ДИНАМИЧНЫЕ МИКРОТРУБОЧКИ ПОДАВЛЯЮТ БЛЭББИНГ И СТИМУЛИРУЮТ РАСПЛАСТЫВАНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ

© А. В. Творогова, 1 И. А Воробьев

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова; ¹ электронный адрес: annatvor@mail.ru

Проведено сравнение процессов распластывания фибробластов Vero в норме, при полной деполимеризации микротрубочек (МТ) и при подавлении динамической нестабильности МТ. После прикрепления к субстрату клетки Vero вступают в фазу блэббинга, продолжительность которой сильно варьирует у отдельных клеток, а после его окончания — в стадию распластывания, которое может происходить двумя способами: изотропно (за счет быстрого образования кольцевой ламеллы — 15 % клеток) или анизотропно, за счет процессивного выдвижения ламеллиподий (большинство клеток). Скорость распластывания фибробластов максимальна на первых этапах и в течение 1 ч уменьшается по логарифмическому закону. Через 1 ч большинство клеток приобретают стабильные края и переходят к движению, однако медленное увеличение средней площади клеток продолжается в течение 1 сут. Формирование актиновых пучков начинается через 20 мин после прикрепления клеток, и первые пучки идут по периметру клетки. Сеть стресс-фибрилл, пересекающих клетку, формируется через 1-2 ч. Кольцевая ламелла, если она образуется на ранних стадиях распластывания, лишена пучков актиновых филаментов. При деполимеризации и при стабилизации МТ блэббинг начинается до прикрепления клеток к субстрату и становится в несколько раз продолжительнее, чем в контроле. В обоих случаях начальная скорость распластывания значительно снижается, но остается постоянной. Через 1 сут площадь клеток достигает таких же значений, как в контроле. Края у клеток при стабилизации и деполимеризации МТ выражены не очень отчетливо. Стабилизация и деполимеризация МТ мало влияют на формирование актиновых пучков, за исключением того, что пучки, идущие вдоль краев клеток, сохраняются до 40-60 мин. В клетках, которые длительное время находятся в стадии блэббинга, также могут формироваться актиновые пучки. В распластывающихся клетках МТ располагаются в основном радиально. Они входят в отдельные пузыри при блэббинге, в большинство ламеллиподий и в ламеллу. При стабилизации МТ не заходят в ламеллиподии и идут параллельно краю клетки на расстоянии в 3-5 мкм. Таким образом, динамичные МТ существенным образом ускоряют ранние этапы распластывания фибробластов.

Ключевые слова: фибробласты, актин, микротрубочки, распластывание, микроскопия.

Распластывание на субстрате и движение по нему являются важным свойством клеток животных. Распластывание и движение эпителиальных клеток и фибробластов происходят за счет выдвижения плоских, свободных от органелл выростов — ламеллиподий или псевдоподий (Kay et al., 2008; Berzat, Hall, 2010; Lafarga et al., 2012). Распластывание клеток является многостадийным процессом, который включает в себя: 1) прикрепление к субстрату, 2) начальное распластывание за счет быстрого увеличения пятна контакта, 3) постепенное распластывание за счет выдвижения и втягивания ламеллиподий и 4) стабилизацию контактов ламеллиподий с субстратом (Bereiter-Hahn et al., 1990; Dubin-Thaler et al., 2004, 2008).

Ключевое событие в процессе распластывания — выдвижение ламеллиподий — обеспечивается полимеризацией актина (Insall, Machesky, 2009) и регулируется различными внешними и внутренними факторами (Wakatsuki et al., 2003; Dubin-Thaler et al., 2004; Kay et al., 2008).

Микротрубочки (МТ) играют существенную роль в формировании ламеллиподий (Watanabe et al., 2005). Они могут непосредственно взаимодействовать с сократимым актомиозиновым кортексом (Levina et al., 2001) или стимулировать полимеризацию F-актина за счет доставки своими плюс-концами малых ГТФаз (Fukata et al., 2002; Krendel et al., 2002; Nalbant et al., 2009). Также кинезинзависимый транспорт вдоль МТ обеспечивает перенос везикул, которые участвуют в новообразовании мембраны на активном краю клетки (Reed et al., 2006; Kay et al., 2008). Кроме того, МТ обеспечивают быстрый обмен фокальных контактов — подавление динамики МТ стимулирует рост фокальных контактов и тормозит направленное движение клеток (Kaverina et al., 1999; Wagner et al., 2002).

Однако динамика процесса распластывания фибробластов исследована недостаточно подробно — так, остается практически неописанной кинетика увеличения площади клеток во времени. Соответственно роль МТ в процессе распластывания клеток охарактеризована только на качественном уровне.

Деполимеризация МТ в уже распластанных клетках ведет к гипертрофии стресс-фибрилл (Vasiliev et al., 1970; Waterman-Storer et al., 1999; Omelchenko et al., 2002) и увеличению сократимости актомиозиновых комплексов (Pletjushkina et al., 2001; Small et al., 2002a, 2002b). Таким образом, предполагается, что МТ препятствуют сокращению клеток (Wittman, Waterman-Storer, 2001; Small et al., 2002a, 2002b; Rodriguez et al., 2003). Однако деполимеризация МТ не ведет к уменьшению площади, занимаемой клетками на субстрате (Pletjushkina et al., 2001).

Ранее мы показали, что МТ необходимы для эффективного втягивания клеточного края в уже распластанных клетках (Добринских, Воробьев, 2006). Поэтому можно было бы ожидать, что деполимеризация МТ может ускорить процесс распластывания. В то же время ряд наблюдений указывает на то, что распластывание фибробластов в отсутствие МТ происходит с такой же скоростью или даже медленнее, чем в норме (Kolodny, 1972; Ivanova et al., 1976; Domnina et al., 1985; Pletjushkina et al., 2001). Распластывание также замедляется при подавлении ацетилирования МТ (Rhee et al., 2007; Tran et al., 2007).

Показано, что многие нарушения в поведении фибробластов, которые ранее рассматривались как результат деполимеризации МТ — неспособность клеток формировать новую ламеллу на краю экспериментальной раны, дополнительное натяжение и сокращение края клетки могут возникать в условиях, когда МТ сохраняются, но стабилизируются (Danowski, 1989; Liao et al., 1995; Grigoriev et al., 1999). Однако вопрос о роли динамической нестабильности МТ в распластывании клеток остается практически неисследованным.

Поэтому в настоящей работе мы сравнили процессы распластывания фибробластов при деполимеризациии МТ и при их стабилизации (т. е. при подавлении динамической нестабильности), проводя прижизненные наблюдения с момента соприкосновения клеток с субстратом. Поскольку введение агентов, деполимеризующих МТ, может приводить к быстрому сокращению фибробластов (Danowski, 1989; Bershadsky et al., 1991), в наших экспериментах вещества, влияющие на МТ (нокодазол и таксол), вводились до начала наблюдений. Оказалось, что стабилизация и деполимеризация МТ почти не оказывают влияния на начальное прикрепление клеток, но значительно замедляют начальные этапы их распластывания.

Материал и методика

Культура клеток. Клетки культуры Vero культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % СО₂ в среде DMEM с добавлением 25 мМ HEPES (ПанЭко, Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Laboratories, Aвстрия) и гентамицина в концентрации 0.08 мг/мл. Для детального анализа распластывания клеточную суспензию, полученную при помощи раствора трипсин-ЭДТА (ПанЭко, Россия), помещали в 35-миллиметровые чашки Петри. Концентрацию клеток подбирали таким образом, чтобы клетки на подложке в процессе распластывания не касались друг друга. Прижизненные наблюдения проводили на инвертированном микроскопе Nikon TE-300 с термостатированным столиком под объективом 20×/0.45 (фазовый контраст) при 36.5—37 °С. Запись изображения проводили при помощи цифровой камеры CoolSnap HQ с интервалами времени между кадрами 1-2 мин. В экспериментах к суспензии клеток добавляли нокодазол в конечной концентрации 13.2 · 10-6 М для полного разрушения системы МТ или сочетание низких концентраций нокодазола (100 нМ) и таксола (50 нМ), которое приводит к подавлению динамической нестабильности МТ (Grigoriev et al., 1999).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного выявления цитоскелетных структур клетки использовали двойное окрашивание фаллоидином и антителами против α-тубулина. Перед окрашиванием клетки фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида на PBS (pH = 7.2) в течение 10 мин при температуре 4 °С. После трехкратной отмывки буфером клетки пермеабилизировали 0.1%-ным раствором Triton X-100 на PBS в течение 1 ч при комнатной температуре и трижды обрабатывали 1%-ным раствором боргидрида Na. После обработок проводили окрашивание антителами. В случае двойного окрашивания клетки сначала обрабатывали моноклональными антителами против α -тубулина (clone DM1-A, eBioscience, CША) и вторыми антителами, конъюгированными с Су^{тм}-2 (Sigma, США), а затем фаллоидином, конъюгированным с AlexaFluor-568 (Invitrogen, США). Препараты заключали в Mowiol-4-88 (Sigma, США). Фиксированные препараты фотографировали на инвертированном микроскопе Nikon ТЕ-300 при помощи цифровой камеры CoolSnapHQ с объективом PlanApo 60×/1.4 (фазовый контраст) с использованием наборов светофильтров для FITC и Texas-Red.

А н а л и з д а н н ы х. Обработку и анализ полученных фильмов проводили в программах Metamorph (Metamorph Inc., США) и ImageJ (NIH Image, США). Скорость распластывания оценивали как скорость увеличения площади клетки на субстрате в единицу времени. В качестве нулевой точки для каждой клетки был выбран последний кадр перед первым выдвижением ламеллиподии. Данные, статистически обработанные в программе Sigma Plot 3.0 (Jandel Scientific, США), приведены как средние значения со стандартной ошибкой.

Конечную обработку флуоресцентных изображений для печати проводили в программах Metamorph 5.1 (Metamorph Inc., США) и Adobe Photoshop (Adobe Inc., США).

Результаты

1. Нормальное распластывание. После прикрепления к субстрату почти все клетки переходят в фазу блэббинга (рис. 1, *a*). Блэббинг оканчивается у каждой отдельной клетки внезапно, и после этого клетки сразу начинают распластывание.

По окончании блэббинга наблюдаются два сценария. 1. Большинство клеток распластываются сразу в нескольких направлениях за счет выдвижения и частичного втягивания ламеллиподий (рис. 1, δ). При этом в течение 20—30 мин выделяется один или несколько участков, имеющих большую ламеллиподиальную активность по сравнению с соседними. Такие активные участки превращаются в ламеллы, которые, удлиняясь в центробежном направлении и практически не расширяясь в тангенциальном направлении, растягивают клетку. В результате клетка приобретает стабильные края и становится веретеновидной или полигональной.

2. Формирование тонкой кольцевой ламеллы. Клетка быстро, за 2—5 мин распластывается равномерно (изотропно) во всех направлениях (рис. 1, *a*). Образовавшись,



Рис. 1. Распластывание и поляризация клеток Vero в нормальных условиях.

а — радиальное распластывание и поляризация клеток; *б* — .полярное распластывание. Время в мин указано *по горизонтали. Масштабный отрезок* — 10 мкм.

такая клетка имеет ровные края, без явлений раффлинга, и ламелла может сохраняться почти неизменной до 30 мин. Затем на отдельных участках ламеллы возникает раффлинг и начинают выдвигаться ламеллиподии, в результате чего клетка постепенно приобретает полигональную форму.

Кинетика распластывания в этих сценариях различается (рис. 7, г). При формировании кольцевой ламеллы происходит взрывообразный рост площади клетки в течение 2—3 мин, тогда как рост площади при выдвижении ламеллиподий происходит более равномерно. В обоих случаях клетки в течение 1 ч приобретают стабильные края и начинают перемещаться по субстрату.

2. Распластывание в отсутствие МТ. В отсутствие МТ блэббинг начинается до прикрепления клеток к субстрату и продолжается в течение длительного времени после их прикрепления. В это время тело клетки часто смещается относительно прикрепившейся части, также клетки могут образовывать и втягивать короткие псевдоподии, которые слабо закрепляются на субстрате.

У многих клеток блэббинг продолжается и после начала формирования плоских ламеллиподий. Процесс распластывания бывает обратимым — клетка, сформировав ламеллу, может затем полностью вернуться к шарообразной форме и после продолжительного периода блэббинга вновь приступить к распластыванию.

После окончания блэббинга клетка имеет по периметру узкую зону ламеллярной цитоплазмы неправильной формы (рис. 2, *a*, 60 мин). На краю ламеллы иногда формируются узкие активные зоны (протрузии), которые выдвигаются вперед, но быстро останавливаются. Далее следуют их частичная ретракция и затухание активности на продолжительное время.

Как правило, увеличение площади ламеллы происходит за счет тангенциального расширения возникающей протрузии (рис. 2, *a*, 120 мин). В результате клетка может образовывать протяженную ламеллу с почти ровным



Рис. 2. Распластывание и поляризация клеток Vero при нарушении системы микротрубочек (МТ).

а — в условиях полной деполимеризации МТ; *б* — в условиях стабилизации МТ. Время в мин указано по горизонтали. Масштабный отрезок — 10 мкм.



Рис. 3. Организация цитоскелета на ранних стадиях распластывания.

а, е, л — во время блэббинга при распластывании в нормальных условиях через 10 мин после посадки; б, ж, м — в радиальной ламелле при распластывании в нормальных условиях через 10 мин после посадки; в, з, н — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 10 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях подавления динамической нестабильности через 40 мин после посадки; е, и, о — во время блэббинга при распластывании в условиях полного разрушения микротрубочек через 40 мин после посадки; е, и, и – и – актин; стрелками обозначена ламелла. Масштабный отрезок — 10 мкм.

краем. Стабильные (вогнутые) края при этом не формируются. На краю ламеллы часто формируются одиночные объемные вздутия, которые перемещаются тагенциально вдоль края клетки, не увеличивая ее площадь (рис. 2, *a*, 300 мин). Если клетки вытягиваются, то между протрузиями формируются вогнутые стабильные края (рис. 2, *a*, 300 мин). Некоторые клетки (15 %) сохраняют круговую ламеллу в течение 16 ч и более. Таким образом, при распластывании фибробластов с деполимеризованными МТ увеличение средней площади идет медленно и равномерно в течение всего периода наблюдений как во время блэббинга, так и после его окончания, а выдвижение края клетки часто сопровождается ретракцией.

3. Распластывание при подавлении динамической нестабильности МТ. При стабилизации МТ распластывание начинается примерно так же, как при полной их деполимеризации (рис. 2, б). Блэббинг начинается еще до прикрепления клеток к субстрату, однако идет не так интенсивно, как при полной деполимеризации МТ. Смещение ошаренной части клетки относительно прикрепившейся части происходит не столь интенсивно, как при деполимеризации МТ. В результате блэббинга, выдвижения коротких псевдоподий и их частичного прикрепления образуется узкий ободок ламеллярной цитоплазмы (рис. 2, б, 40 мин). Чаще всего на краю ламеллярного ободка видна слабая активность (раффлинг). Главное отличие от клеток, распластывающихся в отсутствие MT, состоит в том, что клетки со стабилизированными МТ имеют стабильный контур и не образуют больших псевдоподий и перетяжек.

Если в процессе распластывания образуется несколько языков ламеллы, то между ними могут формироваться стабильные (вогнутые) края (рис. 2, б, 300 мин). Так же как при деполимеризации МТ, центральная часть клетки, содержащая ядро, в течение нескольких часов приподнята над ламеллой, и происходят ее колебательные движения. Перемещения клетки носят локальный характер (рис. 2, б, 600 мин).

4. Поведение цитоскелета. Таким образом, на основании прижизненных исследований были выделены следующие стадии распластывания клеток, которые были в дальнейшем исследованы на фиксированных препаратах: клетки с пузырями (стадия блэббинга); клетки с плоской радиальной ламеллой; клетки с выраженными ламеллиподиями; хорошо распластанные клетки; клетки со стабильными краями.

Цитоскелет на стадии блэббинга. В нормальных клетках на стадии блэббинга актин концентрируется по периметру всех пузырей, хотя яркость их окрашивания не одинакова. МТ иногда заходили в наиболее крупные пузыри (рис. 3, *a*, *e*, *л*).

При деполимеризации МТ через 10 мин после посадки клеток на стекло распределение актина такое же, как в нормальных клетках (не иллюстрировано). В клетках, которые сохраняются на стадии блэббинга дольше, возникают пучки актиновых филаментов, аналогичные стресс-фибриллам более распластанных клеток (рис. 3, ∂ , κ , n).

В клетках со стабилизированными МТ распределение актина на ранней стадии блэббинга также соответствовало нормальным клеткам (рис. 3, *в*, *з*, *н*), но МТ в пузырях не встречались (рис. 3, *з*). В клетках, остающихся на стадии блэббинга через 20—40 мин после посадки суспензии, так же как и при деполимеризации МТ, образуются пучки актина в виде стресс-фибрилл (рис. 3, *г*, *и*, *о*). Цитоскелет при распластывании. Клетки с кольцевой ламеллой, которые обнаруживаются в течение 10—20 мин после посадки, содержали многочисленные радиально расходящиеся МТ, которые оканчивались на расстоянии не более 3—5 мкм от края клетки (рис. 3, δ , \mathcal{M} , \mathcal{M}). Распределение актина в клетках с кольцевой ламеллой было различным: аморфные скопления актина, лежащие примерно в середине ламеллы, или скопления актина на краю ламеллы и тонкие тангенциально расположенные изогнутые пучки в середине ламеллы. Распределение актина в ламеллиподиях такое же, как в радиальной ламелле.

Через 20 мин в анизотропно распластанных клетках возникали относительно широкие пучки актина, расположенные в виде многоугольника по периметру клетки, и небольшое количество тонких фибрилл в центральной части клетки (рис. 4, б). Через 40 мин в центральной части некоторых клеток начинают появляться стресс-фибриллы. Одновременно происходило разрушение периферических пучков актина (рис. 4, в). Через 60 мин большинство клеток имело стресс-фибриллы в центральной части. Тангенциально расположенные пучки в глубине клеток исчезали, в зоне стабильных краев оставались пучки, идущие по периметру клетки. Они часто имели вогнутую форму. Через 120 мин и более после посадки на субстрат в клетках присутствовала развитая система стресс-фибрилл во всех областях, за исключением ламеллы (рис. 4, ∂). Выраженная радиальная система MT сохранялась на всех стадиях распластывания (данные не привелены).

Актиновый цитоскелет при деполимеризации МТ. Немногочисленные клетки, которые начали распластывание уже через 10 мин после посадки, имели полигональную систему пучков по своему периметру. Эти пучки в отличие от возникающих позднее стресс-фибрилл не имели четкого контура. Через 20 мин полигональных клеток становилось больше, актиновые пучки по периферии клеток сохранялись, появлялись хаотично организованные тонкие фибриллы актина в центральной части клетки (рис. 4, м). Через 40-60 мин пучки актина по периферии распластанных клеток также сохранялись, а пучки в центральной области становятся хорошо выраженными. Через 60 мин после посадки появлялись клетки с пучками актина, соединяющими противоположные края клетки (рис. 4, о). Через 120 мин число таких клеток увеличивалось. Через 60 мин и более после посадки некоторые клетки имели одиночные ламеллы, свободные от стресс-фибрилл (рис 4, *n*).

Цитоскелет при стабилизации МТ. В клетках со стабилизированными МТ распределение актина в процессе распластывания в целом соответствует тому, которое наблюдалось при деполимеризации МТ (рис. 4, $e-\kappa$). Однако клетки с пучками актина, соединяющими противоположные края клетки, появляются несколько раньше — через 40 мин (рис. 4, 3). Эти пучки становятся более выраженными через 60 мин после посадки. Через 120 мин большинство клеток имеет хорошо развитые стресс-фибриллы (рис. 4, κ). В клетках со стабилизированными или деполимеризованными МТ через 120 мин все внутреннее пространство заполнено сетью стрессфибрилл, и ламеллы, не содержащие стресс-фибрилл, отсутствуют.

5. Популяционный анализ распластывающихся клеток. Поскольку поведение отдельных клеток сильно различается, для сравнения эффектов деполи-



Рис. 4. Организация актинового цитоскелета в норме и при нарушении системы микротрубочек (МТ).

a—∂ — при распластывании в нормальных условиях; *e*—к — при распластывании в условиях стабилизации MT; *л*—п — при полном разрушении MT. В *нижнем левом углу* указано время в мин после посадки клеток на субстрат. *Стрелками* обозначена ламелла. *Масштабный отрезок* — 10 мкм.

меризации и стабилизации МТ мы провели популяционный анализ процесса распластывания. Начальное прикрепление к подложке у клеток Vero занимает от 5 до 30—40 мин. В течение этого времени часть клеток, прикрепившись, уже начинает распластывание, тогда как другие остаются в ошаренном состоянии и могут перемещаться за счет конвекционных токов жидкости вдоль поверхности стекла. В результате число прикрепившихся клеток постепенно возрастает в интервале 10—40 мин и только затем выходит на плато. Эффективность началь-





Точка 0 — момент помещения суспензии клеток на субстрат. График отражает изменение среднего количества клеток, прикрепленных к субстрату, в поле зрения микроскопа (об. 20×). Черные кружки — контроль, белые кружки — клетки, распластывающиеся при стабилизации МТ, черные треугольники — клетки, распластывающиеся при деполимеризации микротрубочек.

ного прикрепления несколько замедляется при деполимеризации МТ и практически не изменяется при их стабилизации (рис. 5). После прикрепления к субстрату почти все клетки переходят в фазу блэббинга, продолжительность которой очень сильно варьирует и составляет 19.4 ± 18.8 мин. Небольшое количество клеток находилось в блэббинге до 2 ч и более. Однако кинетика их распластывания не отличалась от кинетики клеток, начавших распластывание в первые 30 мин после посадки (данные не приведены).

Площадь проекции клетки на субстрат в процессе блэббинга изменяется незначительно. Таким образом, через 10 мин после посадки клеток Vero около 90 % их имеет шарообразную или близкую к шарообразной форму с небольшими ламеллиподиями, но отдельные клетки (10—15 % от общего числа) уже обладают правильной круглой ламеллой (рис. 6). Через 30 мин более половины клеток, прикрепившихся к субстрату, начинают формировать ламеллу и около 20 % распластаны до степени, когда в них на фазовом контрасте отчетливо видно ядро. Через 60 мин после посадки количество клеток, не начавших распластывание, снижается до 11 %, а количество распластавшихся клеток с видимым ядром увеличивается до 45 % (рис. 6).

Так как окончание блэббинга и начало распластывания происходят не одновременно у разных клеток, то для анализа кинетики распластывания за начало отсчета для каждой клетки принимали последний кадр (съемка с интервалом 1 мин) перед возникновением у нее первой заметной ламеллы. Оказалось, что начальная скорость роста площади довольно велика — за 10 мин средняя площадь, занимаемая клетками на субстрате, увеличивается в 3 раза, а затем постепенно замедляется (рис. 7, *a*). Через 60 мин скорость распластывания значительно замедляется, однако средняя площадь клеток продолжает медленно



Рис. 6. Диаграмма распределения клеток по степени распластанности во времени.

Группы: А — через 10 мин, *Б* — через 30 мин, *B* — через 60 мин после посадки. *I* — клетки, распластывающиеся в нормальных условиях, 2 — в условиях подавления динамической нестабильности микротрубочек (МТ), *3* — в условиях полного разрушения МТ. *Наклонная штриховка* — ошаренные, нераспластанные клетки, *вертикальная штриховка* — клетки, обладающие радиальной ламеллой, *белая* — клетки с ламеллиподиями, *черная часть столбика* — хорошо распластанные клетки.



Рис. 7. Изменение площади клеток культуры Vero в процессе распластывания на стекле.

а — изменение средней площади клеток Vero в первые часы от начала распластывания: черные кружки — клетки, распластывающиеся в нормальных условиях, белые кружки — клетки, распластывающиеся в условиях подавления динамической нестабильности микротрубочек (МТ), черные треугольники — клетки, распластывающиеся в условиях полного разрушения МТ, сплошная линия соответствует площади S = S₀[1 + log(t)]; б — изменение средней площади клеток Vero в течение 1 сут; в — примеры быстро (сплошные линии) и медленно (точки) распластывающихся клеток; г — увеличение площади клетки при радиальном (черная кривая) и полярном (белая кривая) распластывании.

увеличиваться (рис. 7, δ). Кинетика роста площади, занимаемой отдельными клетками, имеет универсальный характер, но уже на ранних этапах возникают значительные различия в скорости распластывания отдельных клеток, и различия между быстро и медленно распластывающимися клетками сохраняются в течение нескольких часов (рис. 7, δ).

В отсутствие МТ через 10 мин после посадки подавляющее большинство клеток имеют форму слегка неправильного шара, но ~7 % клеток имеют форму, резко отличную от шарообразной, т. е. с большими пузырями или прикрепившимися участками. Через 30 мин количество клеток неправильной формы возрастает до 22 %, и появляются первые клетки с ламеллой (рис. 6). Таким образом, продолжительность блэббинга сильно возрастает по сравнению с контролем и составляет 171 ± 108 мин. В период блэббинга клетки увеличивают свою площадь примерно в 2 раза, с 282 \pm 80 до 585 \pm 194 мкм. Через 60 мин после посадки количество клеток, начавших процесс распластывания, достигает 48 % (рис. 6). Тело у большинства клеток приподнято над субстратом, а ядро плохо различимо на фазовом контрасте. В течение нескольких часов после посадки центральная часть клетки с ядром остается нераспластанной и совершает колебательные движения.

Таким образом, лишенные МТ фибробласты за 2 ч достигают приблизительно той же площади, которой нормальные клетки достигают за 10 мин. В дальнейшем они продолжают распластываться практически с постоянной скоростью в течение многих часов и через 1 сут достигают площади нормальных клеток (рис. 7, δ). В течение всего этого времени клетки сохраняют способность выпускать объемные псевдоподии, которые слабо закрепляются на субстрате и затем втягиваются обратно. Некоторые клетки могут удлиняться и даже образовывать перетяжки, разделяясь почти надвое, а затем вновь возвращаться к компактной форме. Тем не менее даже хорошо распластавшиеся клетки не переходят к процессивному движению.

При стабилизации МТ через 10 мин после посадки подавляющее большинство клеток имеют форму шара, только 7.5 % имеют заметные ламеллиподии или очень узкий ободок ламеллярной цитоплазмы. Встречаются единичные клетки с радиальной ламеллой. Продолжительность периода блэббинга и образования коротких псевдоподий составляет 105 ± 87 мин. При подавлении динамической нестабильности МТ процесс блэббинга так же плохо отделим от начала распластывания, и при образовавшемся ободке цитоплазмы на поверхности клетки все еще можно наблюдать образование пузырей. В результате блэббинга, выдвижения коротких псевдоподий и их частичного прикрепления площадь клеток увеличивается в 1.5 раза (с 238 ± 48 до 379 ± 175 мкм²) и образуется узкий ободок ламеллярной цитоплазмы. Через 30 мин после посадки количество клеток, начавших распластывание, возрастает до 25 %, но клетки с выраженной ламеллой (всегда асимметричной) появляются только через 60 мин (рис. 6).

Увеличение средней площади клеток со стабилизированными МТ происходит медленно и равномерно (рис. 7, δ). Через 1 сут после начала распластывания клеток со стабилизированными МТ их площадь оказалась меньше, чем у нормальных клеток и у клеток с деполимеризованными МТ.

Обсуждение

Распластывание фибробластов Vero проходит через те же стадии, что и других фибробластоподобных клеток (Bereiter-Hahn et al., 1990; Norman et al., 2011; Lafarga et al., 2012). Площадь, занимаемая клетками Vero через 1—2 ч после начала распластывания (около 1500 мкм²), соответствует нормальным фибробластам (Ровенский, Васильев, 2004; Kharitonova, Vasiliev, 2004; Шутова, Александрова, 2010). Через 1—2 ч после посадки клетки Vero образуют стабильные края и переходят к активной миграции, тогда как нормальные фибробласты продолжают распластываться и поляризуются значительно позднее — через 4—8 ч (Ровенский, Васильев, 2004; Kharitonova, Vasiliev, 2004; Maritonova, Vasiliev, 2004; Шутова, Александрова, 2010).

Таким образом, у клеток Vero фаза, соответствующая радиальному распластыванию, оказывается сравнительно короткой. Этим объясняется тот факт, что все клетки Vero ни в один момент времени не находятся на одной и той же стадии распластывания. Следует подчеркнуть: хотя многие авторы отмечают, что на стадии радиального распластывания могут одновременно находиться 100 % клеток (Ivanova et al., 1976; Блиох, Смолянинов, 1977; Ровенский, Васильев, 2004; Kharitonova, Vasiliev, 2004; Шутова, Александрова, 2010), начало и конец этой стадии у нормальных фибробластов ими не описываются.

Стадии распластывания. Распластывание начинается с образования пятна контакта. При этом площадь, занимаемая клетками на субстрате, примерно соответствует диаметру ошаренной клетки (Bereiter-Hahn et al., 1990; Cuvelier et al., 2007). После начального прикрепления клетки Vero переходят к блэббингу, который является свойством различных медленно распластывающихся клеток — фибробластов (Laster, Mackenzie, 1996), эндотелиальных клеток (Norman et al., 2010a, 2010b, 2011), клеток меланомы (Cunningham, 1995; Dai, Sheetz, 1999; Charras et al., 2005, 2006). В клетках Vero блэббинг начинается сразу после соприкосновения с субстратом и может продолжаться от нескольких минут до 1 ч. В процессе блэббинга не возникают плоские ламеллиподии, площадь клеток не изменяется. Фаза блэббинга заканчивается асинхронно: у каждой клетки она завершается внезапно и сменяется появлением ламеллиподий либо образованием кольцевой ламеллы. Быстрый переход от блэббинга к распластыванию напоминает процессы, индуцируемые гормонами (Bailly et al., 1998, Dubin-Thaler et al., 2004), но только индукция оказывается асинхронной. Нарушения системы МТ значительно удлиняют фазу блэббинга — как ее среднюю продолжительность, так и разброс в продолжительности у отдельных клеток.

Взяв для каждой клетки за начальную точку момент окончания блэббинга, мы смогли точно выделить начало фазы радиального распластывания, которое у разных клеток на одном и том же стекле может различаться на несколько десятков минут. Оказалось, что с момента окончания блэббинга площадь каждой клетки в течение первых 20 мин быстро растет, а затем ее прирост замедляется. Средняя скорость увеличения площади для популяции клеток Vero на отрезке времени 2 ч не может быть принята как постоянная, а намного точнее аппроксимируется логарифмической кривой $S = S_0[1+\log(t)]$ (рис. 7). Аналогичное нелинейное увеличение площади на ранних этапах распластывания было описано, но на более коротких отрезках времени для клеток XTH-2 и Swiss-3T3 (Bereiter-Hahn et al., 1990; Dubin-Thaler et al., 2004; Senju, Miyata, 2009).

Начальное распластывание фибробластов может происходить двумя способами: через растяжение с помощью отдельных независимых ламеллиподий (анизотропное распластывание) или через образование кольцевой ламеллы (изотропное распластывание) (Dubin-Thaler et al., 2004). В большинстве случаев, как подтверждают наши наблюдения, растяжение происходит анизотропно. Относительная частота изотропного распластывания для клеток Vero не превышает 15 %, что согласуется с опубликованными данными (Dubin-Thaler et al., 2004).

Быстрое формирование кольцевой ламеллы было описано у кератоцитов (Bereiter-Hahn, 2005), нейтрофилов и моноцитов (Gudima et al., 1988), т. е. клеток, не формирующих стресс-фибрилл. Иногда оно встречается у мигрирующих нейронов (Dotti et al., 1988; Dehmelt et al., 2003) и эмбриональных фибробластов мыши (Dubin-Thaler et al., 2004).

Образование кольцевой ламеллы у фибробластов может происходить при ингибировании миозина II (Wakatsuki et al., 2003), однако авторы не приводят данных кинетических наблюдений. Также быстрое радиальное распластывание стимулируется отсутствием сыворотки в культуральной среде (Dubin-Thaler et al., 2004). Таким образом, мы полагаем, что быстрое радиальное распластывание происходит по другому механизму, нежели растягивание клетки с помощью псевдоподий.

Быстрое изотропное распластывание, которое сменяется затем более медленным анизотропным растяжением, обусловлено временной релаксацией α-актинина (Dubin-Thaler et al., 2004), в результате чего формирование стресс-фибрилл запаздывает по отношению к выдвижению края клетки. Наши данные показывают, что для изотропного распластывания фибробластам необходимо, чтобы МТ быстро врастали в формирующуюся ламеллу.

Изменения распластывания при нарушении системы МТ. Деполимеризация МТ не оказывает значительного влияния на степень конечного распластывания фибробластов (Харитонова и др., 2002), и это подтверждается данными настоящей работы. Однако наши данные показывают, что в начальный период времени (до 5—6 ч) процесс распластывания при нарушении системы МТ сильно замедляется. Деполимеризация МТ в несколько раз удлиняет фазу блэббинга, который продолжается даже после начала формирования актиновых пучков и перекрывается с фазой образования ламеллиподий. Кроме того, деполимеризация МТ в клетках Vero приводит к замещению плоских ламеллиподий, закрепляющихся на субстрате, на объемные выросты, которые слабо закрепляются и быстро втягиваются.

В результате по своему повелению клетки, распластывающиеся в отсутствие МТ, напоминают трансформированные фибробласты: они имеют сложный контур, формируют вытянутые отростки и не образуют кольцевой ламеллы (Domnina et al., 1972). Стабилизация МТ в клетках Vero также увеличивает продолжительность блэббинга и замедляет процесс начального распластывания даже в большей степени, чем деполимеризация МТ. Клетки со стабильными МТ все время после окончания блэббинга остаются малоподвижными, они выбрасывают короткие ламеллиподии и не способны образовывать объемные выросты или большие ламеллы. Однако процесс распластывания клеток при стабилизации МТ продолжается много часов, и клетки не образуют стабильных краев и не переходят к движению. Таким образом, именно динамичные МТ необходимы для нормального процесса распластывания фибробластов в отличие от других типов клеток.

Актиновый цитоскелет при распластыван и и. Поведение актинового цитоскелета в клетках Vero в целом соответствует тому, что было описано для других фибробластов. Однако стадия «радиального распластывания» с кольцевыми пучками, возникающими спустя 30-120 мин после посадки клеток на стекло (Bereiter-Hahn et al., 1990; Cunningham, 1995; Laster, Mackenzie, 1996; Kharitonova, Vasiliev, 2004; Шутова, Александрова, 2010; Norman et al., 2010a, 2010b, 2011), в фибробластах Vero не выражена. Вместо концентрических кольцевых пучков в глубине цитоплазмы (Kharitonova, Vasiliev, 2004; Шутова, Александрова, 2010) в клетках Vero в течение 10-20 мин возникали широкие пучки, образующие полигональную структуру только по периметру клетки, и затем, еще примерно через 20 мин, исчезали, замещаясь хаотично расположенными стресс-фибриллами. При этом многие клетки имели форму, близкую к дисковидной.

Нарушение системы МТ изменяет поведение актинового цитоскелета, но не так значительно, как предполагали ранее (Danowski, 1989). Пучки актиновых филаментов начинают формироваться при стабилизации МТ, так же как и в отсутствие МТ, спустя 10—30 мин после прикрепления клеток и вне зависимости от степени их распластанности. Основное различие по сравнению с нормальными клетками состоит в том, что периферический пучок (пучки) актина, идущий вдоль края в уже распластавшихся клетках, сохраняется в течение 1—4 ч, тогда как у нормальных клеток он исчезает спустя 20—40 мин после возникновения.

Таким образом, формирование актиновых пучков имеет четкие временные рамки. В нормальных клетках формирование актиновых пучков коррелирует с поведением сети МТ. Когда клетки малоподвижны, пучки располагаются вдоль всей их вентральной поверхности. В подвижных участках цитоплазмы формирование пучков отстает от процесса выдвижения ламеллы. При деполимеризации МТ пучки актина возникают в клетке через 10—20 мин после прикрепления к субстрату вне зависимости от того, находится она в распластанном состоянии или нет. С одной стороны, пучки могут возникать на стадии, когда блэббинг еще не закончен, с другой стороны, быстро выдвигающиеся ламеллы даже в распластанных клетках (в отсутствие МТ) свободны от пучков актина.

Таким образом, в процессе распластывания клеток можно выделить несколько фаз, когда поведение клетки

существенно изменяется в ответ на нарушение системы МТ. Первая фаза — образование пятна контакта и блэббинг, который прололжается от нескольких минут ло нескольких десятков минут (Bereiter-Hahn et al., 1990; Laster, Mackenzie, 1996; Norman et al., 2011). При нарушении системы МТ блэббинг начинается уже в суспензии, т. е. до контакта с субстратом. Вторая фаза — растяжение клетки по поверхности (первичное распластывание). Оно может проходить в двух вариантах: относительно медленное распластывание с помощью ламеллиподий или быстрое формирование радиальной ламеллы. Изотропное распластывание занимает от нескольких десятков секунд (лейкоциты) (Gudima et al., 1988; настоящая работа) до 2—3 мин (Dubin-Thaler et al., 2004; настоящая работы). Его большая скорость обусловлена тем, что на этой фазе сократительная система, в которой участвуют α-актинин и миозин, еще не успевает полностью сформироваться. При нарушении системы МТ изотропное распластывание исчезает, а анизотропное распластывание резко замедляется. Третья фаза — медленное (вторичное) распластывание клеток, которое прекращается, когда клетки начинают перемещаться по субстрату. Оно происходит только у клеток с прочным прикреплением к субстрату и реализуется как баланс сил между натяжением актомиозинового цитоскелета и прикреплением новых ламеллиподий. У нормальных фибробластов (Ровенский, Васильев, 2004; Kharitonova, Vasiliev, 2004; Шутова, Александрова, 2010) вторичное распластывание продолжается в течение многих часов, и лишь затем наступает фаза движения. У клеток Vero вторичное распластывание не столь эффективно и совпадает по времени с образованием стабильных краев. При нарушении системы МТ вторичное распластывание не отличается от первоначального и в сумме они продолжаются много часов.

Таким образом, динамичные МТ существенно ускоряют ранние стадии распластывания фибробластов.

Список литературы

Блиох Ж. Л., Смолянинов В. В. 1977. Кинематика распластывания фибробластов. І. Анализ популяции. Биофизика 22 : 471—478.

Добринских Е. А., Воробьев И. А. 2006. Микротрубочки необходимы для втягивания ламеллы в культивируемых клетках Vero. Цитология. 48 (11): 906—917.

Ровенский Ю. А., Васильев Ю. М. 2004. Морфогенетические реакции клеток и их нарушения при опухолевой трансформации. В кн.: Канцерогенез. М.: Медицина. 376—414.

Харитонова М. А., Левина Э. М., Ровенский Ю. А. 2002. Цитоскелетный контроль регуляции длины клеток. Онтогенез. 33 : 50—59.

Шутова М. С., Александрова А. Ю. 2010. Сравнительное исследование распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Роль полимеризации микрофиламентов и актин-миозинового сокращения. Цитология. 52 (1): 41—51.

Bailly M., Condeelis J. S., Segall J. E. 1998. Chemoattractant-induced lamellipod extension. Microsc. Res. Tech. 43 : 433— 443.

Bereiter-Hahn J. 2005. Mechanics of crawling cells. Med. Eng. Phys. 27 : 743—753.

Bereiter-Hahn J., Lück M., Miebach T., Stelzer H. K., Vöth M. 1990. Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements. J. Cell Sci. 96 : 171–188.

Bershadsky A. D., Vaisberg E. A., Vasiliev J. M. 1991. Pseudopodial activity at the active edge of migrating fibroblast is decreased after drug-induced microtubule depolymerization. Cell Motil. Cytoskeleton. 19 : 152–158. *Berzat A., Hall A. 2010.* Cellular responses to extracellular guidance cues. EMBO J. 29 : 2734—2745.

Charras G. T., Hu C. K., Coughlin M., Mitchison T. J. 2006. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. J. Cell Biol. 175 : 477–490.

Charras G. T., Yarrow J. C., Horton M. A., Mahadevan L., Mitchison T. J. 2005. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. Nature. 435 : 365—369.

Cunningham C. C. 1995. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. J. Cell Biol. 129 : 1589–1599.

Cuvelier D., Théry M., Chu Y. S., Dufour S., Thiéry J. P., Bornens M., Nassoy P., Mahadevan L. 2007. The universal dynamics of cell spreading. Curr. Biol. 17: 694—699.

Dai J., Sheetz M. P. 1999. Membrane tether formation from blebbing cells. Biophys J. 77 : 3363—3370.

Danowski B. A. 1989. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. J. Cell Sci. 93 : 255–266.

Dehmelt L., Smart F. M., Ozer R. S., Halpain S. 2003. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. J. Neurosci. 23 : 9479–9490.

Domnina L. V., Ivanova O. Y., Margolis L. B., Olshevskaja L. V., Rovensky Y. A., Vasiliev J. M., Gelfand I. M. 1972. Defective formation of the lamellar cytoplasm by neoplastic fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69 : 248–252.

Domnina L. V., Rovensky J. A., Vasiliev J. M., Gelfand I. M. 1985. Effect of microtubule-destroying drugs on the spreading and shape of cultured epithelial cells. J. Cell Sci. 74 : 267–282.

Dotti C. G., Sullivan C. A., Banker G. A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. J. Neurosci. 8 : 1454—1468.

Dubin-Thaler B. J., Giannone G., Döbereiner H. G., Sheetz M. P. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. Biophys. J. 86 : 1794—1806.

Dubin-Thaler B. J., Hofman J. M., Cai Y., Xenias H., Spielman I., Shneidman A. V., David L. A., Dobereiner H. G., Wiggins C. H., Sheetz M. P. 2008. Quantification of cell edge velocities and traction forces reveals distinct motility modules during cell spreading. PLoS One. 3 : e3735.

Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yama-ga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., Kaibuchi K. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. Cell. 109 : 873–885.

Grigoriev I. S., Chernobelskaya A. A., Vorobjev I. A. 1999. Nocodazole, vinblastine and taxol at low concentrations affect fibroblast locomotion and saltatory movements of organelles. Membr. Cell Biol. 13 : 23–48.

Gudima G. O., Vorobjev I. A., Chentsov Yu. S. 1988. Centriolar location during blood cell spreading and motion *in vitro*: an ultrastructural analysis. J. Cell Sci. 89 : 225–241.

Insall R. H., Machesky L. M. 2009. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. Develop. Cell. 17 : 310–322.

Ivanova O. Y., Margolis L. B., Vasiliev J. M. 1976. Effect of colcemid on the spreading of fibroblasts in culture. Exp. Cell Res. 101 : 207–219.

Kaverina I., Krylyshkina O., Small J. V. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. J. Cell Biol. 146 : 1033–1044.

Kay R. R., Langridge P., Traynor D., Hoeller O. 2008. Changing directions in the study of chemotaxis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 : 455–463.

Kharitonova M. A., Vasiliev J. M. 2004. Length control is determined by the pattern of cytoskeleton. J. Cell Sci. 117 : 1955–1960.

Kolodny G. M. 1972. Effect of various inhibitors of readhesion of trypsinized cells in culture. Exp. Cell Res. 70 : 196–202.

Krendel M., Zenke F. T., Bokoch G. M. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. Nat. Cell Biol. 4 : 294–301.

Lafarga V., Aymerich I., Tapia O., Mayor F., Jr., Penela P. 2012. A novel GRK2/HDAC6 interaction modulates cell spreading and motility. EMBO J. 31 : 856–869.

Laster S. M., Mackenzie J. M. 1996. Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor necrosis factor-induced apoptosis. Microsc. Res. Tech. 34 : 272–280.

Levina E. M., Kharitonova M. A., Rovensky Y. A., Vasiliev J. M. 2001. Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate. J. Cell Sci. 114 : 4335–4341.

Liao G., Nagasaki T., Gundersen G. G. 1995. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. J. Cell Sci. 108 : 3473—3483.

Nalbant P., Chang Y. C., Birkenfeld J., Chang Z. F., Bokoch G. M. 2009. Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. Mol. Biol. Cell. 20 : 4070–4082.

Norman L., Brugues J., Sengupta K., Sens P., Aranda-Espinoza H. 2010a. Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells. Biophys. J. 99: 1726–1733.

Norman L., Oetama R., Dembo M., Byfield F., Hammer D., Levitan I., Aranda-Espinoza H. 2010b. Modification of cellular cholesterol content affects traction force, adhesion and cell spreading. Cell Mol. Bioeng. 3 : 151–162.

Norman L., Sengupta K., Aranda-Espinoza H. 2011. Blebbing dynamics during endothelial cell spreading. Eur. J. Cell Biol. 90 : 37–48.

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.

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.

Reed N. A., Cai D., Blasius T. L., Jih G. T., Meyhofer E., Gaertig J., Verhey K. J. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. Curr. Biol. 16 : 2166–2172.

Rhee S., Jiang H., Ho C. H., Grinnell F. 2007. Microtubule function in fibroblast spreading is modulated according to the tension state of cell-matrix interactions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104 (13) : 5425—5430.

Rodriguez O. C., Schaefer A. W., Mandato C. A., Forscher P., Bement W. M., Waterman-Storer C. M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. Nat. Cell Biol. 5: 599–609.

Senju Y., Miyata H. 2009. The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. J. Biochem. 145 :137–150.

Small J. V., Geiger B., Kaverina I., Bershadsky A. 2002a. How do microtubules guide migrating cells? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3 : 957–964.

Small J. V., Stradal T., Vignal E., Rottner K. 2002b. The lamellipodium: where motility begins. Trends Cell Biol. 12: 112—120.

Tran A. D., Marmo T. P., Salam A. A., Che S., Finkelstein E., Kabarriti R., Xenias H. S., Mazitschek R., Hubbert C., Kawaguchi Y., Sheetz M. P., Yao T. P., Bulinski J. C. 2007. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. J. Cell Sci. 120 : 1469—1479.

Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Domnina L. V., Ivanova O. Y., Komm S. G., Olshevskaja L. V. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. J. Embryol. Exp. Morphol. 24 : 625—640.

Wagner S., Flood T. A., Reilly P., Hume K., Sabourin L. A. 2002. Association of the Ste20-like kinase (SLK) with the microtubule. Role in Rac1-mediated regulation of actin dynamics during cell adhesion and spreading. J. Biol. Chem. 277: 37 685—37 692.

Wakatsuki T., Wysolmerski R.B., Elson E.L. 2003. Mechanics of cell spreading: role of myosin II. J. Cell Sci. 116 : 1617–1625.

Watanabe T., Noritake J., Kaibuchi K. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. Trends Cell Biol. Feb. 15 : 76–83. Waterman-Storer C. M., Worthylake R. A., Liu B. P., Burrid-

ge K., Salmon E. D. 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. Nat. 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.

Поступила 11 VI 2012

MICROTUBULES SUPPRESS BLEBBING AND STIMULATE LAMELLAE EXTENSION IN SPREADING FIBROBLASTS

A. V. Tvorogova, I. A. Vorobjev

A. N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology and Biological Faculty, M. V. Lomonosov Moscow State University; e-mail: annatvor@mail.ru

We compared spreading of Vero fibroblasts when microtubules were depolymerized or stabilized. After initial attachment cells start blebbing that continues for different time and abruptly transfers into spreading. After spreading initiation, most cells spread in an anisotropic manner through stochastic formation of lamellipodia. A second mode was rapid, isotropic spreading via formation of circular lamellum that occurs in 15% of cells. The rate of spreading was maximal at the beginning and decreased during the first hour according to logarithmic law. After 60 min many cells formed stable efges and started migrating on the substrate. However, cell area slowly continued to increase. Actin bundles are formed 20 min after cell attachment and they first run along cell boundary. This system disassembles within 20-40 min and is substituted with stress fibers crossing the cell. In the isotropically spread cells no actin bunbles are seen. Microtubules in the spreading cells enter into large blebs and all nascent lamella and later form radial array. When MTs has been depolymerized or stabilized blebbing started before cells attached to the substrate and continue much longer than in control cells. In both cases the initial rate of spreading decrease several fold, and remains constant for many hours. After 24 h the mean area occupied by cells with altered MT system was the same as in control. Alteration of MT system had moderate effect on actin system — formation of actin cables started at the same time as in control (within 20 min upon cell attachment), however, they grew even in cells undergoing prolonged blebbing. Actin cables running along cell margin were similar to tat in control cells, but they did not disappear up to 1 h. When stabilized, microtubules form chaotic array: they do not enter blebs and in spread cells run parallel to the cell margin at a distance of $3-5 \mu m$. We conclude that dynamic microtubules speed up completion of blebbing and promote early stages of fibroblasts spreading.

Key words: fibroblasts, actin, microtubules, spreading, microscopy.