические миграции во время эмбрионального развития, передвижение нервных клеток при формировании нервной системы, хемотаксические перемещения клеток крови и иммунной системы и движение фибробластов в процессе заживления раны (Lauffenburger, Horwitz, 1996; Hangan et al., 1997; Montell, 1999).

Фибробласты и подобные им клетки на стекле обладают поляризованной формой — у них выделяют передний (ведущий) край, выдвигающийся вперед в направлении движения клетки, относительно стабильные боковые края и задний край (хвост), втягивающийся при движении клетки (Abercrombie, 1978; Cramer et al., 1997). Способность фибробласта к передвижению и поддержанию поляризации обеспечивается ее цитоскелетом — системами актиновых филаментов и микротрубочек (Vasiliev et al., 1970; Lauffenburger, Horwitz, 1996).

Выдвижение ламеллы, инициирующее движение большинства клеток, происходит за счет полимеризации актиновых филаментов (Vasiliev, 1991; Mitchison, Cramer, 1995; Mogilner, Oster, 1996; Cramer et al., 1997; Pollard et al., 2000; Pantaloni et al., 2001), и этот процесс регулируется рядом белков. Белки SCAR/WASP стимулируют комплекс Arp 2/3, который является центральным белком, регулирующим динамику и организацию актиновых филаментов на краю клетки (Goode et al., 2001). Поскольку в ламелле актиновые филаменты ветвятся и растут под углом 70° друг к другу, они в совокупности толкают плазматическую мембрану вперед и врастают в образовавшееся пространство своими плюс-концами (Pollard et al., 2000).

Организацию актинового цитоскелета во всех эукариотических клетках контролируют, в частности, G-белки, к которым относятся белки семейства Rho — Rho, Rac и Cdc42 (Maskay, Hall, 1998; Hall, Nobes, 2000). В фибробластах активация Rho приводит к образованию стресс-фибрилл и ассоциации белков в комплекс фокальных контактов. Активация Rac регулирует полимериза-

цию актина *de novo* на периферии клетки, которая необходима для формирования ламеллы, а активация Cdc42 инициирует полимеризацию актина для формирования филоподий. Активация Cdc42 ведет к локальной активации Rac, вероятно, через включение белковых каскадов (Nobes, Hall, 1999). Так же Rho и Rac необходимы для образования фокальных контактов. Rac регулирует обмен фокальных контактов (Hall, Nobes, 2000). Rho, Rac и Cdc42 играют регуляторную роль везде, где используются актиновые филаменты: они вовлечены в процессы клеточного движения, цитокинез, морфогенетические процессы, включающие в себя изменение клеточной формы и полярности (Maskau, Hall, 1998).

В свою очередь актомиозиновая система находится в тесной связи с системой микротрубочек. Так, рост микротрубочек активирует Rac, который через каскад белков вызывает полимеризацию актина и образование ламеллы (Waterman-Storer et al., 1999). Разборка микротрубочек активирует другой белок, Rho, который индуцирует образование стресс-фибрилл и фокальных контактов (Ren et al., 1999). Таким образом, есть все основания предполагать, что через посредство G-белков микротрубочки могут регулировать актомиозиновую систему.

Фибробластоподобным клеткам для направленного движения наряду с актиновой системой необходимы микротрубочки (Wittman, Waterman-Storer, 2001; Omelchenko et al., 2002; Peterson, Mitchison, 2002). Они участвуют в поддержании поляризованной формы фибробласта, организуют внутриклеточный транспорт, направляя перемещение органелл и везикул по ламелле к переднему краю клетки (Rodionov et al., 1993; Bershadsky, Futerman, 1994; Wacker et al., 1997). При подавлении транспорта вдоль микротрубочек полярность клетки нарушается и фибробласт перестает ползти (Rodionov et al., 1993). Однако роль микротрубочек в сокращении клетки практически не исследована. Показано лишь, что микротрубочки обеспечивают эффективный обмен фокальных контактов (Bershadsky et al., 1996; Kaverina et al., 1998, 1999; Grosheva et al., 2000).

Поэтому в настоящем исследовании мы попытались выяснить сравнительный вклад двух компонентов цитоскелета в поддержание распластанной формы клеток, используя различные ингибиторы.

Задачей настоящей работы было изучение процесса ретракции клетки, для чего был использован 2,3-бутандион моноксим (BDM). Известно, что BDM является ингибитором АТФазной активности миозинов II и V *in vitro* (Higuchi, Takemori, 1989). *In vitro* BDM подавляет сокращение мышечных клеток (McKillop, 1994), вызывает стягивание ламеллы в клетках PtK2 (Cramer, Mitchison, 1995) и подавляет полимеризацию актина на лидирующем крае в клетках BS-C-1 и Swiss3T3 (Yarrow et al., 2003), являясь, таким образом, удобным инструментом для влияния на систему актиновых филаментов в клетке.

### Материал и методика

Клеточная культура. В качестве объекта исследования были использованы клетки перевивной линии Vero (фибробластоподобные клетки почки зеленой мартышки, полученные из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН). Клетки культивировали при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в среде DMEM/F12 (Sigma, США) с до-

бавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина (100 мкг/мл).

Клетки культивировали в течение 1 сут, высевая их в низкой концентрации на покровные стекла (для экспериментов с фиксированными клетками) или в малые чашки Петри с вмонтированными в дно покровными стеклами (для прижизненных наблюдений).

Экспериментальные воздействия. BDM (Sigma, США) добавляли в среду культивирования в конечной концентрации 20 мМ. Клетки фиксировали через 0, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 60 мин воздействия и окрашивали для выявления микротрубочек и актиновых филаментов. Удаление BDM из среды культивирования (в экспериментах, где это было необходимо) производили двукратной сменой среды.

Для деполимеризации микротрубочек в среду культивирования добавляли нокодазол (Sigma, США) в конечной концентрации 4 мкг/мл. 2-часовая инкубация клеток с нокодазолом приводила к полной деполимеризации микротрубочек. Через 2 ч нокодазол удаляли из среды культивирования путем трехкратной смены среды и инкубировали клетки в среде без нокодазола в течение 2, 4, 6, 10, 20, 30 и 60 мин.

В ряде экспериментов исследовали последовательное воздействие нокодазола и BDM на клетки. Для этого добавляли BDM (20 мМ) в среду культивирования в момент удаления нокодазола (уже в первую смену среды) и проводили восстановление системы микротрубочек в его присутствии в течение 2, 4, 6, 10, 20, 30 и 60 мин.

Для исследования комплексного воздействия нокодазола и BDM оба вещества добавляли в среду культивирования последовательно: инкубировали клетки с нокодазолом (4 мкг/мл) в течение 2 ч, затем, не удаляя нокодазол, вводили BDM (20 мМ) и фиксировали клетки через 0, 10, 20, 30, 60 мин и 24 ч.

Для разрушения сети актиновых филаментов в среду культивирования добавляли латрункулин В (Calbiochem, США) в конечной концентрации 5 нМ на 10 мин.

Маточные растворы BDM, нокодазола и латрункулина В готовили, используя диметилсульфоксид (ДМСО). Использованные в экспериментах концентрации ДМСО составляли не более 1 % и не влияли на состояние цитоскелета.

Прижизненные наблюдения. Анализ препаратов проводили на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TE200 с помощью объективов Nikon 40×/0.75 и Nikon 63×/1.4. Полученные изображения посылали в компьютер с помощью охлаждаемой CCD-камеры RTE/CCD-1317K/2, управляемой программой WinWiew32 (Princeton Instruments Inc., США). Экспозиция составляла 0.3 с, а интервал между кадрами — 30 с. Во время прижизненных наблюдений на поверхность культуральной среды наносили минеральное масло (MINERAL OIL, WALGREENS). Для уменьшения фотоповреждения клеток использовали оранжевый светофильтр (OC-4). Во время наблюдений температуру 35—37 °C поддерживали за счет нагрева объектива и держателя для камеры.

Иммунофлуоресцентные исследования. Клетки фиксировали 1.5%-ным глутаральдегидом (Merck, Германия) на фосфатном буфере PBS (pH 7.2) 10 мин. После фиксации клетки отмывали от глутаральдегида путем трехкратной смены буфера PBS (по 10 мин каждая смена). Фиксированные клетки для экстракции обрабатывали 1%-ным раствором Triton X-100 (Sigma, США)



на PBS в течение 1.5 ч. Для предотвращения фонового свечения клетки обрабатывали 3 раза по 10 мин 2%-ным раствором  $\text{NaBH}_4$  (Sigma, США) и отмывали путем трехкратной смены буфера PBS (по 10 мин каждая смена). Для выяснения и анализа системы микротрубочек и актинового цитоскелета проводили двойную иммунофлуоресцентную окраску клеток антителами к  $\beta$ -тубулину и фаллоидином. Использованные для окраски как первые, так и вторые антитела были коммерческими. Клетки окрашивали фаллоидином, конъюгированным с FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), в разведении 1 : 16, а затем антителами к  $\beta$ -тубулину (Amersham, США) в разведении 1 : 100. В качестве вторых антител использовали меченные флуорохромом Oregon green антитела (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 100. Окраску каждым из трех антител проводили в течение 30 мин при 37 °С. Избыток антител в каждом случае отмывали путем трехкратной смены буфера PBS (по 10 мин каждая смена). Полученные препараты заключали в Moviol 4-88 (Sigma, США) и монтировали на предметных стеклах.

Анализ полученных данных. Обработку фотографий проводили в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc., США). Полученные filmy обрабатывали в программах Scion Image (Scion Corporation, США) и MetaMorph (Universal Imaging, США).

Статистические данные обрабатывали в программах SigmaPlot (Jandel Scientific, США) и Statistica (StatSoft Inc., США). Достоверность отличий оценивали по критерию Манна—Уитни (непараметрический анализ).

## Результаты и обсуждение

Морфология анализируемых в настоящей работе клеток Vero соответствует классическому строению фибробласта (Abercrombie, 1978): клетки имеют ламеллу, тело и хвост (рис. 2, а). При редком расположении на

стекле клетки поляризованы и активно передвигаются. Их движение описывается типичным локомоторным циклом: происходят выдвигание ламеллы, подтягивание тела клетки с ядром и втягивание хвоста. При этом клетка подтягивается к своему переднему краю и немного округляется, принимая шаровидную форму. Затем цикл повторяется: клетка вновь вытягивает ламеллу и начинает расплываться. Отношение поперечной и продольной осей клетки составляет в среднем 3 : 1.

Система актиновых филаментов представлена двумя компонентами: на активном крае содержится достаточно большой пул актина, обеспечивающий выдвигание ламеллоподии, а в теле клетки присутствует небольшое количество актиновых филаментов, которые образуют стресс-фибриллы. Стресс-фибриллы в основном располагаются вдоль длинной оси клетки, однако присутствует и небольшое количество стресс-фибрилл, перпендикулярных активному краю.

Микротрубочки в клетках Vero образуют радиальную сеть. Наиболее плотно микротрубочки располагаются около centrosомы, которая является центром их организации. Большая часть микротрубочек достигает края клетки, и практически все они остаются прямыми.

Эффект воздействия BDM на клетки Vero. В ответ на введение BDM в среду культивирования ламеллы клеток начинают втягиваться через 4 мин воздействия, и за 1 ч воздействия площадь клеток уменьшается примерно на 70 % (рис. 1, 2). Отношение продольной и поперечной осей клетки также изменяется — за 30 мин оно уменьшилось до 1 : 1 (что соответствует шарообразной форме клетки) по сравнению с 3 : 1 в контроле. Через 2 мин после добавления BDM число стресс-фибрилл уменьшается, а оставшиеся становятся тоньше и короче. Во многих клетках происходит образование звездчатых структур из актиновых пучков. Через 30 мин воздействия происходит практически полная деполимеризация пучков актиновых филаментов: средняя длина пучков

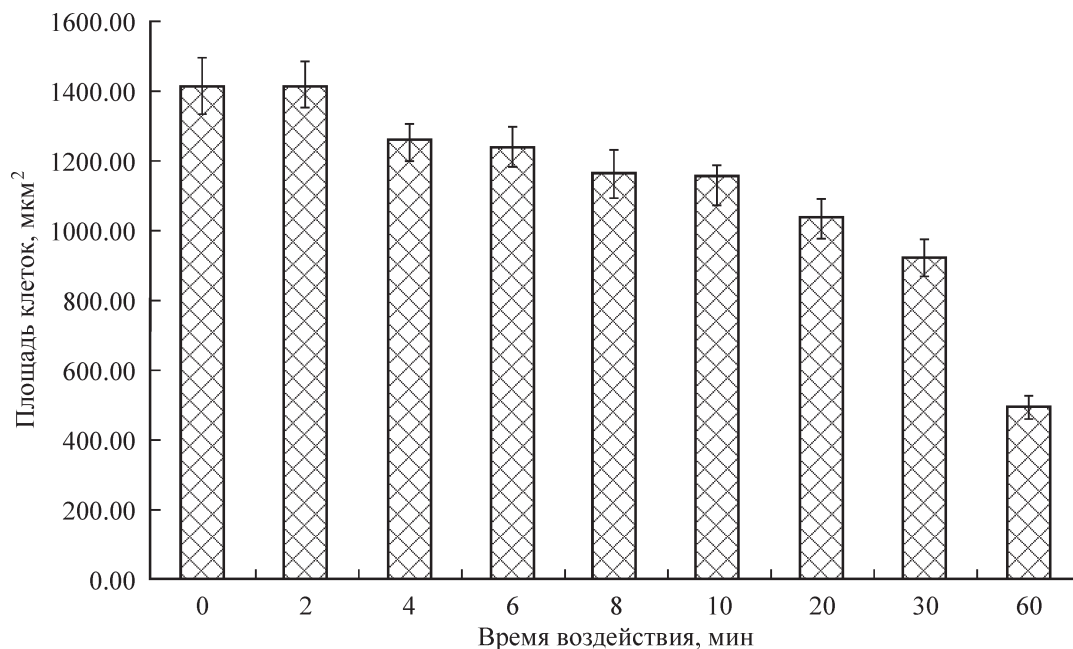


Рис. 1. Динамика изменения площади клеток Vero при воздействии BDM.

Клетки начинают втягивать ламеллоподии через 5 мин после добавления BDM в среду культивирования. Через 60 мин средняя площадь клеток уменьшается больше чем вдвое.

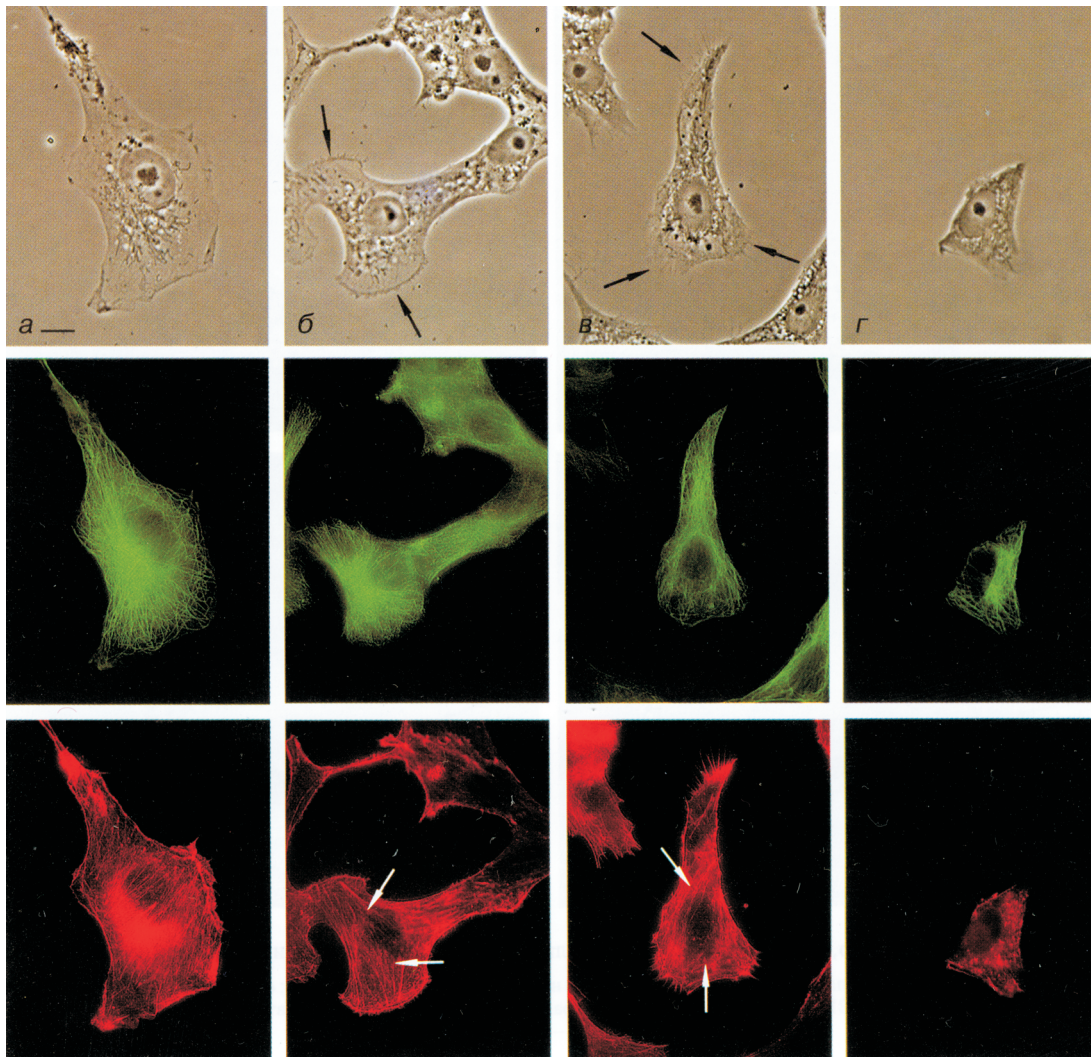


Рис. 2. Изменения цитоскелета при воздействии BDM на клетки Vero.

Верхний ряд — фазовый контраст, средний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на тубулин, нижний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на актин. *a* — контрольные клетки. *б–г* — воздействие BDM 5, 30 и 60 мин соответственно: *б* — клетки начинают стягивать ламеллоподии (черные стрелки), стресс-фибриллы становятся тоньше (белые стрелки); радиальная сеть микротрубочек сохраняется; *в* — клетки продолжают стягивать ламеллоподии (черные стрелки), стресс-фибриллы разбираются (белые стрелки), микротрубочки становятся извитыми на периферии клетки; *г* — клетки поджимаются, стресс-фибриллы почти все деполимеризуются, сеть микротрубочек становится более плотной. Масштабный отрезок — 10 мкм.

микрофиламентов уменьшается втрое, до  $4.53 \pm 0.45$  мкм (в контроле —  $12.95 \pm 1.03$ ), а количество снижается более чем в 10 раз (с  $48 \pm 1$  в контроле до  $4 \pm 1$ ; рис. 2, *б, в*). За 60 мин воздействия BDM система актиновых филаментов деполимеризуется практически полностью в 90 % клеток. При этом на активном крае клетки происходит быстрая деполимеризация актиновой сети.

Сеть микротрубочек под воздействием BDM не изменяется, однако вследствие поджатия клеток на поздних сроках инкубации становится практически невозможно проследить за отдельными микротрубочками.

Таким образом, наблюдаемые нами изменения в клетках Vero соответствуют описанным ранее (Cramer, Mitchison, 1995).

Воздействие BDM на клетки, в которых актиновые филаменты разрушены латрункулином В. Для выяснения роли актиновых пучков в процессе подтягивания ламеллы клетки было проанализировано поведение клеток в присутствии BDM, в которых

микрофиламенты предварительно были деполимеризованы латрункулином В. Контролем служили клетки, культивируемые в нормальной среде.

Через 10 мин после введения латрункулина В (5 нМ) происходит практически полная деполимеризация пучков актиновых филаментов, однако ламеллы клеток не стягиваются (рис. 3) и площадь клеток практически не изменяется ( $2004 \pm 125$  мкм<sup>2</sup> в контроле и  $2075 \pm 133$  мкм<sup>2</sup> после 10 мин воздействия латрункулина В). Эффект латрункулина, таким образом, оказался аналогичным описанному эффекту цитохалазинов В и Д в низких концентрациях (Domnina et al., 1982). На систему микротрубочек латрункулин В не влиял. Она оставалась радиальной, с фокусом схождения на центросоме и прямыми микротрубочками, доходящими до края клеток, что соответствует данным литературы (Spector et al., 1983; Peterson et al., 2000).

После добавления BDM на фоне латрункулина клетки сокращаются более активно, чем в его отсутствие:

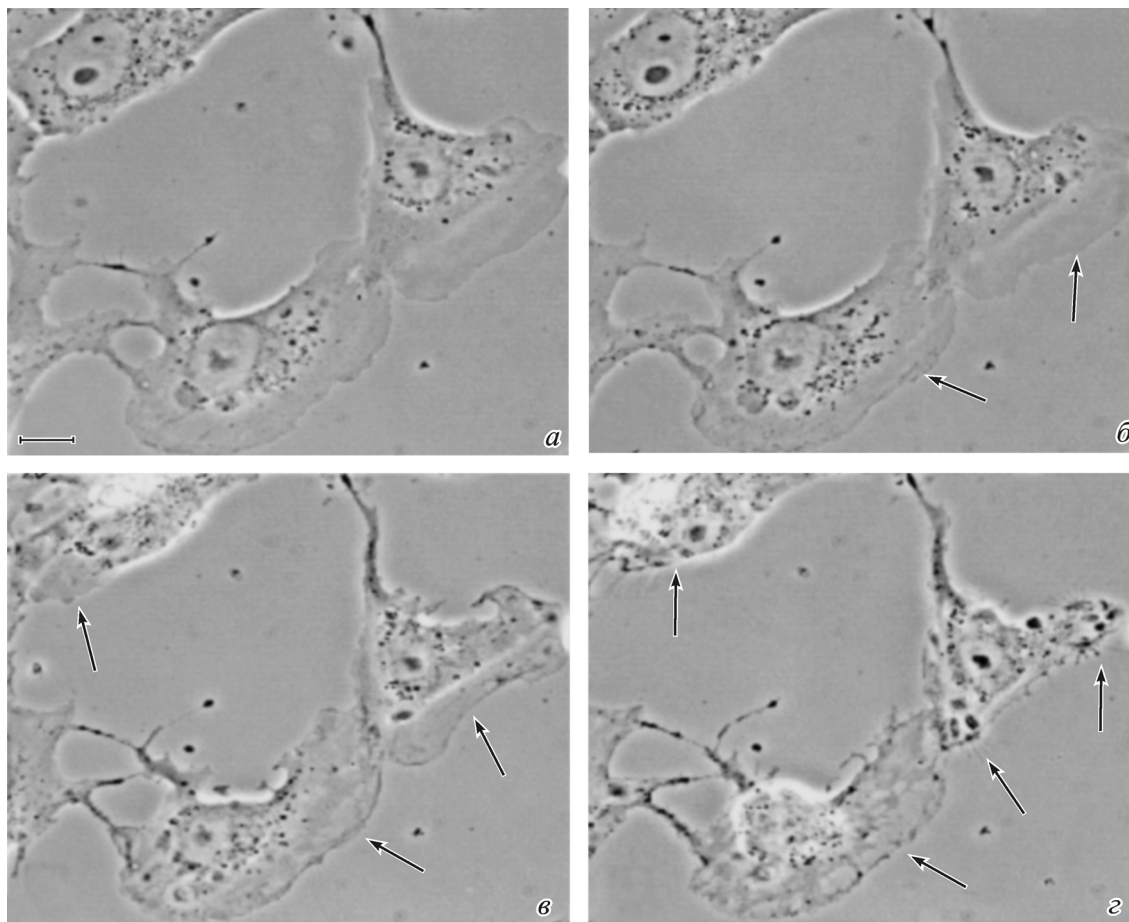


Рис. 3. Клетки Vero, обработанные латрункулином В, сокращаются при воздействии BDM.  
*a* — контроль; *б* — 5 мин после добавления латрункулина, форма ламеллы не отличается от контрольной; *в* — 1 мин после добавления BDM, активные края втягиваются; *г* — 20 мин воздействия BDM, клетки продолжают сокращаться. Стрелками указаны втягивающиеся активные края. Масштабный отрезок — 10 мкм.

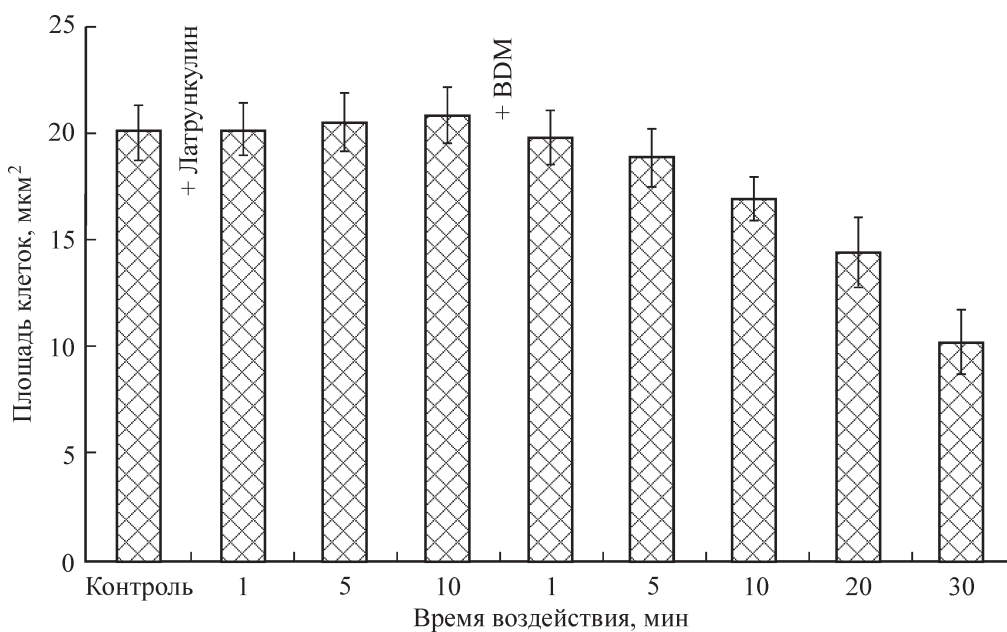


Рис. 4. Динамика изменения площади клеток Vero при воздействии латрункулина В (1, 5 и 10 мин) и латрункулина В + BDM. Площадь клеток практически не изменяется в присутствии латрункулина В, однако немедленно начинает уменьшаться при добавлении BDM.



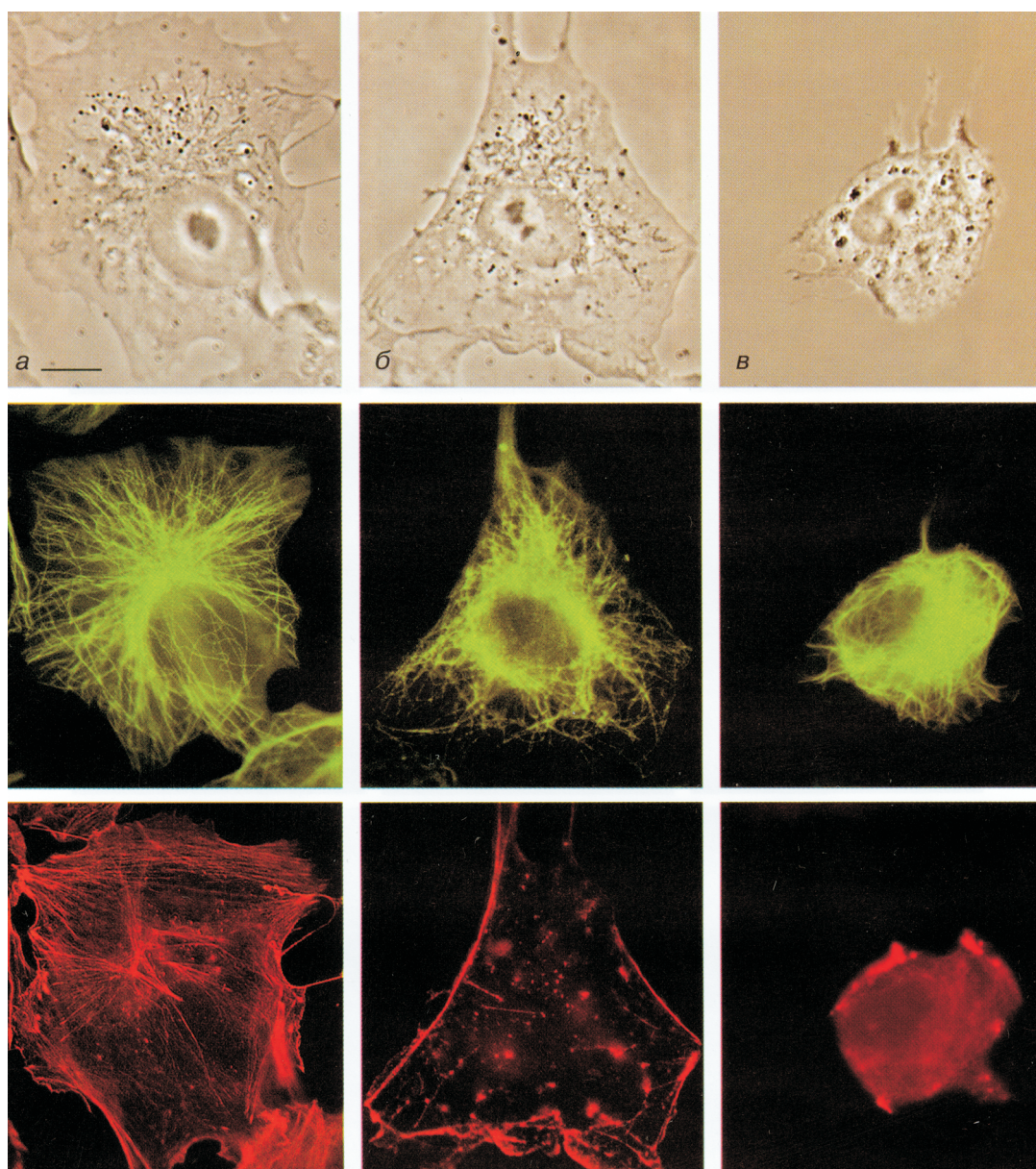


Рис. 5. Изменения цитоскелета при воздействии латрункулина В и BDM на клетки Vero.

Верхний ряд — фазовый контраст, средний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на тубулин, нижний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на актин. *a* — контроль; *б* — воздействие латрункулина В, 10 мин; *в* — совместное воздействие латрункулина В и BDM, 30 мин. *б* — площадь клеток не изменилась, пучки актина (стресс-фибриллы) деполимеризованы; *в* — клетки поджимаются, сеть микротрубочек более плотная, пучки актина отсутствуют. Масштабный отрезок — 10 мкм.

уже через 1 мин клетки начинают втягивать активные края (рис. 3, 4). В течение 30 мин площадь клеток уменьшается примерно на 55 %. Уже на ранних сроках воздействия BDM сеть микротрубочек становится хаотичной, исчезает фокус схождения (рис. 5).

Таким образом, втягивание активных краев происходит в отсутствие актиновых стресс-фибрилл, причем процесс сокращения клетки ускоряется по сравнению с втягиванием при воздействии только одного BDM.

Поскольку система микротрубочек в процессе сокращения клеток изменялась, мы предположили, что микротрубочки участвуют в процессе втягивания клеточной ламеллы. Для проверки данной гипотезы микротрубочки деполимеризовали воздействием нокодазола, затем в среду добавляли BDM и оценивали поведение клеток.

Воздействие BDM на клетки, в которых микротрубочки предварительно деполимеризованы нокодазолом. В результате 2-часовой инкубации с нокодазолом микротрубочки были полностью деполимеризованы, но актиновые филаменты в теле клеток сохранялись. Клетки с деполимеризованными микротрубочками теряли поляризацию, их площадь уменьшалась примерно на 20 %, что также соответствует ранее описанному данным (Pletjushkina et al., 2001). Пучки актина в клетках Vero были сильно гипертрофированы по сравнению с контрольными клетками. Хотя после деполимеризации микротрубочек и происходит образование ламеллоподий, количество актина в них снижается. В отсутствие микротрубочек клетки не реагируют на BDM: они остаются распластанными спустя 60 мин инкубации в



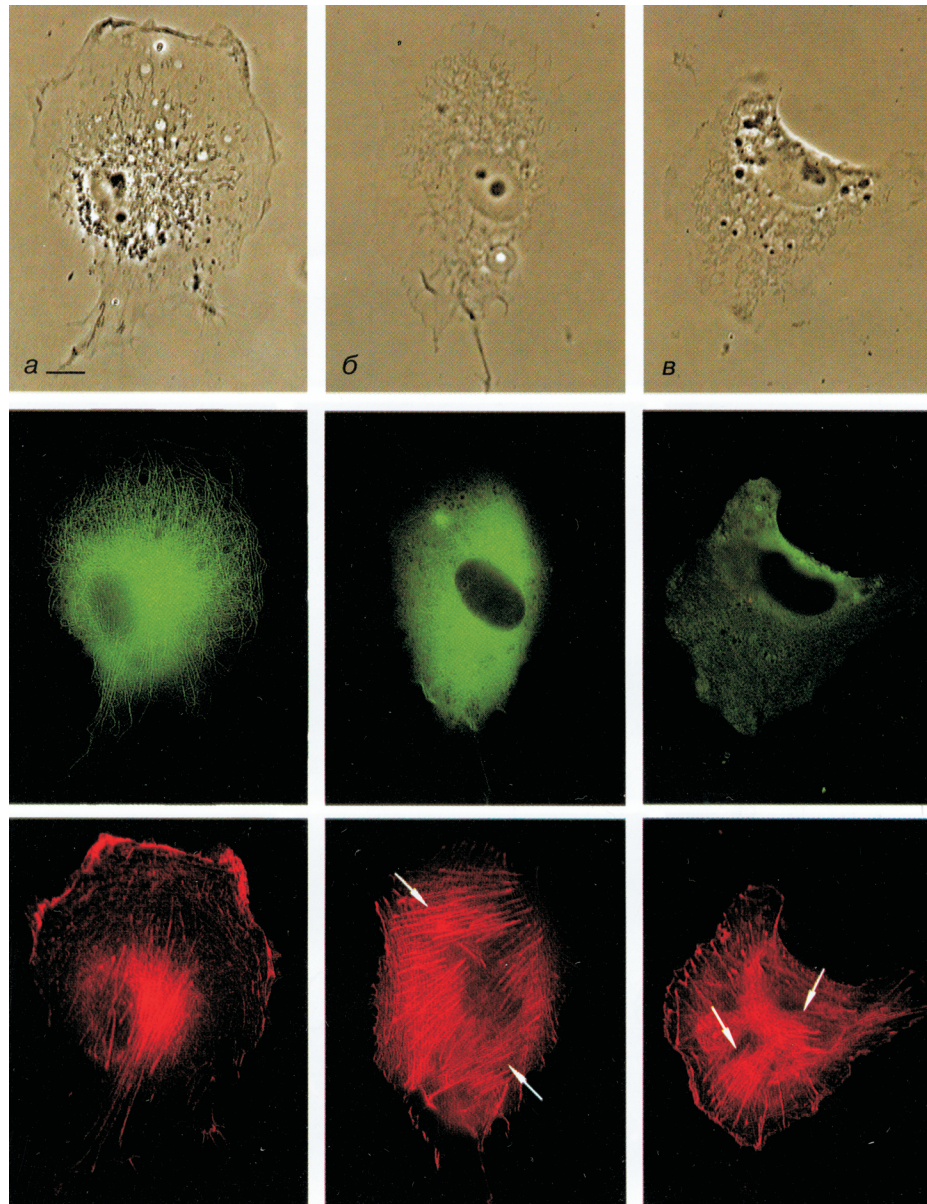


Рис. 6. Динамика изменения площади и цитоскелета клеток Vero при воздействии нокодазола в течение 2 ч.

Верхний ряд — фазовый контраст, средний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на тубулин, нижний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на актин. *а* — контроль, *б, в* — 30 мин и 2 ч после добавления нокодазола соответственно: *б* — пучки актина (стресс-фибриллы) гипертрофированы (белые стрелки), микротрубочки практически все разобраны (головки стрелок), площадь клеток уменьшилась; *в* — пучки актина (стресс-фибриллы) гипертрофированы (белые стрелки), система микротрубочек деполимеризована полностью, площадь клеток уменьшилась. Масштабный отрезок — 10 мкм.

среде с BDM и площадь их не изменяется (рис. 6). В дальнейшем в течение 1 сут клетки также не изменяют свою форму. Пучки актиновых филаментов деполимеризуются в ответ на действие BDM медленнее, чем при наличии сети микротрубочек: через 60 мин пучки актина остаются гипертрофированными по сравнению с нормальными клетками. В присутствии нокодазола полная деполимеризация актиновых пучков в 90 % клеток происходит только после 24 ч воздействия BDM.

Прижизненные наблюдения подтвердили, что при добавлении нокодазола клетки теряют полярность, но остаются распластанными. В ответ на введение BDM поведение таких клеток не изменяется. Удаление нокодазола из среды культивирования (но не BDM!) приводит к тому, что клетки начинают втягивать края (по всему пе-

риметру) примерно через 6 мин и в дальнейшем в течение 60 мин продолжают поджиматься. Согласно данным иммунофлуоресцентного анализа, 6 мин — это время, за которое первые микротрубочки дорастают до края клетки.

Изменение площади клеток при восстановлении микротрубочек в присутствии BDM определяли на фиксированных препаратах. Контролем служили клетки, которые после воздействия нокодазола переносили в чистую культуральную среду. В течение 1 ч площадь клеток в присутствии BDM уменьшалась почти вдвое, тогда как в контроле за то же время она увеличивалась (рис. 7).

При отмывке от нокодазола микротрубочки начинают восстанавливаться уже через 2 мин, при этом в основном образуются centrosomальные микротрубочки и не-

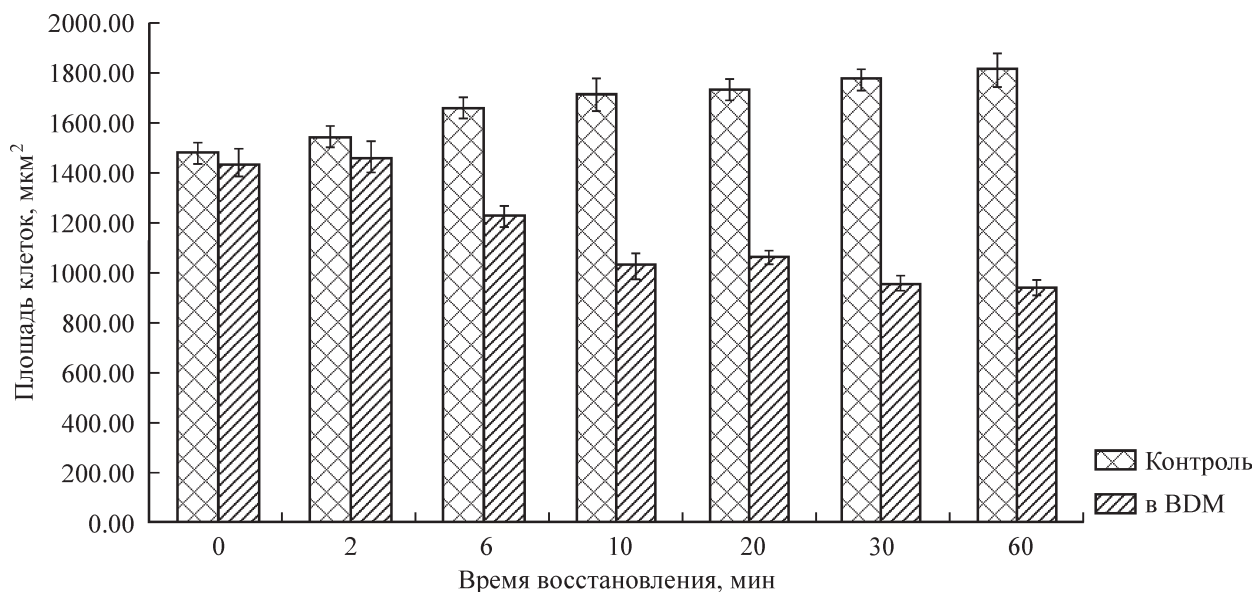


Рис. 7. Динамика изменения площади клеток Vero при восстановлении микротрубочек в контроле и в присутствии BDM.

Если в присутствии BDM отмыть нокадазол, клетки начинают втягивать ламеллоподии через 5–6 мин.

большое количество свободных микротрубочек, которые к 6-й мин восстановления в чистой среде деполимеризуются, что согласуется с данными литературы (Смурова и др., 2002; Чернобельская и др., 2004). Происходит перестроение актиновых филаментов — постепенно пучки актина становятся тоньше. При этом увеличивается фракция актина на активном крае клеток и начинают образовываться ламеллоподии. Через 60 мин восстановления площадь клеток увеличивается примерно на 53 %, система микротрубочек полностью восстанавливается, система актиновых филаментов возвращается к нормальному виду — появляется актин на активном крае и стресс-фибриллы опять располагаются перпендикулярно активному краю и вдоль длинной оси клетки (рис. 8).

В присутствии BDM микротрубочки восстанавливаются быстрее по сравнению с контролем и в других пропорциях: в 1-е мин восстановления сеть представлена в основном свободными микротрубочками, количество которых увеличивается к 6-й мин восстановления. Центросомальные микротрубочки также растут быстрее и представлены большим числом по сравнению с контрольными клетками. Пучки актиновых филаментов под действием BDM перестраиваются другим способом, чем в контроле, — фракция на активном крае не появляется, однако стресс-фибриллы становятся тоньше и короче. Однако перестройка стресс-фибрилл происходит медленнее, чем при воздействии BDM на клетки, — сколько-нибудь заметное утоньшение выявляется только к 10-й мин восстановления. Через 60 мин восстановления площадь клеток уменьшается примерно на 45 %, сеть микротрубочек восстанавливается, а система стресс-фибрилл практически полностью деполимеризуется (рис. 9).

Регуляция распластывания клетки. Деполимеризация микротрубочек ведет к увеличению количества и толщины стресс-фибрилл в цитоплазме, потере полярности и подвижности фибробластов (Vasiliev et al., 1970; Waterman-Storer et al., 1999; Omelchenko et al., 2002). Это является следствием активации Rho A, возможно, освобождением GEF-H1 от связанных с ним мик-

ротрубочек (Omelchenko et al., 2002). Деполимеризация микротрубочек также увеличивает актомиозиновую сократимость в культивируемых фибробластах (Pletjushkina et al., 2001; Small et al., 2002). Однако в некоторых случаях микротрубочки препятствуют сокращению клеток (Wittman, Waterman-Storer, 2001; Small et al., 2002; Rodriguez et al., 2003). Следовательно, для того чтобы понять, как микротрубочки участвуют в процессах сокращения, надо сначала понять связь клеточной адгезии с сократимостью. Фокальные контакты могут возникать и расти только при воздействии на них механической силы, возникающей за счет актомиозинового комплекса (Баллестрем и др., 2003). И любое воздействие, уменьшающее сократимость клетки, запрещает формирование новых фокальных контактов и приводит к быстрой разборке уже существующих (Chrzanovska-Wodnicka, Burridge, 1996; Helfman et al., 1999; Riveline et al., 2001). По всей видимости, BDM действует на фокальные контакты. Это может быть прямое воздействие на белки, участвующие в образовании фокальных контактов, однако более вероятным представляется влияние, опосредованное через микротрубочки. Известно, что ингибитор миозина ML-7 (аналог BDM) вызывает разборку периферических фокальных контактов и втягивание края клетки. Этого не наблюдается в клетках, в которых микротрубочки были разобраны нокадазолом (Kaverina et al., 2000).

В плотно прикрепленных к стеклу фибробластах человека (культуры AG-1523 и M-19) при добавлении BDM в среду через 1 сут фокальные контакты, содержащие паксиллин, уменьшались в размере, часто становились точечными, их количество снижалось, часто они располагались лишь по периметру клеток (Домнина и др., 2001). BDM нарушает процесс поляризации фибробластов при распластывании. Подавление ретракции фибробластов с помощью BDM приводит к разрушению актин-миозинового комплекса. Меняются число, структура и ориентировка стресс-фибрилл. Распределение миозина становится диффузным. Появляется много диффузного актина. Степень и скорость распластывания фибробластов при воздействии BDM снижаются. Клетки стано-



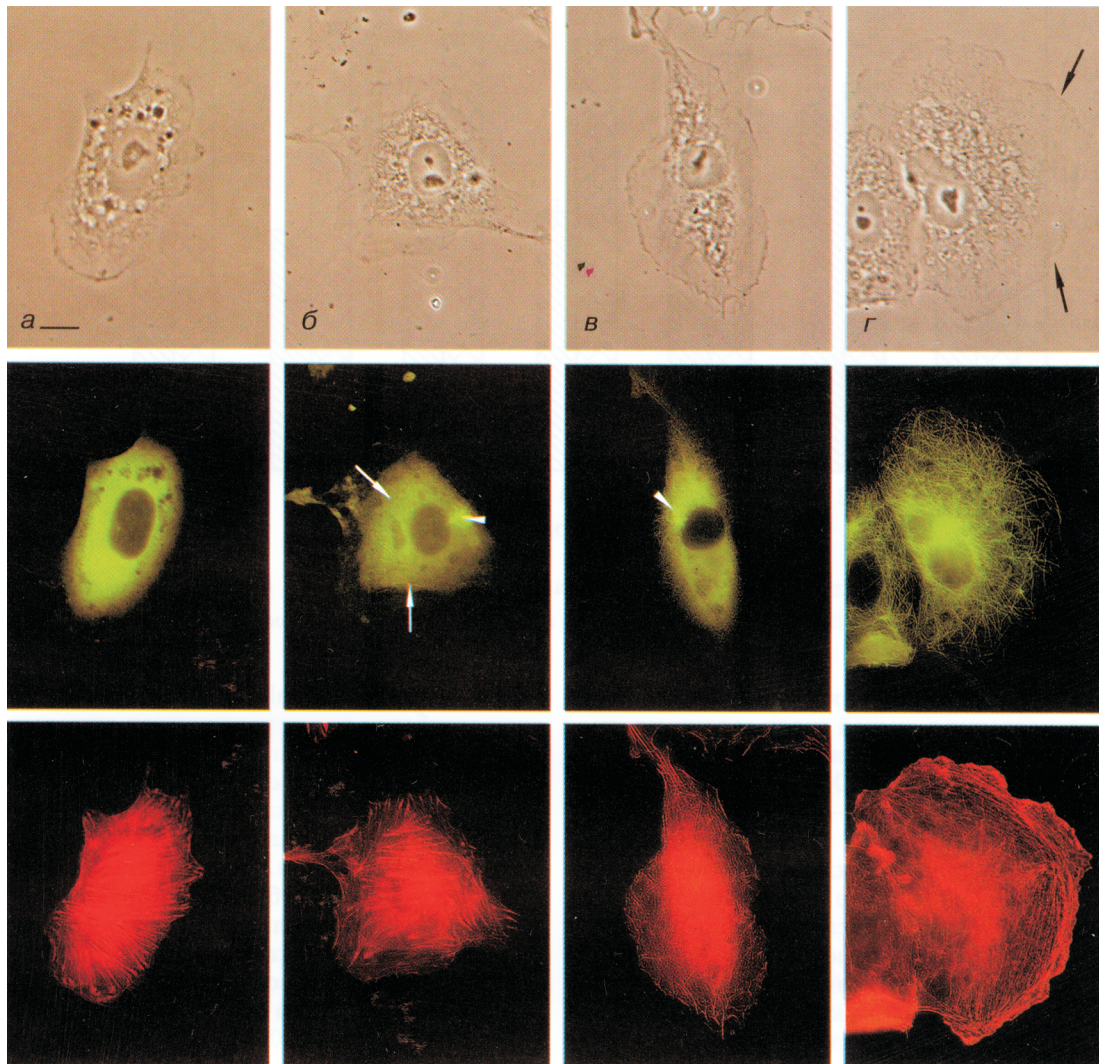


Рис. 8. Восстановление сети микротрубочек после воздействия нокадазола.

Верхний ряд — фазовый контраст, средний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на тубулин, нижний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на актин. *a* — контрольные клетки. *б–г* — восстановление микротрубочек, 4, 6 и 60 мин соответственно. *a* — клетки не поляризованы, микротрубочки отсутствуют; *б* — микротрубочки начинают восстанавливаться, появляются centrosомальные микротрубочки (головки белых стрелок) и эфемерные свободные микротрубочки (белые стрелки); *в* — увеличиваются длина и количество centrosомальных микротрубочек (головки белых стрелок), свободные микротрубочки постепенно деполимеризуются, утончаются пучки актина; *г* — площадь клеток увеличилась вдвое, появляются ламеллы (черные стрелки), реорганизуется система актиновых филаментов. Масштабный отрезок — 10 мкм.

вятся слегка поджатыми. BDM угнетает активность ламеллярной цитоплазмы, блокирует движение агрегатов рецепторов конкавалина А по верхней поверхности клеток, что также связано с разрушением актин-миозинового комплекса (Домнина и др., 2001).

Добавление BDM или ML-7 в низких концентрациях (30 и 20 мкМ соответственно) вызывает дисперсию фокальных контактов уменьшение их длины в 3–5 раз и уменьшение содержания гладкомышечного  $\alpha$ -актина в стресс-фибриллах в фибробластах легкого и миофибробластах (Dugina et al., 2001; Дугина и др., 2002). В работе Глушанковой (Gloushankova et al., 1998) отмечены исчезновение  $\beta$ -катениновых контактов при подавлении миозиновой сократимости под действием BDM и восстановление этих структур при стимуляции контрактильности.

При разрушении микротрубочек в фибробластах и фибробластоподобных клетках, напротив, увеличивают-

ся длина и количество фокальных контактов (Bershadsky et al., 1996; Pletjushkina et al., 1998; Kirchner et al., 2003), что усиливает клеточную адгезию (Ballestrem et al., 2002; Small et al., 2002).

Следовательно, при разобранных микротрубочках BDM не может подействовать на контакты, так как нет «посредника». С началом восстановления системы микротрубочек и дорастанием какого-то их числа до края, содержащего контакты, происходит передача сигнала и клетка начинает втягивать края.

Появление коротких свободных микротрубочек на ранних сроках восстановления означает, что их образование идет с достаточно большой скоростью (по-видимому, от имеющихся в цитоплазме сайтов нуклеации), а последующее исчезновение при восстановлении в контроле указывает на нестабильность минусов-концов.

При подавлении динамики микротрубочек за счет снижения уровня внутриклеточного АТФ путем введе-



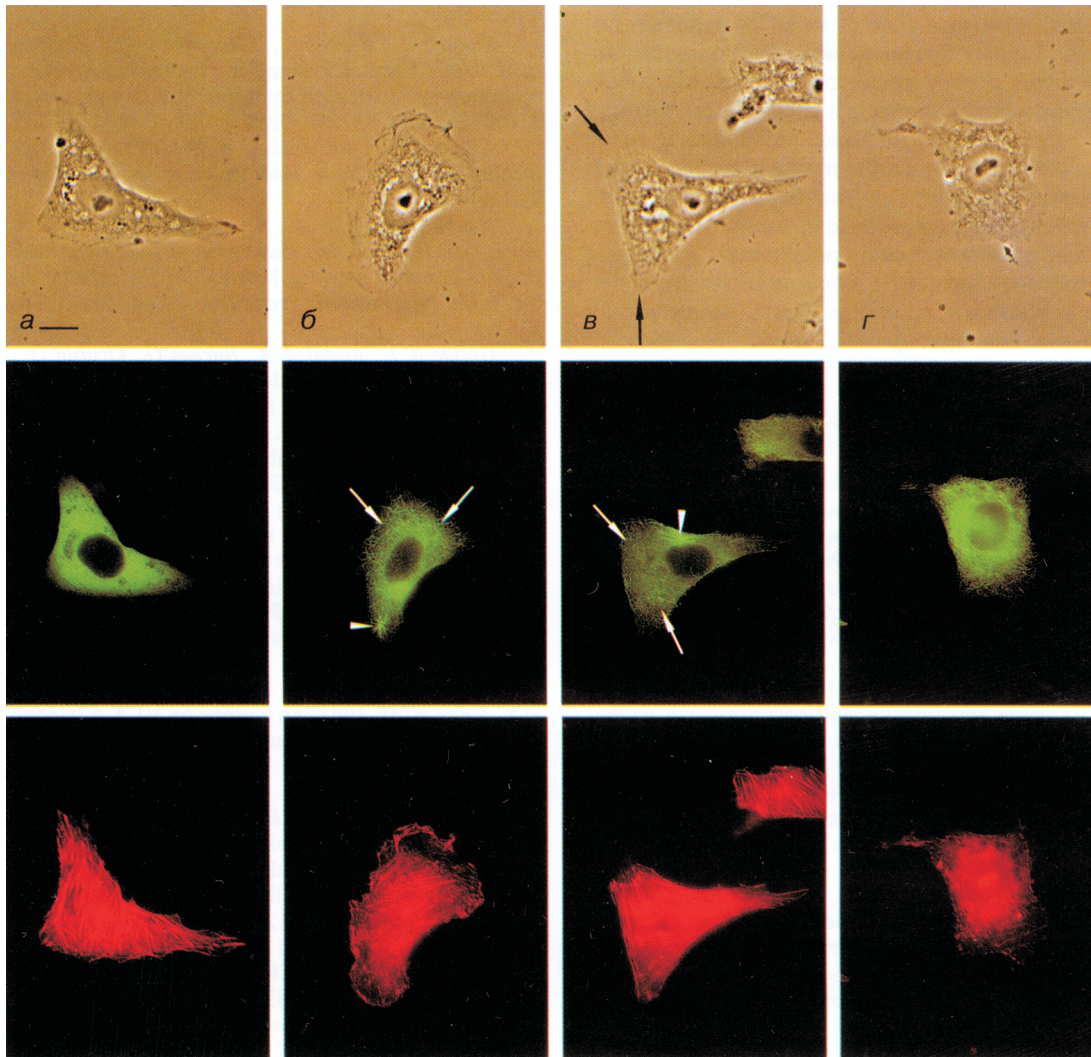


Рис. 9. Восстановление сети микротрубочек в присутствии BDM после воздействия нокодазола.

Верхний ряд — фазовый контраст, средний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на тубулин, нижний ряд — иммунофлуоресцентная окраска на актин. *a* — контрольные клетки; *б–г* — восстановление микротрубочек в присутствии BDM, 4, 6 и 60 мин соответственно. *a* — клетки не поляризованы, микротрубочки отсутствуют; *б* — появляются centrosомальные микротрубочки (головки белых стрелок) и большое количество эфемерных свободных микротрубочек (белые стрелки); *в* — увеличиваются длина и количество centrosомальных микротрубочек (головки белых стрелок) и свободных микротрубочек (белые стрелки), микротрубочки дорастают до края клетки, клетки начинают поджимать свои края (черные стрелки); *г* — площадь клеток уменьшилась почти вдвое, система микротрубочек хаотична, актиновые филаменты деполимеризуются. Масштабный отрезок — 10 мкм.

ния ингибиторов его синтеза происходило формирование многочисленных свободных микротрубочек на начальных этапах восстановления (De Brabander et al., 1982). Вероятно, такое явление объясняется сходным образом — нуклеация микротрубочек была эффективной за счет повышенной концентрации тубулина, а время существования свободных микротрубочек возрастало за счет затормаживания динамики плюс- и минус-концов, которое происходит при снижении уровня АТФ (Gelfand, Bershadsky, 1991).

Присутствие большого количества свободных микротрубочек в течение длительного времени позволяет предположить, что их минус-концы могут быть под воздействием BDM стабилизированы. Как известно, инактивация Rac-1 или Cdc42 в фибробластах приводит к стабилизации минус-концов и как следствие — к увеличению доли свободных микротрубочек в равновесном состоянии (Grigoriev et al., 2006). Если считать, что при

удалении нокодазола в присутствии BDM минус-концы свободных микротрубочек стабилизированы, а динамические характеристики плюс-концов centrosомальных микротрубочек не отличаются от динамических характеристик плюс-концов свободных микротрубочек (Vorobjev et al., 1997, 1999), то доля свободных микротрубочек на ранних этапах восстановления должна значительно возрасти. Данное наблюдение может объяснить быстрое стягивание ламеллы в эксперименте с восстановлением микротрубочек — стабилизация свободных микротрубочек должна привести к появлению относительно большого числа их на периферии клетки, что может ускорить разрушение фокальных контактов, гипертрофированных в ответ на воздействие нокодазола.

Если резюмировать полученные данные, то оказывается, что при деполимеризации микротрубочек происходит гипертрофия актинового скелета и он плохо разрушается под действием BDM. При воздействии латрункули-

на В происходит деполимеризация актинового цитоскелета без сокращения клеток, но на его фоне BDM работает более эффективно. Таким образом, сокращению клеток актиновый цитоскелет скорее препятствует, чем способствует. Роль микротрубочек состоит в следующем: без них сокращения не происходит, но даже небольшого числа микротрубочек достаточно, чтобы процесс распластывания (в контроле) или сокращения (при воздействии BDM) индуцировать. Таким образом, можно предполагать, что для втягивания ламеллы решающим фактором являются не стресс-фибриллы, а влияние микротрубочек на фокальные контакты (вероятнее всего, на динамику обмена фокальных контактов).

### Список литературы

- Баллестрем К., Шифермайер Н., Зонис Ю., Штутман М., Бершадский А. 2003. Взаимодействие между актиновым цитоскелетом, фокальными контактами и микротрубочками. *Вестн. Рос. онкол. науч. центра им. Блохина РАМН*. 3 : 25—37.
- Домнина Л. В., Иванова О. Ю., Васильев Ю. М. 2001. Изменение поляризации фибробластов при изменении контрастности актинового цитоскелета. *Цитология*. 43 (2) : 133—140.
- Дугина В. Б., Александрова А. Ю., Габбиани Дж., Васильев Ю. М. 2002. Влияние актомиозиновой сократимости на фокальные контакты миофибробластов и структуру стресс-фибрилл. *Цитология*. 44 (1) : 48—55.
- Смурова К. М., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2002. Динамика восстановления цитоплазматических микротрубочек после их разрушения нокадазолом в клетках культуры Vero. *Биол. мембраны*. 19 (6) : 486—496.
- Чернобельская О. А., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2004. Динамика реполимеризации микротрубочек в клетке: быстрый рост от centrosомы и медленное восстановление свободных микротрубочек. *Цитология*. 46 (6) : 531—543.
- Abercrombie M. 1978. The cells. *Fibroblasts*. *J. Clin. Pathol.* 31. Suppl. (Roy. Coll. Path.). 12 : 1—6.
- Ballemstrem C., Magid N., Zonis J., Shtutman M., Ishizaki T., Narumiya S., Bershadsky A. 2002. Regulation of microtubule dynamics by the formin homology protein, mDia1. *Mol. Biol. Cell*. 13 : 422a.
- Ballemstrem C., Wehrle-Haller B., Hinz B., Imhof B. A. 2000. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 2999—3012.
- Bershadsky A., Chausovsky A., Becker E., Lyubimova A., Geiger B. 1996. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.* 6 : 1279—1289.
- Bershadsky A. D., Futerman A. H. 1994. Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A blocks cell polarization and inhibits directed cell migration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 91 : 5686—5689.
- Chrzanovska-Wodnicka M., Burridge K. 1996. Rho stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133 : 1403—1415.
- Cramer L. P., Mitcison T. J. 1995. Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *J. Cell Biol.* 131 : 179—189.
- Cramer L. P., Siebert M., Mitcison T. J. 1997. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J. Cell Biol.* 136 : 1287—1305.
- De Brabander M., Geuens G., Nuydens R., Willebrords R., De Mey J. 1982. Microtubule stability and assembly in living cells: the influence of metabolic inhibitors, taxol and pH. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46 (Pt 1) : 227—240.
- Domnina L. V., Gelfand V. I., Ivanova O. Y., Leonova E. V., Pletjushkina O. Y., Vasiliev J. M., Gelfand I. M. 1982. Effects of small doses of cytochalasin on fibroblasts: preferential changes of active edges and focal contacts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 79 : 7754—7757.
- Dugina V., Fontao L., Chaponnier C., Vasiliev Ju., Gabbiani G. 2001. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J. Cell Sci.* 114 : 3285—3296.
- Gelfand V. I., Bershadsky A. D. 1991. Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7 : 93—116.
- Glushankova N. A., Krendel M. F., Alieva N. O., Bonder E. M., Feder H. H., Vasiliev J. M., Gelfand I. M. 1998. Dynamics of contacts between lamellae of fibroblasts: essential role of the actin cytoskeleton. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95 : 4362—4367.
- Goode B. L., Rodal A. A., Barnes G., Drubin D. G. 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J. Cell Biol.* 153 : 627—634.
- Grigoriev I., Borisy G., Vorobjev I. 2006. Regulation of microtubule dynamics in 3T3 fibroblasts by Rho family GTPases. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 63 : 29—40.
- Grosheva I., Shtutman M., Elbaum M., Bershadsky A. D. 2000. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Pro-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J. Cell Sci.* 114 : 695—707.
- Hall A., Nobes C. D. 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355 : 965—970.
- Hangan D., Morris V. L., Boeters L., von Ballestrem C., Uniyal S., Chan B. M. 1997. An epitope on VLA-6 (alpha6beta1) integrin involved in migration but not adhesion is required for extravasation of murine melanoma B16F1 cells in liver. *Cancer Res.* 57 : 3812—3817.
- Helpman D. M., Levy E. T., Berthier C., Shtutman M., Riveline D., Grosheva I., Lachish-Zalait A., Elbaum M., Bershadsky A., Bershadsky A. D. 1999. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol. Biol. Cell*. 10 : 3097—3112.
- Higuchi H., Takemori S. 1989. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J. Biochem. (Tokyo)*. 105 : 638—643.
- Kaverina I., Krylyshkina O., Gimona M., Beningo K., Wang Yu-Li, Small J. V. 2000. Enforced polarization and locomotion of fibroblasts lacking microtubules. *Curr. Biol.* 10 : 739—742.
- Kaverina I., Krylyshkina O., Small J. V. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* 146 : 1033—1043.
- Kaverina I., Rottner K., Small J. V. 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules as early focal adhesions. *J. Cell Biol.* 142 : 181—190.
- Kirchner J., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K. 2003. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase Rho kinase. *Science*. 273 : 245—248.
- Kolega J., Taylor D. L. 1993. Gradients in the concentration and assembly of myosin II in living fibroblasts during locomotion and fiber transport. *Mol. Cell Biol.* 4 : 819—836.
- Lauffenburger D. A., Horwitz A. F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 84 : 359—369.
- Mackay D. J. G., Hall A. 1998. Rho GTPases (minireview). *J. Biol. Chem.* 273 : 20 685—20 688.
- McKillop D. F. A., Fortune N. S., Ranatunga K. W., Geeves M. A. 1994. The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15 : 309—318.
- Mogilner A., Oster G. 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J.* 71 : 3030—3045.
- Montell D. J. 1999. Developmental regulation of cell migration. Insight from a genetic approach in *Drosophila*. *Cell Biochem. Biophys.* 31 : 219—229.
- Nobes C. D., Hall A. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144 : 1235—1244.



- Omelchenko T., Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Feder H. H., Bonder E. M. 2002. Mechanisms of polarization of the shape of fibroblasts and epitheliocytes: separation of the roles of microtubules and Rho-dependent actin-myosin contractility. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 10 452—10 457.
- Pantaloni D., Le Clainche C., Carlier M. F. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science.* 292 : 1502—1506.
- Peterson J. A., Tian B., Geiger B., Kaufman P. L. 2000. Effect of latrunculin-B on outflow facility in monkeys. *Exp. Eye Res.* 70 : 307—313.
- Peterson J. R., Mitchison T. J. 2002. Small molecules, big impact. A history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.* 9 : 1275—1285.
- Pletjushkina O. J., Belkin A. M., Ivanova O. J., Oliver T., Vasiliev J. M., Jacobson K. 1998. Maturation of cell-substratum focal adhesion induced by depolymerization of microtubules is mediated by increased cortical tension. *Cell Adhes. Commun.* 5 : 121—135.
- Pletjushkina O. J., Rajfur Z., Pomorski P., Oliver T. N., Vasiliev J. M., Jacobson K. A. 2001. Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 48 : 235—244.
- Pollard J. D., Blanchoin L., Mullins R. D. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filaments dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 : 545—576.
- Ren X. D., Kiosses W. B., Schwartz M. A. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and cytoskeleton. *EMBO J.* 18 : 578—585.
- Riveline D., Zamir E., Balaban N. Q., Schwarz U. S., Ishizaki T., Narumiya S., Kam Z., Geiger B., Bershadsky A. D. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* 153 : 1175—1185.
- Rodionov V. I., Gyoeva F. K., Tanaka E., Bershadsky A. D., Vasiliev J. M., Gelfand V. I. 1993. Microtubule-dependent control of cell shape and pseudopodial activity is inhibited by the antibody to kinesin motor domain. *J. Cell Biol.* 123 : 1811—1820.
- Rodríguez O. C., Schaefer A. W., Mandasto C. A., Forsher P., Bement W. M., Waterman-Storer C. M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 5 : 599—609.
- Small J. V., Geiger B., Kaverina I., Bershadsky A. 2002. Opinion: how do microtubules guide migrating cells? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 : 957—964.
- Spector I., Shochet N. R., Kashman Y., Groweiss A. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science.* 219 : 493—495.
- Vasiliev J. M. 1991. Polarization of pseudopodial activities: cytoskeletal mechanisms. *J. Cell Sci.* 98 : 1—4.
- Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Domnina L. V., Ivanova O. Y., Komm S. G., Olshevskaya L. V. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 24 : 625—640.
- Vorobjev I. A., Rodionov V. I., Maly I. V., Borisy G. G. 1999. Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover. *J. Cell Sci.* 112 : 2277—2289.
- Vorobjev I. A., Svitkina T. M., Borisy G. G. 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J. Cell Sci.* 110 : 2635—2645.
- Wacker I., Kaether C., Kromer A., Migala A., Almers W., Gerdes H. H. 1997. Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J. Cell Sci.* 110 : 1453—1463.
- Waterman-Storer C. M., Salmon E. D. 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J. Cell Biol.* 139 : 417—434.
- Waterman-Storer C. M., Worthylake R. A., Liu B. P., Burridge K., Salmon E. D. 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nature Cell Biol.* 1 : 45—50.
- Wittmann T., Waterman-Storer C. M. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* 114 : 3795—3803.
- Yarrow J. C., Lechler T., Li R., Mitchison T. J. 2003. Rapid de-localization of actin leading edge components with BDM treatment. *BMC Cell Biol.* 4 : 5.

Поступила 21 III 2006

## MICROTUBULES ARE NECESSARY FOR LAMELLAE RETRACTION OF VERO CELLS

E. A. Dobrinskikh,<sup>1</sup>\* I. A. Vorobjev<sup>2</sup><sup>1</sup> Cell Biology and Histology Department, Moscow State University, Biological Faculty, and Cell Motility Laboratory, A. N. Belozersky Institute, Moscow;

\* e-mail: eadobrinsk@mail.ru

Behavior of Vero cells under the 2,3-butanedione monoxime (BDM) treatment was examined using videomicroscopy with contrast enhancement. After addition of BDM to the culture medium the area of cell contact with substratum gradually reduced — within 5 min of treatment cell lamellae became thicker, after 60 min the cell area decreased ~ 70 %, and the cells became nearly rounded. At the same time actin bundles (stress fibers) depolymerized, and microtubule network became denser. Partial depolymerization of microfilaments by treatment with latrunculin B at a concentration of 5 nM resulted in complete loss of stress fibers, yet cells slightly change their form, and microtubule system remained the same as in the control cells. However, after addition of BDM in the presence of latrunculin B cells retracted their lamellae more quickly than under BDM sole treatment. To evaluate the role of microtubules in the process of cell retraction we depolymerized them with nocodazole taken at the concentration of 5 ng/ml. Under nocodazole treatment the cell area decreased ~ 20 %, and stress fibers became more thick and abandon. The cells did not change their form, and stress fibers depolymerized very slowly under BDM treatment in the absence of microtubules. After 1 h of BDM treatment in the presence of nocodazole stress fibers were still more numerous than in the control cells. Complete depolymerization of stress fibers happened in 90 % of cells only in 24 h after addition of BDM. When nocodazole had been washed out of the culture medium in the presence of BDM, lamellae started shrinking in 6 min. This time corresponds to the time required for the partial restoration of microtubule system. On the bases of the results obtained we conclude that retraction of the lamellae in Vero cells is guided rather mainly by microtubules, than stress-fibers.