

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПЛАСТЫВАНИЯ НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ. РОЛЬ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ МИКРОФИЛАМЕНТОВ И АКТИН-МИОЗИНОВОГО СОКРАЩЕНИЯ

© М. С. Шутова, А. Ю. Александрова¹

Институт канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина, РАМН, Москва;

¹ электронный адрес: tonya_alex@yahoo.com

Полимеризация микрофиламентов и их последующая перестройка с участием актин-миозиновых взаимодействий — два основных процесса, лежащих в основе морфогенетических реакций клеток. Мы исследовали роль каждой из этих составляющих в процессе распластывания нормальных и трансформированных фибробластов линии REF52tetRas с регулируемой экспрессией онкогена *ras*. Обработка клеток ингибиторами клеточной сократимости (веществом Y27632 или блебистатином) вызывала исчезновение актиновых пучков и фокальных контактов, но краевая активность сохранялась как у нормальных, так и у трансформированных клеток. При этом значительно повышалась скорость распластывания нормальных клеток и в меньшей степени — *ras*-трансформированных. При подавлении полимеризации актина низкими дозами латрункулина А сохранялись стресс-фибриллы и фокальные контакты, но утрачивалась ламеллиподиальная активность и значительно подавлялось распластывание нормальных фибробластов. В случае трансформированных клеток актиновые пучки и фокальные контакты практически исчезали, но активность края не утрачивалась и распластывание подавлялось в меньшей степени. Таким образом, наиболее существенным процессом, регулирующим распластывание клеток и их поляризацию, является полимеризация актиновых филаментов на ведущем крае. При этом трансформированные клетки оказываются менее чувствительными, чем нормальные, к действию ингибиторов, изменяющих структуру цитоскелета. Обсуждаются возможные механизмы, лежащие в основе этих различий.

Ключевые слова: ламеллиподия, стресс-фибриллы, Rho-киназа, площадь клеток, степень поляризации.

В основе движения клеток лежат перестройки актинового цитоскелета. Инициальным шагом перестроек является формирование так называемого ведущего (активного) края, на котором происходят протрузии и образуются первичные контакты клетки с внеклеточным матриксом. Протрузия ведущего края обеспечивается силой полимеризации актина в зоне ламеллиподии. В зоне ламеллы происходит дальнейшая перестройка актина — формирование актин-миозиновых пучков. Образование контактов с субстратом инициируется в ламеллиподии, а созревание происходит в зоне ламеллы с участием стресс-фибрилл (Bershadsky et al., 2006; Alexandrova et al., 2008). Натяжение, генерируемое миозином, воздействует на инициальные фокальные комплексы, индуцируя их рост и превращение в фокальные контакты (Ingber, 1991; Riveline et al., 2001; Rottner et al., 2001; Krendel, Mooseker, 2005).

Ярким примером динамической организации цитоскелета служат его перестройки, происходящие в процессе распластывания клеток. Процесс распластывания начинается с образования псевдоподий по всему периметру клетки. Сеть микрофиламентов на активном крае постоянно образуется в течение всего процесса распластывания за счет интенсивной полимеризации актина. Остальные типы актинсодержащих структур, возникающие в распластывающихся клетках, в основном являются результа-

том последовательной перестройки полимеризованного на краях актина. Первым этапом такой перестройки является возникновение кольцевого пучка, расположенного вдоль края дисковидной клетки сразу за зоной активного края (стадия радиального распластывания) (Svitkina et al., 1986). В случае фибробластоподобных клеток процесс распластывания на подложке завершается стадией поляризации. Фибробласты приобретают удлинённую поляризованную форму в результате перераспределения псевдоподиальной активности — разделения клеточного края на активные и стабильные зоны (Ровенский, Васильев, 2004).

При неопластической трансформации нарушаются нормальные морфогенетические реакции и подвижность клеток, что приводит к таким процессам, как инвазивный рост и метастазирование (Ровенский, Васильев, 2004). Реорганизация цитоскелета, особенно изменения клеточной сократимости, регулируемой актин-миозиновым комплексом, имеет центральное значение для развития фенотипа морфологически трансформированных клеток с инвазивным поведением. Редукция стресс-фибрилл, характерная для многих типов трансформированных клеток, сопряжена с нарушением созревания контактных структур (Ровенский, Васильев, 2004) и часто коррелирует с повышением локомоторной активности и (или) метастатического потенциала опухолевых клеток (Pokorna et al.,

1994; Sahai, Marshall, 2002). У трансформированных клеток в культуре наблюдаются нарушения распластывания. На всех стадиях распластывания нарушено распределение ламеллиподий, в результате чего ламеллы формируются в виде отдельных фрагментов, а не по всему периметру клетки. Уплотнение клетки идет неравномерно, дисковидной формы не наблюдается. По завершении распластывания такие клетки не достигают значительной площади, сравнимой с площадью нормальных клеток (Ровенский, Васильев, 2004).

Целью настоящей работы было установление роли каждого из процессов — полимеризации актина и актин-миозиновых взаимодействий — в процессе распластывания нормальных и *ras*-трансформированных фибробластов. Онкобелок Ras является важнейшим компонентом многих внутриклеточных сигнальных путей (Gille, Downward, 1999; Boettner, Van Aelst, 2002). Мы использовали клетки линии REF52tetRas с регулируемой тетрациклином экспрессией онкогена, в которых отмывка тетрациклина приводит к синтезу конститутивно активного белка Ras и к морфологической трансформации клеток (Копнин и др., 2003; Alexandrova et al., 2006). Мы детально исследовали структуру цитоскелета, характер и степень распластывания фибробластов на плоском адгезивном субстрате (покровном стекле) через 2, 4 и 24 ч после посадки. Для подавления актин-миозиновых взаимодействий были использованы ингибитор Rho-киназы, активирующей миозин II соединения Y27632 (Ishizaki et al., 2000), и ингибитор миозина II блебистатин (Straight et al., 2003; Kolega, 2004; Limouze et al., 2004); полимеризацию актина ингибировали с помощью латрункулина А (Spector et al., 1989).

Материал и методика

В работе использовали клетки линии REF52tetRas, любезно предоставленные проф. Б. П. Копниным (Agarova et al., 1999; Копнин и др., 2003). Клетки были получены из исходной линии REF52 (иммortalизованные крысиные эмбриональные фибробласты) путем трансфекции плазмидой с геном конститутивно активного белка N-Ras/asp12 под тетрациклинзависимым супрессором. Таким образом, мы имели возможность регулировать экспрессию онкогена *N-ras* и тем самым вызывать трансформацию клеток путем добавления (отмывки) тетрациклина из среды. Клетки культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин по 100 ед./мл) при 37 °C во влажной атмосфере в присутствии 5 % CO₂. Линию REF52tetRas вели в среде с добавлением тетрациклина в концентрации 2 мкг/мл каждые 3 сут. Для трансформации клеток тетрациклин отмывали и культивировали клетки в среде без тетрациклина в течение 5 сут, после чего использовали в экспериментах. Для характеристики распластывания клетки (50 тыс. кл./мл) высевали в чашки Петри (3.5 см) на покровные стекла и фиксировали через 2, 4 и 24 ч после пересева.

В экспериментах использовали 3 ингибитора: Y27632 — ингибитор Rho-киназы, 45 мкМ (Calbiochem, США); блебистатин — ингибитор АТФазной активности немышечного миозина II, 45 мкМ (Toronto Research Chemicals Inc., Канада); ингибитор полимеризации актина латрункулин А, 0.5 мкМ (Calbiochem, США). Ингибиторы добавляли одновременно с посадкой клеток.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания цитоскелетных структур клетки фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида на фосфатном буфере (PBS). Покровные стекла с клетками, предварительно промытые теплой средой без сыворотки, фиксировали 15 мин. Затем отмывали раствором PBS трижды по 5 мин и пермеабелизовали 0.5%-ным раствором Тритона X-100 на PBS в течение 5 мин, после чего отмывали PBS трижды по 5 мин. Для окрашивания F-актина применяли флуоресцентный краситель Alexa Fluor 488 phalloidin (Molecular Probes, США). Фокальные контакты выявляли с помощью моноклональных антител к винкулину anti-Vinculin hVIN-1 (Sigma, США), в качестве II антител использовали TRITC-anti-mouse (Sigma, США). Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Aristoplan (Zeiss, Германия), используя об. 100× и ок. 10×; микрофотосъемку препаратов осуществляли с использованием цифровой камеры Olympus DP70 с программным обеспечением DP Controller.

Для оценки скорости распластывания и морфометрического анализа клетки фиксировали через 2, 4 и 24 ч после пересева, затем окрашивали на F-актин и фотографировали (об. 40×). Полученные изображения одиночных клеток (по 30 клеток на точку) использовали для морфометрического анализа. Оценку скорости распластывания проводили путем сравнения площади и степени поляризации клеток на разных сроках распластывания. Контуры клеток в цифровом виде анализировали с помощью программы TRACER V1.0 (Dunn, Brown, 1986). При анализе формы измеряли следующие параметры: площадь, дисперсия, элонгация и степень поляризации клеток. Параметры дисперсия и элонгация были предложены в работе Брауна с коллегами (Brown et al., 1989). Элонгация является величиной, характеризующей степень вытянутости клеток (биполярность), и равна нулю у радиально симметричных фигур. Она определяется как \log_2 от отношения длинной оси эквимоментного эллипса фигуры к его короткой оси. Дисперсия — это величина, отражающая степень «изрезанности» края клетки (мультиполярность), и равна нулю для любого эллипса. Она определяется как \log_2 от отношения площади равномоментного эллипса контура к площади этого контура. Степень поляризации — сумма двух компонентов: дисперсии и элонгации.

Результаты

Изменения динамики распластывания фибробластов при *ras*-трансформации. Клетки линии REF52tetRas, культивируемые в присутствии тетрациклина, морфологически не отличались от исходной линии REF52. Через 2 ч после посадки на субстрат контрольные клетки находились в стадии радиального распластывания. Они имели дисковидную неполяризованную форму и образовывали псевдоподии по всему периметру. Актиновые стресс-фибриллы формировали кольцевой пучок, ассоциированный с крупными фокальными контактами, ориентированными радиально (рис. 1, а, з). Через 4 ч большинство клеток начинало поляризоваться. Кольцевой пучок актина постепенно замещался параллельными стресс-фибриллами (рис. 1, б). Фокальные контакты колокализовались с концами стресс-фибрилл и также ориентировались в направлении поляризации (рис. 1, д). Часто начинали появляться стабильные участки края. Через

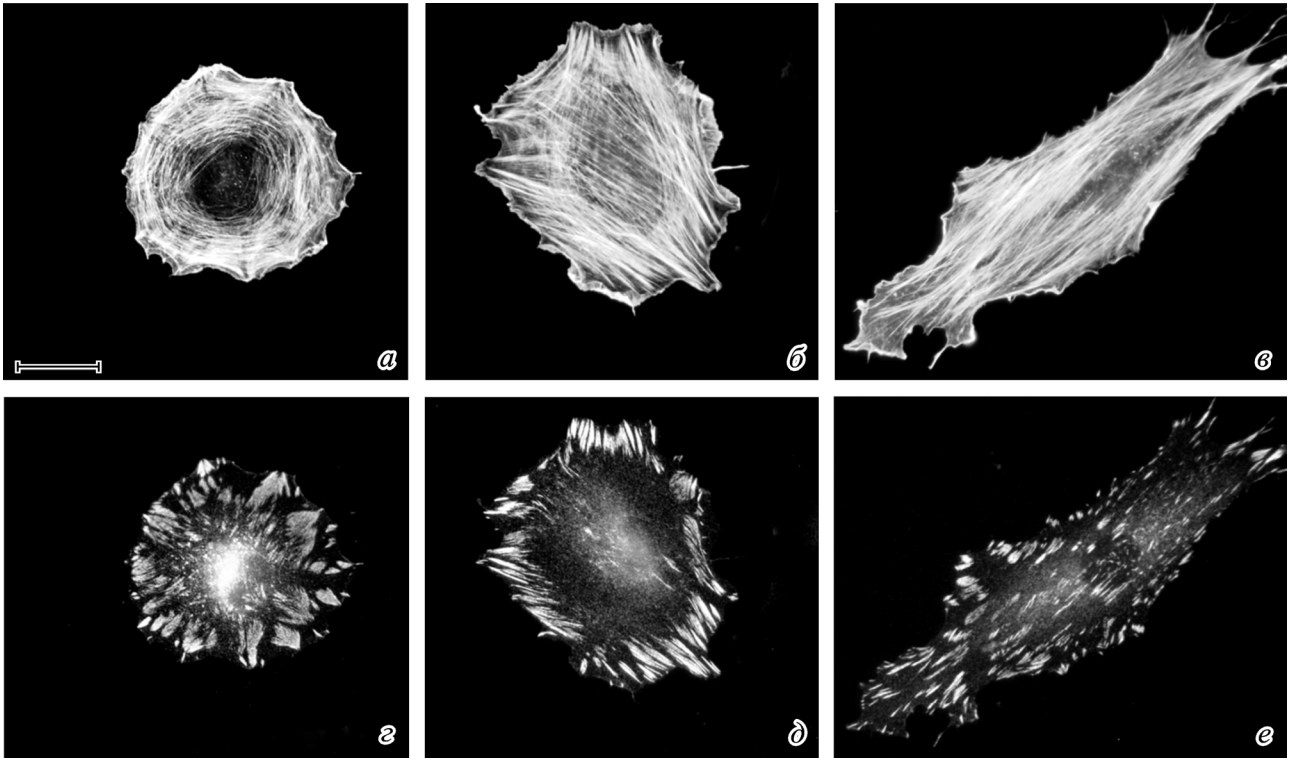


Рис. 1. Распластывание нетрансформированных фибробластов в контроле.

a, z — через 2 ч; *б, д* — через 4 ч; *в, е* — через 24 ч. Здесь и на рис. 2—6: флуоресцентная окраска на актин (*a—в*) и белок фокальных контактов винкулин (*z—e*). Масштаб — 20 мкм.

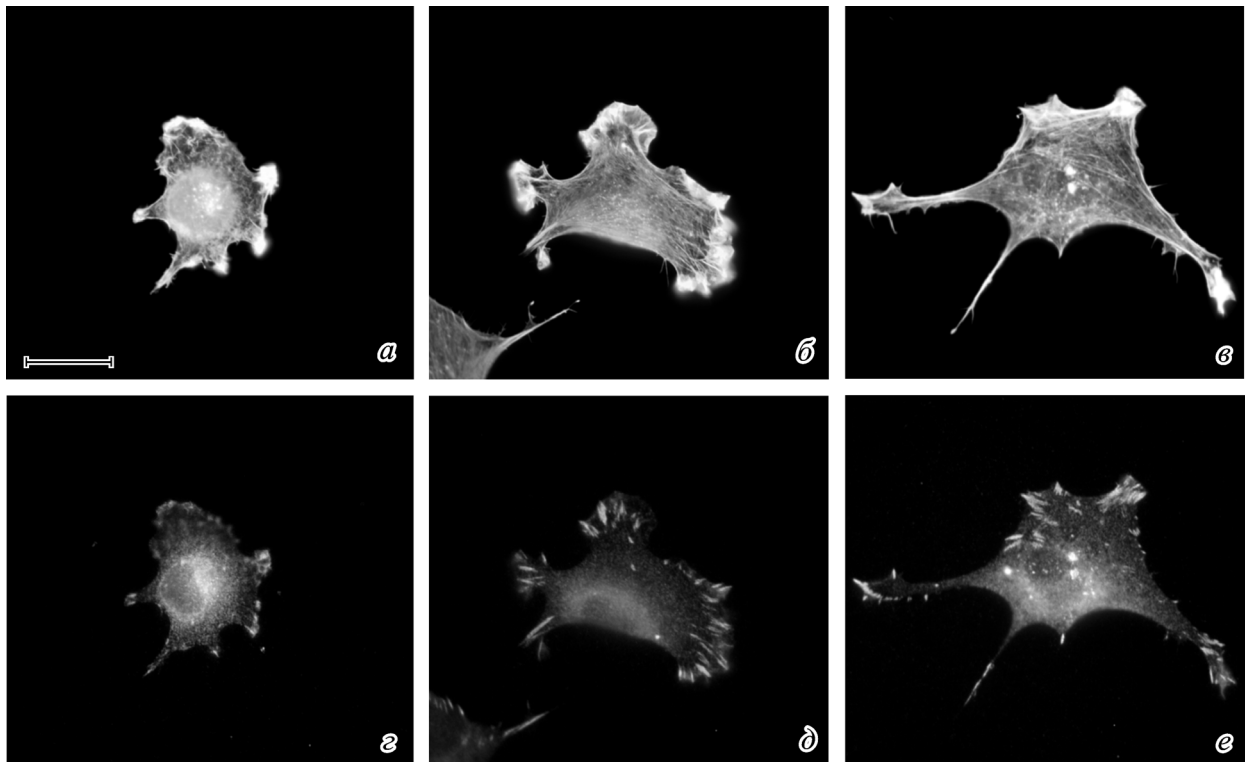


Рис. 2. Распластывание *ras*-трансформированных фибробластов.

a, z — через 2 ч; *б, д* — через 4 ч; *в, е* — через 24 ч.

Таблица 1

Данные морфометрического анализа контуров нормальных клеток через 2, 4 и 24 ч распластывания в контроле и при обработке веществом Y27632, блеббистатином и латрункулином А

Условия обработки	Площадь, мкм ²	Дисперсия	Элонгация	Степень поляризации
Контроль (время, ч):				
2	1551 ± 82	0.0349 ± 0.0049	0.2559 ± 0.0299	0.2908 ± 0.0333
4	2541 ± 92	0.0476 ± 0.0071	0.5213 ± 0.0638	0.5689 ± 0.0673
24	4665 ± 209	0.1769 ± 0.0216	1.1782 ± 0.0490	1.3552 ± 0.0527
Y27632 (время, ч):				
2	2860 ± 94	0.0129 ± 0.0011	0.2114 ± 0.0234	0.2243 ± 0.0235
4	3213 ± 105	0.0696 ± 0.0120	0.3872 ± 0.0523	0.4568 ± 0.0591
24	4689 ± 247	1.3605 ± 0.1457	1.4445 ± 0.1307	2.8050 ± 0.2121
Блеббистатин (время, ч):				
2	2180 ± 96	0.0451 ± 0.0064	0.4304 ± 0.0533	0.4755 ± 0.0559
4	2849 ± 147	0.0977 ± 0.0109	0.4557 ± 0.0578	0.5533 ± 0.0610
24	5566 ± 322	1.7740 ± 0.1309	1.5741 ± 0.1189	3.3481 ± 0.1986
Латрункулин А:				
2	390 ± 17	0.0152 ± 0.0018	0.2004 ± 0.0240	0.2156 ± 0.0242
4	769 ± 43	0.1780 ± 0.0306	0.7445 ± 0.0659	0.9225 ± 0.0808
24	1498 ± 80	0.0795 ± 0.0146	0.8873 ± 0.1099	0.9668 ± 0.1181

24 ч клетки были поляризованы и полностью распластаны. Как правило, они формировали одну или две широкие ламеллы на ведущем конце. Актиновые пучки становились мощными и протяженными и были направлены вдоль длинной оси клетки (рис. 1, в, е).

Трансформацию клеток индуцировали, как уже говорилось, путем отмывки тетрациклина из среды культивирования. Распластывание трансформированных клеток происходило иначе, нежели в контроле: через 2 ч после посадки клетки формировали отростки с ламеллиподиями и мелкими контактами на концах, где очень ярко окрашивался актин, значительно усиливался рафплинг. В отличие от нормальных, у трансформированных клеток на этом сроке распластывания псевдоподиальная активность не распределялась равномерно по всему краю, а сосредоточивалась на нескольких участках, где

сразу начиналось образование отростков. При этом многие участки края оставались ровными, без протрузий. Кольцевой пучок микрофиламентов не появлялся (рис. 2). Таким образом, у трансформированных клеток отсутствовала стадия радиального распластывания. На всех сроках пучки и фокальные контакты трансформированных клеток были значительно слабее выражены по сравнению с контрольными клетками и ориентированы в разных направлениях (рис. 2). На каждой стадии площадь распластывания была примерно в 2 раза меньше, чем в контроле (табл. 1, 2; рис. 7, а, б). Трансформированные клетки поляризовались раньше, и их степень поляризации была выше, чем у контрольных фибробластов, причем степень поляризации повышалась за счет дисперсии, т. е. за счет образования отростков (табл. 1, 2; рис. 7, в, з).

Таблица 2

Данные морфометрического анализа контуров трансформированных клеток через 2, 4 и 24 ч распластывания при обработке Y27632, блеббистатином и латрункулином А

Условия обработки	Площадь, мкм ²	Дисперсия	Элонгация	Степень поляризации
Ras (время, ч):				
2	844 ± 45	0.1401 ± 0.0231	0.4987 ± 0.0565	0.6387 ± 0.0668
4	1159 ± 65	0.6057 ± 0.0564	0.9426 ± 0.0874	1.5483 ± 0.1162
24	2283 ± 146	0.8083 ± 0.0809	1.3064 ± 0.1136	2.1147 ± 0.1143
Ras + Y27632:				
2	1046 ± 81	0.9776 ± 0.0754	0.9096 ± 0.1033	1.8871 ± 0.1392
4	1116 ± 59	1.4804 ± 0.0985	1.1027 ± 0.1005	2.5831 ± 0.1032
24	2932 ± 193	2.2141 ± 0.1457	2.0800 ± 0.1477	4.2942 ± 0.1464
Ras + блеббистатин:				
2	1216 ± 53	1.0430 ± 0.0781	0.8596 ± 0.1027	1.9026 ± 0.1069
4	1794 ± 80	0.9597 ± 0.0916	1.1539 ± 0.1419	2.1136 ± 0.1850
24	2793 ± 146	2.3441 ± 0.1552	1.9206 ± 0.1454	4.2647 ± 0.1439
Ras + латрункулин А:				
2	692 ± 40	0.2319 ± 0.0628	0.6483 ± 0.0900	0.8802 ± 0.1065
4	785 ± 44	0.4635 ± 0.0744	0.5939 ± 0.1057	1.0574 ± 0.1227
24	1148 ± 74	0.9010 ± 0.1481	1.0461 ± 0.1489	1.9471 ± 0.2259

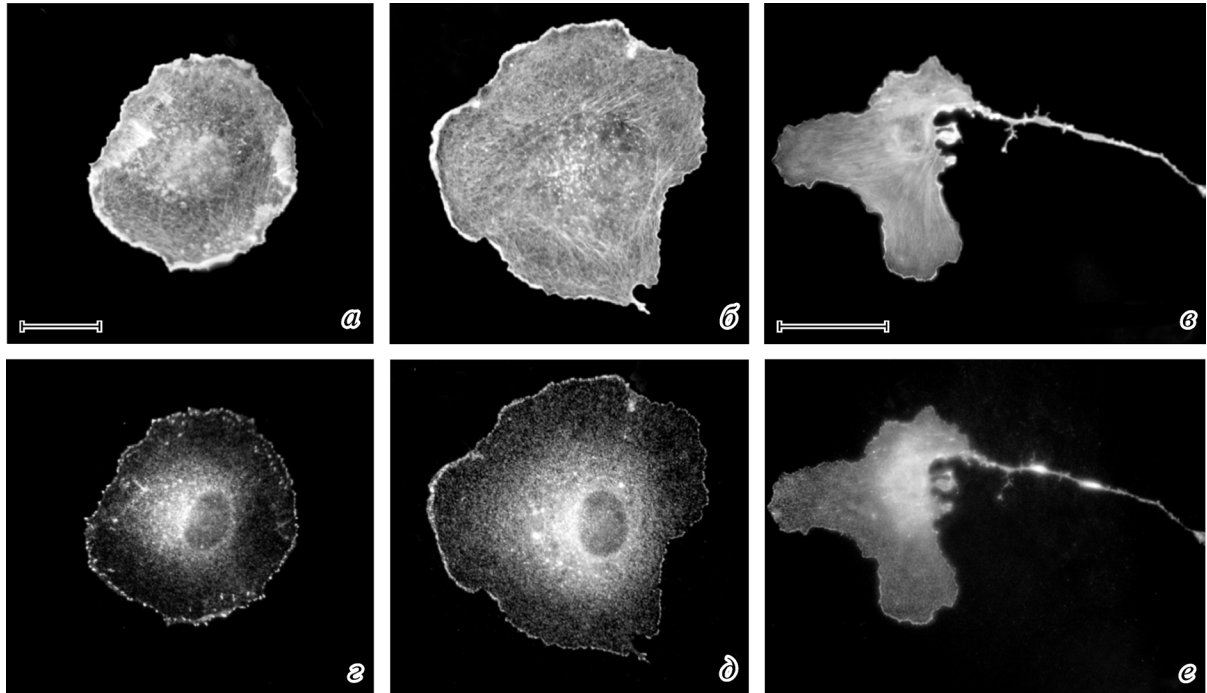


Рис. 3. Распластывание нетрансформированных фибробластов в присутствии блеббистатина. *a, г* — через 2 ч; *б, д* — через 4 ч; *в, е* — через 24 ч. Флуоресцентная окраска на актин (*a—в*) и белок фокальных контактов винкулин (*г—е*). Масштаб — 20 (*a, б, г, д*) или 50 (*в, е*) мкм.

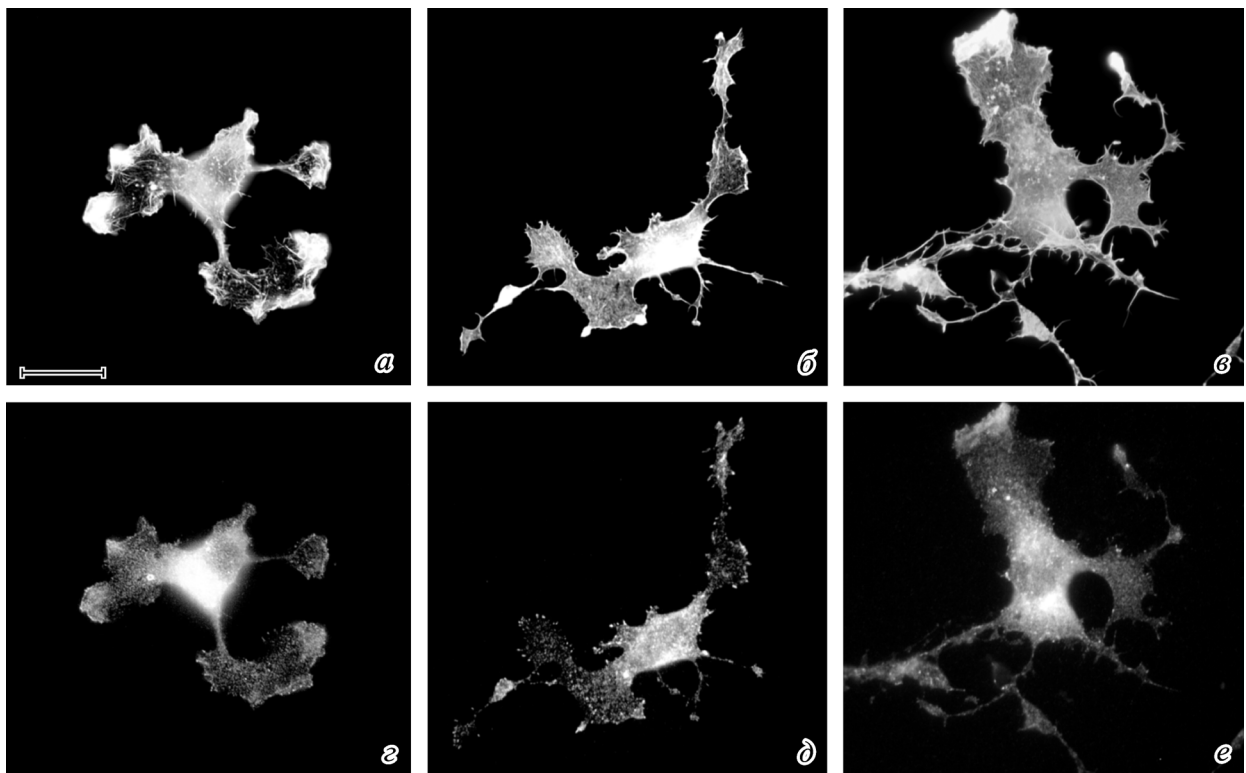


Рис. 4. Распластывание *ras*-трансформированных фибробластов в присутствии блеббистатина. *a, г* — через 2 ч; *б, д* — через 4 ч; *в, е* — через 24 ч. Масштаб — 20 мкм.

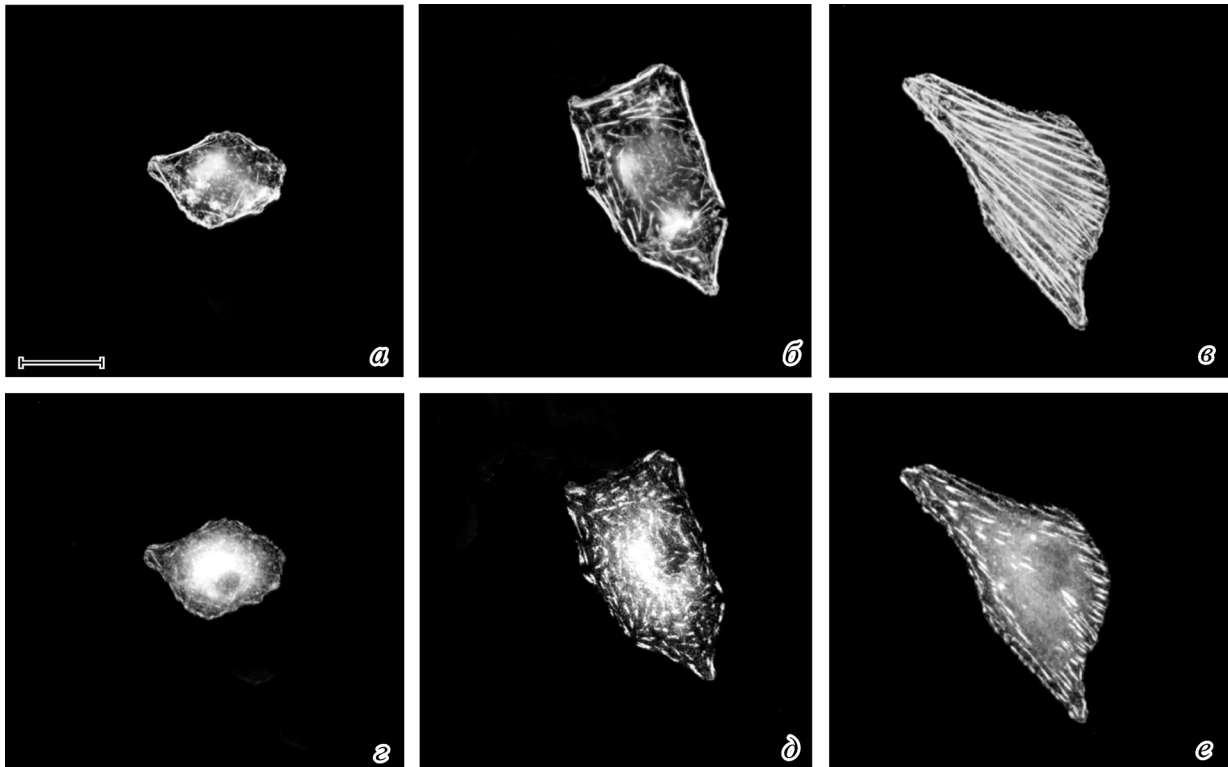


Рис. 5. Распластывание нетрансформированных фибробластов в присутствии латрункулина А.
а, с — через 2 ч; б, д — через 4 ч; в, е — через 24 ч. Масштаб — 20 мкм.

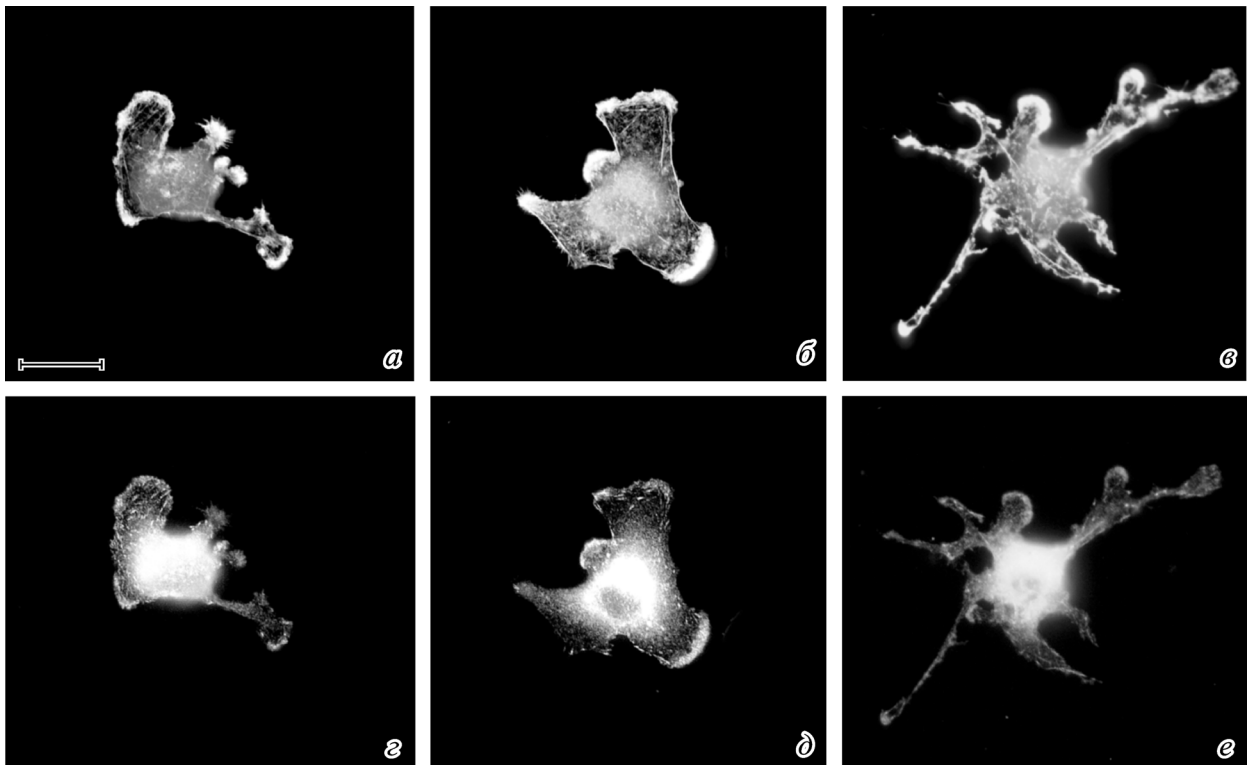


Рис. 6. Распластывание *ras*-трансформированных фибробластов в присутствии латрункулина А.
а, с — через 2 ч; б, д — через 4 ч; в, е — через 24 ч. Масштаб — 20 мкм.

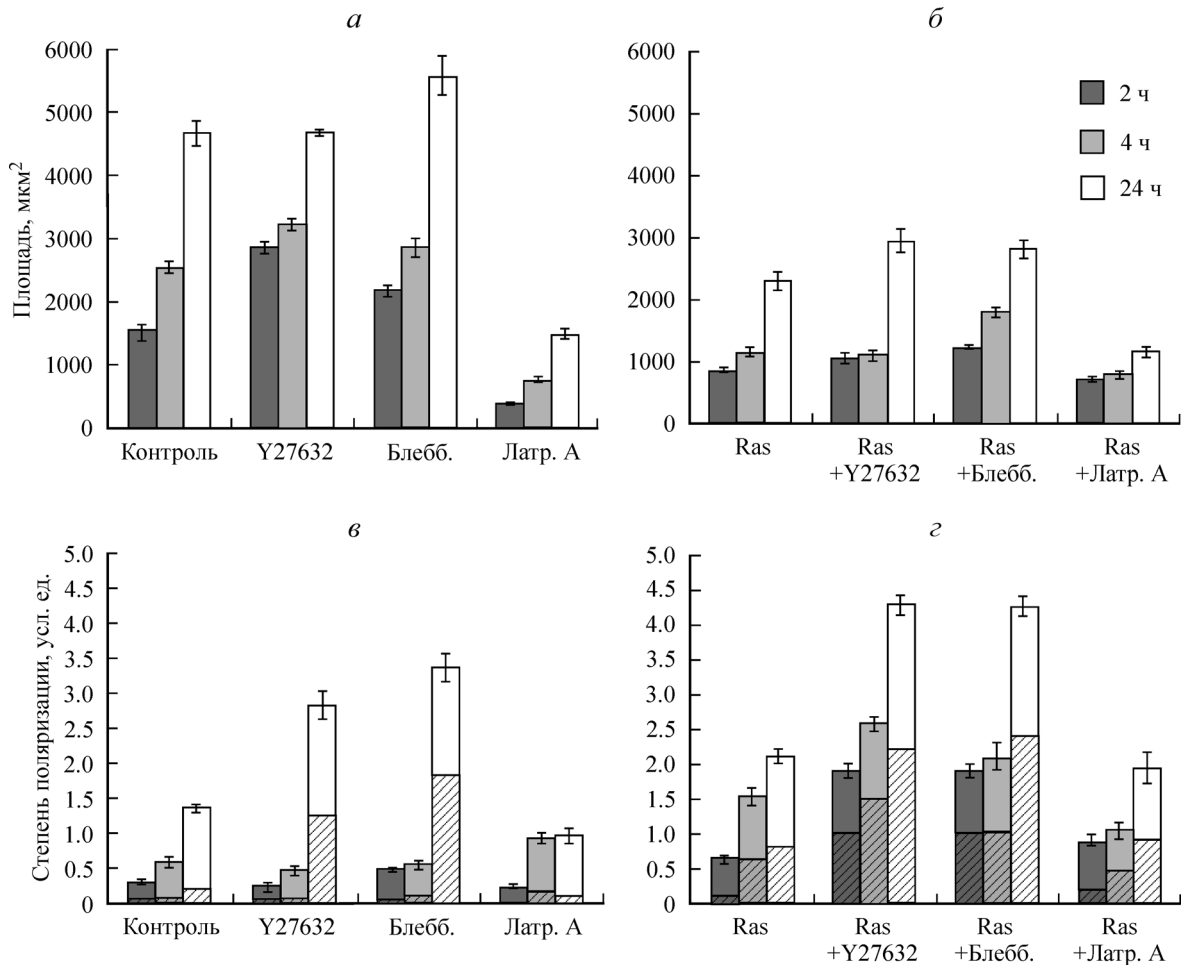


Рис. 7. Гистограммы динамики увеличения площади (а, б) и степени поляризации (в, г) в процессе распластывания фибробластов. в, г: заштрихованные столбцы — дисперсия, незаштрихованные — элонгация. Дисперсия и элонгация в сумме дают степень поляризации. Блебб. и Латр. А — соответственно блеббистатин и латрункулин А.

Влияние ингибиторов сократительной активности миозина II (Y27632 и блеббистатина) на динамику распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Через 2 ч распластывающиеся в присутствии ингибиторов клеточной сократимости нетрансформированные клетки также имели дисковидную или овальную форму. Ламеллиподии и многочисленные фокальные комплексы формировались вдоль всего клеточного края, но образования актиновых пучков и зрелых фокальных контактов не происходило (рис. 3, а, г). Вся клетка была практически равномерно заполнена густой сетью микрофиламентов. Площадь обработанных клеток через 2 ч распластывания была в 1.5 раза больше, чем в контроле. Через 4 ч клетки уже достигали значительной площади и имели стабильные участки края с отходящими от них тонкими хвостами, т. е. происходила их поляризация (рис. 3, б, д). Поляризация начиналась приблизительно в то же время, что и в контрольных клетках (табл. 1; рис. 7, в, г), но степень их поляризации вначале была даже меньше. Через 1 сут распластывания в присутствии ингибиторов из-за неспособности к ретракции клетки образовывали длинные и тонкие «хвосты», поэтому степень их поляризации возрастала в 2 раза (табл. 1; рис. 3, в, е). Конечная площадь клеток в присутствии Y27632 не отличалась от контроля, а в присутствии блеббистатина несколько увеличивалась, веро-

ятно, из-за накопления в культуре двуядерных клеток (Straight et al., 2003) (табл. 1; рис. 7, а, б). Таким образом, фибробласты с подавленной сократительной активностью распластывались быстрее.

Трансформированные клетки при распластывании в присутствии Y27632 или блеббистатина формировали множество длинных отростков и тонких хвостов, приобретая причудливую форму. Стадия радиального распластывания и в этом случае отсутствовала; активные края формировались не по всему периметру, а были сосредоточены на концах отростков (рис. 4). Актиновый цитоскелет был представлен лишь сетью микрофиламентов, а фокальные комплексы не созревали в крупные контакты (рис. 4). Ингибиторы клеточной сократимости ускоряли распластывание трансформированных клеток, но в меньшей степени, нежели контрольных (табл. 2; рис. 7, а, б). Степень поляризации трансформированных клеток при распластывании с ингибиторами сократимости также возрастала в 2 раза за счет повышения дисперсии (табл. 2; рис. 7, в, г).

Влияние ингибитора полимеризации актина латрункулина А на динамику распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Латрункулин А даже в малой дозе приводил к серьезным нарушениям распластывания нетрансформированных клеток. На всех сроках вдоль

клеточного периметра не наблюдалось заметных протрузий, края оставались сглаженными. В распластывающихся клетках формировались короткие хаотично расположенные пучки, не образующие единой системы, а сеть микрофиламентов между пучками практически не выявлялась, так же как и не происходило формирование ламеллиподий (рис. 5, *a—в*). На начальном этапе (2 ч) фокальные контакты были мелкие и немногочисленные, но укрупнялись по мере распластывания. На более поздних стадиях (4—24 ч) фокальные контакты крупные, а вновь образованных фокальных комплексов практически не наблюдалось (рис. 5, *г—е*). На всех этапах распластывания площадь клеток, обработанных латрункулином А, была значительно снижена по сравнению с контролем (табл. 1; рис. 7, *a, б*). Несмотря на подавление распластывания, клетки в присутствии латрункулина приобретали полигональную форму, т. е. могли поляризоваться, степень их поляризации не сильно отличалась от контроля (табл. 1; рис. 7, *в, г*).

Действие 0.5 мкМ латрункулина А на трансформированные фибробласты проявлялось абсолютно иначе. У большинства трансформированных фибробластов образовывались необычные выпуклые участки края, очень ярко окрашивающиеся фаллоидином и антителами к винкулину, — области с псевдоподиальной активностью (рис. 6). В центральной части клетки наблюдалась сильная дезорганизация актинового цитоскелета. Местами сохранялись тонкие короткие пучки и мелкие фокальные контакты (рис. 6). При подавлении полимеризации актина в трансформированных клетках не наблюдалось снижения скорости распластывания, а конечная площадь снижалась в меньшей степени, нежели площадь нетрансформированных клеток в присутствии латрункулина А (табл. 2).

Обсуждение

Распластывание нормальных фибробластов, происходящее по классической схеме — стадия радиального распластывания—стадия поляризации, — требует скоординированного участия обоих процессов — полимеризации актиновых филаментов и их последующей миозинзависимой перестройки. В результате таких перестроек на ранних стадиях распластывания, когда активный край равномерно распределен по всему периметру клетки, формируются круговые актиновые пучки, сопряженные с выраженными фокальными контактами, которые поддерживают регулярную форму клеток, но одновременно существенно сдерживают распластывание, вероятно за счет актин-миозинового натяжения. Поэтому обработка нормальных фибробластов ингибиторами миозинового натяжения приводит к ускорению распластывания (т. е. клетки быстрее достигают максимальной площади), хотя конечная площадь распластанных фибробластов в присутствии и в отсутствие ингибиторов существенно не различалась. Видимо, существует обратная зависимость скорости распластывания от активности миозина II (Wakatsuki et al., 2003). Кроме того, в присутствии Y27632 и блебистатина повышается интенсивность образования раффов на активном крае (Tsuji et al., 2002). Таким образом, еще одним фактором, ускоряющим распластывание клеток в присутствии ингибиторов сократимости, может быть усиление полимеризации актиновой сети и протрузии ведущего края. Поляризация в контрольных и обработанных клетках начинается одновременно, примерно че-

рез 4 ч после посадки (рис. 1, 2; 7, *в, г*). Возможно, инициация поляризации обеспечивается в основном не актин-миозиновыми взаимодействиями, как утверждают некоторые авторы (Pollard, Borisy, 2003; Lo et al., 2004; Krendel, Mooseker, 2005), а в большей степени зависит от распределения активности на клеточном крае. Показано, что важнейшую роль в установлении поляризации клетки играют микротрубочки (Vasiliev, Gelfand, 1976), это подтверждается и недавними исследованиями нашей группы (Shutova et al., 2008).

Есть данные о том, что обработка другим ингибитором миозина — 2, 3-бутандион-моноксимом (БДМ) — подавляет распластывание клеток (Домнина и др., 2001). Вероятно, подобное действие БДМ можно объяснить побочными эффектами этого ингибитора (Ostap, 2002).

Характерной особенностью фибробластов, обработанных Y27632 или блебистатином, является увеличение степени поляризации с течением времени. Это происходит за счет повышения элонгации и дисперсии и связано с неспособностью клетки к ретракции во время движения. Клетки оставляют позади себя узкие «хвосты», удлиняющиеся по мере перемещения по субстрату (Somlyo et al., 2000; Worthylake et al., 2001; Shutova et al., 2008).

Для исследования особенностей распластывания при трансформации мы использовали систему, в которой моноонкогенная трансформация фибробластов в культуре приводит к проявлению классического трансформированного фенотипа. Это удобная модель для изучения механизмов движения, так как мы знаем, что наблюдаемые нами изменения вызваны гиперактивацией белка Ras, и можем делать заключения о сигнальных путях, регулирующих эти процессы. Наблюдаемые нами изменения морфологии и локомоторного поведения обусловлены прежде всего изменением системы актиновых микрофиламентов и ассоциированных с ними фокальных контактов. Ранее было показано, что при трансформации инициация образования контактных структур не нарушается, но натяжение актин-миозиновых пучков ослабевает и контакты созревают хуже и становятся более мелкими (Vasiliev, 2004).

Еще одно существенное различие состоит в том, что *ras*-трансформированные клетки имеют более чем один активный край и участки псевдоподиальной активности непостоянны (Ровенский, Васильев, 2004). Известно, что активация Ras играет важную роль в формировании активного края и тем самым регулирует полярность клетки и направленность ее движения (Sasaki et al., 2004). В норме в ответ на химический стимул на ведущем крае происходит кратковременная активация Ras, что локально индуцирует и усиливает полимеризацию актина (BurrIDGE, Wennerberg, 2004). Мы предполагаем, что при постоянной активации Ras в *ras*-трансформированных клетках индукция полимеризации актина происходит спонтанно на разных участках края вне зависимости от каких-либо стимулов. Фрагментарность распластывания «компенсируется» повышенной активностью края образующихся отростков (Ломакина, Александрова, 2009). Вероятно, поэтому скорость распластывания при трансформации клеток не меняется (имеется в виду доля от конечной площади на том или ином этапе распластывания) (табл. 1, 2; рис. 7). Но конечная площадь трансформированных фибробластов в 2 раза меньше, чем контрольных, возможно потому, что при *ras*-трансформации нарушено формирование зрелых фокальных контактов, что ведет к ухудшению прикрепления клеток к субстрату. Мощные пучки не развиваются на

слабых контактах, но при этом сохраняется способность к сокращению, что приводит к легкому отрыву и подтягиванию. Таким образом, ослабленная система фокальных контактов не может поддерживать сильно распластанный на субстрате клетку. Из-за «фрагментарного» характера распластывания трансформированные фибробласты поляризуются раньше и имеют более высокую степень поляризации. Как уже говорилось, в величину степени поляризации вносят вклад дисперсия и элонгация. Дисперсия при трансформации повышается за счет многочисленных отростков, однако средняя элонгация не меняется, потому что отростки образуются в разных направлениях.

При действии ингибиторов миозина II на трансформированные клетки происходят изменения цитоскелета, аналогичные тем, которые наблюдаются у нормальных клеток: полностью пропадают пучки микрофиламентов и более зрелые контакты. Однако трансформированные фибробласты уже имеют пониженную сократимость по сравнению с нормальными (Минина и др., 2003; Ровенский, Васильев, 2004), что может объясняться понижением активности Rho-киназы в ответ на активацию онкобелком Ras ERK-MAP-киназного сигнального пути (Sahai et al., 2001). Таким образом, морфологические изменения, вызванные «дополнительным» действием ингибиторов миозина, в этом случае менее выражены. Более того, при подавлении сократимости в трансформированных клетках скорость распластывания на ранних этапах не повышается. Правда, увеличивается конечная площадь и сильно возрастает степень поляризации, поскольку высокая подвижность и отсутствие ретракции в этом случае позволяют клеткам сильно «раскидываться» в разных направлениях, оставляя на субстрате хвосты и участки своего тела.

Наибольшие различия между нормальными и трансформированными клетками наблюдались при воздействии ингибитора полимеризации актина — латрункулина А. В работе мы использовали низкую концентрацию ингибитора, чтобы подавить полимеризацию актина *de novo*, но не разрушить всю систему микрофиламентов. Под воздействием малых доз латрункулина А происходит существенное подавление распластывания нормальных фибробластов: клетки распластываются медленнее, и значение их конечной площади не достигает и половины контрольного. Края клеток становятся сглаженными, поскольку протрузия ведущего края зависит от полимеризации актиновой сети в зоне ламеллиподии. Вследствие этого образование новых фокальных комплексов также подавлено, однако те немногие фокальные комплексы, которые образовались, созревают в фокальные контакты. Клеточная сократимость не нарушена, и мощные актин-миозиновые пучки продолжают формироваться. Таким образом, малые концентрации латрункулина А в нормальных клетках прежде всего нарушают образование ламеллиподий, но не пучков. Степень поляризации фибробластов при подавлении полимеризации актина фактически не изменяется, т. е. она не зависит прямо от интенсивности полимеризации.

Характер изменений в трансформированных фибробластах качественным образом различается. Нормальная структура ламеллиподии исчезает, но полимеризация актина не блокируется полностью, несмотря на наличие ингибитора: по периметру клеточного края выявляются участки, обогащенные F-актином и винкулином. Очевидно, в этих местах происходит протрузия и формирование адгезионных структур. В то же время остальная актиновая система полностью дезорганизована, пучки не фор-

мируются совсем. Распластывание трансформированных фибробластов в этих условиях также подавляется, но в меньшей степени, чем у нетрансформированных клеток. Скорость распластывания и поляризации не уменьшается, а конечная площадь при обработке латрункулином А снижается меньше, чем у нормальных клеток. Ранее показано, что постоянная активация Ras в трансформированных клетках приводит к активации ERK-MAP-киназного сигнального каскада (Sahai et al., 2001), что в свою очередь приводит к снижению активности Rho-киназы и повышению активности другой малой ГТФазы Rac. Мы предполагаем, что такие изменения сигнальных путей приводят к изменению баланса интенсивности полимеризации на краю клетки (образование ламеллиподии) и в центре (построение пучков). Трансформированные клетки имеют более высокую активность края и более слабые пучки. Поэтому в условиях «дефицита» G-актина весь свободный актин идет на край и протрузии успешно образуются, хотя их морфология отличается от нормальной. Формирование пучков у трансформированных клеток нарушено, и дефицит свободного G-актина приводит к еще большей разборке этих структур. У нормальных клеток более чувствительным процессом оказывается формирование ламеллиподии, и недостаток G-актина в первую очередь сказывается на этом процессе, а формирование пучков происходит и в присутствии низкой концентрации латрункулина А. Обработка клеток более высокой концентрацией приводит к полной разборке всех актиновых структур (Spector et al., 1989).

Итак, согласно нашим данным, наиболее существенным этапом в распластывании фибробластов на двумерном субстрате является полимеризация актиновой сети на активном крае. Последующие взаимодействия миозина II с актином в данном случае не являются необходимыми. Подавление этих взаимодействий не оказывает отрицательного влияния на скорость распластывания, а даже несколько увеличивает ее. Инициация поляризации клеток также может происходить в присутствии ингибиторов сократимости и, по-видимому, определяется распределением краевой активности. Зато подавление полимеризации актина приводит к резкому ухудшению распластывания нормальных фибробластов. Локомоторное поведение трансформированных клеток оказывается менее чувствительным к действию ингибиторов миозина II и полимеризации актина, что, вероятно, объясняется нарушением регуляторных механизмов подвижности при трансформации. Возможно, повышенная активация многих сигнальных путей у трансформированных клеток, в частности за счет постоянной активации Ras, приводит к тому, что они менее эффективно реагируют на внешние сигналы. Меньшая реактивность трансформированных клеток по сравнению с нормальными проявляется также при реакции их на различные субстраты (Moizhess, Vasiliev, 2001). Такая пониженная реакция трансформированных клеток на регуляторные сигналы, поступающие извне (в нашем случае на воздействие ингибиторов), является существенным адаптационным механизмом, позволяющим опухолевым клеткам инвазировать в соседние ткани, прикрепляться и образовывать новые колонии в условиях, в которых нормальные клетки существовать не могут.

Авторы выражают благодарность проф. Б. П. Копнину за предоставление клеток линии REF52tetRas и проф. Ю. М. Васильеву за внимание к работе и критические замечания.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00452) и НШ4064.2008.4.

Список литературы

- Домнина Л. В., Иванова О. Ю., Васильев Ю. М. 2001. Изменение поляризации фибробластов при изменении контрактильности актинового цитоскелета. Цитология. 43 (2) : 133—141.
- Копнин П. Б., Иванов А. В., Ильинская Г. В., Саблина А. А., Копнин Б. П., Чумаков П. М. 2003. Защитная роль при Ras-индуцированной трансформации клеток REF52. Молекуляр. биол. 37 (3) : 458—471.
- Ломакина М. Е., Александрова А. Ю. 2009. Анализ изменений, вызываемых экспрессией онкогена *N-ras*, в характере и распределении псевдоподиальной активности фибробластов. Онтогенез. 4 (4) : 282—293.
- Минина С. А., Александрова А. Ю., Васильев Ю. М. 2003. Изменения формы клеток и актинового цитоскелета при трансформации, вызванной онкогеном *ras*; возможная роль Rho-киназы. Докл. РАН. 388 : 1—3.
- Ровенский Ю. А., Васильев Ю. М. 2004. Морфогенетические реакции клеток и их нарушения при опухолевой трансформации. В кн.: Канцерогенез. М.: Медицина. 376—414 с.
- Agarova L. S., Ivanov A. V., Sablina A. A., Kopnin P. B., Sokova O. I., Chumakov P. M., Kopnin B. P. 1999. p53-dependent effects of *RAS* oncogene on chromosome stability and cell cycle checkpoints. *Oncogene*. 18 : 3135—3142.
- Alexandrova A. Y., Arnold K., Schaub S., Vasiliev J. M., Meister J. J., Bershadsky A. D., Verkhovsky A. B. 2008. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS ONE*. 3 : e3234.
- Alexandrova A. Y., Kopnin P. B., Vasiliev J. M., Kopnin B. P. 2006. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp. Cell Res.* 312 : 2066—2073.
- Bershadsky A. D., Ballestrem C., Carram L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A. Y., Verkhovsky A. B., Shevish T., Kozlov M. M. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur. J. Cell Biol.* 85 : 165—173.
- Boettner B., Van Aelst L. 2002. The RASputin effect. *Genes Develop.* 16 : 2033—2038.
- Brown A. F., Dugina V. B., Dunn G. A., Vasiliev J. M. 1989. A quantitative analysis of alterations in the shape of cultured fibroblasts induced by tumour-promoting phorbol ester. *Cell Biol. Int. Rep.* 13 (4) : 357—366.
- Burridge K., Wennerberg K. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 116 : 16—79.
- Dunn G. A., Brown A. F. 1986. Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation. *J. Cell Sci.* 83 : 313—340.
- Gille H., Downward J. 1999. Multiple ras effector pathways contribute to G₁ cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 274 : 22 033—22 040.
- Ingber D. E. 1991. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3 : 841—848.
- Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M., Narumiya S. 2000. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* 57 : 976—983.
- Kolega J. 2004. Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 : 1020—1025.
- Krendel M., Mooseker M. S. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology*. 20 : 239—251.
- Limouze J., Straight A. F., Mitchison T., Sellers J. R. 2004. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25 : 337—341.
- Lo C. M., Buxton D. B., Chua G. C., Dembo M., Adelstein R. S., Wang Y. L. 2004. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol. Biol. Cell*. 15 : 982—989.
- Moizhess T. G., Vasiliev J. M. 2001. Substrate-induced polarization of cultured epitheliocytes and fibroblasts: non-reactivity of ras-transformed cells. *Cell Biol. Int.* 9 : 931—934.
- Ostap E. M. 2002. 2, 3-butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23 : 305—308.
- Pokorna E., Jordan P. W., O'Neill C. H., Zicha D., Gilbert C. S., Vesely P. 1994. Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 28 : 25—33.
- Pollard T. D., Borisy G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112 : 453—465.
- 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.
- Rottner K., Krause M., Gimona M., Small J. V., Wehland J. 2001. Zyxin is not colocalized with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) at lamellipodial tips and exhibits different dynamics to vinculin, paxillin and VASP in focal adhesions. *Mol. Biol. Cell*. 12 : 3103—3113.
- Sahai E., Marshall C. J. 2002. Rho-GTPases and cancer. *Nature Rev. Cancer*. 2 : 132—142.
- Sahai E., Olson M. F., Marshall C. J. 2001. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J.* 20 : 755—766.
- Sasaki A. T., Chun C., Takeda K., Firtel R. A. 2004. Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. *J. Cell Biol.* 167 : 505—518.
- Shutova M. S., Alexandrova A. Y., Vasiliev J. M. 2008. Regulation of polarity in cells devoid of actin bundle system after treatment with inhibitors of myosin II activity. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 65 : 734—746.
- Somlyo A. V., Bradshaw D., Ramos S., Murphy C., Myers C. E., Somlyo A. P. 2000. Rho-kinase inhibitor retards migration and *in vivo* dissemination of human prostate cancer cells. *FEBS Lett.* 269 : 652—659.
- Spector I., Shochet N. R., Blasberger D., Kashman Y. 1989. Latrunculin — novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth. I. comparison with cytochalasin D. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 13 : 127—144.
- Straight A. F., Cheung A., Limouze J., Chen I., Westwood N. J., Sellers J. R., Mitchison T. J. 2003. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*. 299 : 1743—1747.
- Svitkina T. M., Neyfakh A. A., Jr., Bershadsky A. D. 1986. Actin cytoskeleton of spread fibroblasts appears to assemble at the cell edges. *J. Cell Sci.* 82 : 235—248.
- Tsuji T., Ishizaki T., Okamoto M., Higashida C., Kimura K., Furuyashiki T., Arakawa Y., Birge R. B., Nakamoto T., Hirai H., Narumiya S. 2002. ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 157 : 819—830.
- Vasiliev J. M. 2004. Cytoskeletal mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells. *Int. J. Develop. Biol.* 48 : 425—439.
- Vasiliev J. M., Gelfand I. M. 1976. Effects of colcemid on morphogenetic processes and locomotion of fibroblasts. In: *Cell Motility. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab.* 279—304.
- Wakatsuki T., Wysolmerski R. B., Elson E. L. 2003. Mechanics of cell spreading: role of myosin II. *J. Cell Sci.* 116 : 1617—1625.
- Worthylake R. A., Lemoine S., Watson J. M., Burridge K. 2001. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.* 154 : 147—160.

COMPARATIVE RESEARCH OF NORMAL AND TRANSFORMED FIBROBLAST SPREADING.
THE ROLE OF MICROFILAMENT POLYMERIZATION AND ACTIN-MYOSIN CONTRACTILITY*M. S. Shutona, A. Y. Alexandrova*Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Cancer Research Center RAMS, Moscow
e-mail: tonya_alex@yahoo.com

Polymerization of microfilaments and their subsequent rearrangements under control of actin-myosin interactions are two main processes underlined morphogenetic reactions of cells. We studied their role during spreading of normal and transformed REF52tetRas fibroblasts with adjustable *ras* oncogene expression. Treatment with inhibitors of cell contractility (Y27532 or blebbistatin) led to disappearance of actin bundles and focal adhesions, but both normal and transformed cells preserved high pseudopodial activity. Spreading was considerably accelerated in normal cells and less accelerated in *ras*-transformed cells under these conditions. When actin polymerization was suppressed with low concentrations of latrunculin A, stress-fibrils and focal contacts were preserved, but lamellipodial activity was lost in normal cells, so spreading was dramatically inhibited. In the case of transformed fibroblasts, actin bundles and focal adhesions virtually disappeared, but pseudopodial activity was not lost and spreading was suppressed to a lesser extent. Therefore, the most essential process in regulation of cell spreading and polarization is microfilament polymerization at the leading edge. Incidentally, *ras*-transformed cells are less sensitive to inhibitors affecting cytoskeletal structure than non-transformed ones. Possible mechanisms underlying these diversities are discussed.

Key words: lamellipodium, stress fibers, Rho-kinase, cell area, extension.
