



H

4846121

Ломакина Мария Евгеньевна

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И ДИНАМИКИ КЛЕТОЧНОГО  
КРАЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ХАРАКТЕР КЛЕТОЧНОЙ МИГРАЦИИ ПРИ  
ТРАНСФОРМАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ

14.01.12 – Онкология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА  
2011

12 МАЙ 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Российском онкологическом научном центре имени Н.Н. Блохина РАМН (директор – академик РАН и РАМН, профессор М.И. Давыдов).

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Александрова Антонина Юрьевна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор

Смирнова Елена Александровна

Доктор медицинских наук

Шгиль Александр Альбертович

Ведущая организация:

Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится « 17 » июня 2011 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета (Д.001.017.02) РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Автореферат разослан « 22 » апреля 2011 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор медицинских наук, профессор

Ю.А. Барсуков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Способность клеток опухоли к инвазии и метастазированию является одной из основных причин смертности людей, страдающих от онкологических заболеваний. Приобретение клеткой такого рода способностей является следствием того, что в процессе трансформации и опухолевой прогрессии нарушаются не только механизмы нормальной пролиферации клеток, но и их локомоторная активность. Изучение механизмов подвижности клетки и их нарушений в результате трансформации является одной из важнейших задач современной клеточной биологии.

На клеточном уровне основой возникновения этих свойств являются генетические изменения, приводящие к нарушению регуляции адгезии и подвижности клеток (Yamazaki et al., 2005). Установлено, что в этих процессах определяющую роль играют перестройки цитоскелетных структур.

Трансформированные клетки существенно отличаются от нормальных по своей морфологии и организации цитоскелета (Bershadsky and Vasiliev, 1988; Vasiliev and Gelfand, 1981; Mani et al, 2008; Polyak and Weinberg, 2009). Изменения цитоскелета имеют большое значение для развития фенотипа трансформированных клеток с инвазивным поведением. В частности, для многих типов трансформированных клеток описана редукция стресс-фибрилл, сопряженная с нарушением созревания контактных структур (Qui, 1997; Ровенский и Васильев, 2004). Такая организация цитоскелета часто коррелирует с повышением локомоторной активности и/или метастатического потенциала опухолевых клеток (Pockona et al., 1994, Sachai and Marshall, 2003).

Однако вопрос о том, каким образом описанные цитоскелетные перестройки приводят к изменению характера клеточного движения, и какие именно изменения являются определяющими в приобретении клеткой инвазивного фенотипа остается неизвестным.

Хорошей моделью для исследования механизмов клеточного движения и анализа реорганизаций цитоскелета, определяющих форму клеток и характер миграции в норме и при неопластической трансформации является исследование миграции фибробластов. Фибробласты - один из основных морфологических типов клеток, характеризующийся высокой подвижностью.

Для фибробластов характерен мезенхимальный способ передвижения. Это движение одиночных клеток, при котором инициальным шагом является формирование так называемого ведущего края клетки, где происходит выбрасывание отростков и образование контактов с внеклеточным матриксом. В недавних исследованиях было показано, что ведущий край клетки во многом определяет характер и направленность ее движения. Так повышение уровня активности малой ГТФазы Ras приводит к появлению дополнительных участков псевдоподиальной активности у движущихся клеток и усилению их ненаправленной миграции (Pankov et al., 2005). Строение и характер формирования ведущего края клетки при трансформации изучены слабо. Исследование изменений, происходящих в строении цитоскелета и динамике ведущего края при

трансформации бесспорно позволит лучше понять механизмы инвазии и метастазирования.

### **Цели и задачи исследования**

Целью настоящей работы является исследование изменений в распределении и динамике псевдоподиальной активности, возникающих у движущихся фибробластов в результате неопластической трансформации; выявление особенностей ультраструктуры актинового цитоскелета трансформированных клеток, и анализ связи этих изменений с приобретением клеткой инвазивного фенотипа.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Описать характер распределения псевдоподиальной активности и динамику активного края у нормальных и трансформированных фибробластов.

2. Проанализировать изменения актинового цитоскелета и адгезионных структур у фибробластов с разной степенью трансформации. Особое внимание обратить на различия в ультраструктуре актинового цитоскелета активного края.

3. Оценить миграционную способность и описать характер движения трансформированных клеток на двухмерном и трехмерном субстрате в сравнении с клетками контрольных линий.

4. Выявить какие из изменений цитоскелета, возникающие в результате трансформации, играют ключевую роль в приобретении клеткой способности к инвазии.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Необходимость исследований молекулярных и клеточных механизмов трансформации и приобретения опухолевыми клетками инвазивных способностей не подлежит сомнению.

Несмотря на огромный интерес к этой проблеме и достижения последних лет многие вопросы остаются неясными. В то время как довольно подробно исследованы перестройки цитоскелета на ведущем крае, лежащие в основе движения нормальных клеток, мало внимания до сих пор было уделено исследованию активного края трансформированных клеток. Изменения в строении цитоскелета, распределении и динамике клеточного края и регуляторные пути при развитии инвазивного фенотипа мало изучены. Отсутствуют работы, посвященные сравнительному анализу характера и динамики псевдоподиальной активности и локомоторного поведения трансформированных и нетрансформированных фибробластов.

Мы впервые в мире поставили перед собой задачу подробно оценить изменения динамики и распределения псевдоподиальной активности при трансформации и сопоставить их с изменениями, происходящими в ультраструктуре актинового цитоскелета ведущего края опухолевых клеток (которые также не были описаны ранее).

Поставленные вопросы очень важны и дают возможность более точно оценить вклад отдельных морфологических и динамических изменений, вызванных трансформацией, в формирование инвазивного клеточного фенотипа и выявить

какие особенности цитоскелета трансформированных клеток лежат в основе этих изменений.

Реализация поставленных задач стала возможной благодаря использованию нами широкого спектра уникальных современных методов исследования, а именно: иммунофлуоресцентной, конфокальной и электронной микроскопии, прижизненного наблюдения за клетками при помощи дифференциально-интерференционного контраста (DIC), а также использования различных программ для статистической обработки полученных результатов.

Одной из поставленных задач, очень важных для понимания процессов инвазии, стало изучение локомоторного поведения трансформированных клеток. Вопросам регуляции движения опухолевых клеток уделяется много внимания, но в настоящее время большинство исследований проводится на молекулярном уровне с целой популяцией клеток. Мы впервые в мире поставили перед собой задачу комплексно оценить изменения цитоскелета, динамики и распределения активного края и характера миграции индивидуальных трансформированных клеток, т. е. определить взаимосвязь между всеми наблюдаемыми явлениями.

Еще одной особенностью нашей работы, является то, что мы использовали для исследования различные системы трансформации и изучали их параллельно, что дало возможность анализировать изменения, происходящие в клетках на разных стадиях неопластической трансформации. Во-первых, мы проводили свои исследования на модели моноонкогенной Ras-трансформации, которая позволяет оценить изменения, происходящие с клетками при мутации лишь одного конкретного гена, что очень удобно для понимания молекулярных механизмов этих изменений. Во-вторых, мы использовали модель SV40-трансформации, как пример вирусной трансформации, вызывающей более сложные генетические, а, как следствие, и морфологические изменения у клеток. И, наконец, в качестве третьей модели трансформации нами была использована опухолевая линия клеток фибросаркомы HT-1080, которая замечательна в первую очередь тем, что проявляет способность к инвазии и является прекрасным примером «полноценно-измененных» опухолевых клеток. Параллельное исследование этих трех систем позволило нам сравнить все изменения, происходящие с клетками, при каждом из типов морфологической трансформации и выявить общие закономерности, характерные для неопластической трансформации в целом, а также проанализировать различия и оценить вклад каждого из выявленных признаков в формирование у клеток способности к инвазии.

### **Апробация работы**

Диссертация апробирована на совместной научной конференции лабораторий механизмов канцерогенеза, механизмов прогрессии эпителиальных опухолей, цитогенетики, регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Материалы диссертационной работы были представлены на XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2006); на Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2006); на конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения» (Санкт-Петербург, 2008); на 13-й международной пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009); на школе-семинаре по проблемам организации внутриклеточного

транспорта, цитоскелета и путей передачи сигнала (Санкт-Петербург, 2009); на международной школе-конференции “Cell Shape Changes: Cell Motility and Morphogenesis” (France, Paris, 2009); на международной конференции “Cellular Morphogenesis: Actin Cytoskeleton and Membrane Remodeling” (France, Gif-sur-Yvette); и на международном симпозиуме “Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies” (Пушино, 2010).

#### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

#### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на 145 страницах, содержит 42 рисунка и 25 таблиц и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы», который включает 241 цитируемый источник.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **Клеточные культуры**

В работе использовали три клеточные системы:

(1) Система Ras-трансформации включала клетки линий 10(3), являющиеся иммортализованными мышинными фибробластами (Harvey, Levine, 1991), и их трансформированные производные 10(3)RAS, полученные путем трансфекции исходной линии 10(3) плазмидой с геном конститутивно активного белка N-RAS<sup>asp13</sup> (любезно предоставлены П.Б. Копниным). (2) Система SV40-трансформации включала нетрансформированные клетки линий MRC-5 являющиеся эмбриональными легочными фибробластами человека (Jacobs et al., 1970) и их производные - трансформированные клетки MRC-5V1 и MRC-5V2, полученные путем заражения исходной линии MRC-5 вирусом SV40 (Simian Virus 40) (Huschtscha and Holliday, 1983). (3) Третья система включала подкожные фибробласты человека 1036 (любезно предоставленные А.А. Мининым, Институт Белка, РАН) и широко используемую исследователями линию фибросаркомы человека HT-1080 (Rasheed et al., 1974; Deryugina et al, 1997; Strongin et al., 1993).

Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, США) с добавлением 10% FCS (Fetal Calf's Serum, PPA Laboratories, Австрия) и антибиотиков (по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина) при температуре 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO<sub>2</sub>.

#### **Иммуноблоттинг**

Для выявления экспрессии белка Ras применяли метод иммуноблоттинга. Клетки предварительно лизировали при помощи буфера RIPA (RadioImmuno Precipitation Assay Buffer) (100 мкл на чашку Петри диаметром 6 см), содержащего ингибиторы протеаз, и центрифугировали при 10000g (4°C). Концентрацию белка в лизате определяли при помощи системы белкового анализа Bio-Rad Laboratories, США. Затем проводили электрофоретическое разделение белков в 15%-ном полиакриламидном геле с последующим переносом белка на мембрану (Amersham Biosciences, Великобритания).

Для окраски в качестве первых антител использовали моноклональные мышечные антитела rap-ras (Cell Signalling, Великобритания) и моноклональные кроличьи антитела к  $\gamma$ -тубулину GTU-88 (Sigma, США) и вторые антимышечные (Upstate, США) и антикроличьи (Upstate, США) антитела, конъюгированные с пероксидазой.

Проявление производили при помощи растворов Determinit ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Великобритания): Sol A – Lumigen TMA-6 и Sol B - Lumigen TMA-6 (1:1).

### **Флуоресцентное окрашивание и микроскопия**

Для иммунофлуоресцентного окрашивания цитоскелетных структур применяли фиксацию 3,7% раствором PFA на бессывороточной среде DMEM. Для окрашивания F-актина применяли флуоресцентный краситель Alexa Fluor 488 phalloidin (Molecular Probes, США); для окрашивания фокальных контактов в качестве I антител использовали моноклональные антитела: anti-Vinculin hVIN-1 (Sigma, США) и моноклональные антитела: anti-zyxin 164D (Transduction Lab.); для окрашивания миозина II – поликлональные антитела: anti-myosin (non-muscle) BT561 (Biomedical Technologies Inc.); для окрашивания p34 субъединицы Arp2/3 комплекса (Actin-related protein 2/3 complex) – поликлональные антитела anti-p34-Arc/ARPC2 (Upstate, США). В качестве II антител при окраске на белки фокальных контактов использовали антимышечные антитела, меченные родамином (TRITC-anti-mouse, Sigma, США), а при окраске на миозин и p34 использовали антикроличьи антитела, меченные родамином (TRITC-anti-rabbit IgG (H+L), Jackson Immuno Research, Великобритания). Окрашивание ядер производили флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, США).

Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioplan (Zeiss, Германия) с объективами Plan-Neofluar  $\times 100$  и  $\times 40$ . Микрофотосъемку препаратов осуществляли с использованием цифровой камеры Olympus DP70 с программным обеспечением (DP Controller).

### **Прижизненное наблюдение и видеосъемка**

Видеосъемку препаратов осуществляли в камере для прижизненного наблюдения при температуре 34°C на микроскопах Axioplan (Zeiss, Германия) с объективами Plan-Neofluar  $\times 40$  и  $\times 25$  и Nikon Eclipse-Ti объективом Plan-Neofluar  $\times 40$  (NA1.3) с использованием метода дифференциально-интерференционного контраста (DIC) при помощи цифровых камер Hamamatsu (Mode C8484-05G) и ORCA-ER Hamamatsu и с программным обеспечением Wasabi (Hamamatsu, Япония). Для последующей оценки распределения активного края производилась съемка клеток в режиме Time-Lapse общей продолжительностью 2 минуты с интервалом 4 секунды с увеличением объектива  $\times 25$  (в случае MRC-5, 1036) и  $\times 40$  (в случае 10(3), 10(3)RAS, MRC-5V1, MRC-5V2 и HT-1080). Для описания характера псевдоподиальной активности производилась съемка ведущего края клеток в режиме Time-Lapse общей продолжительностью 8-10 минут с интервалом 1 секунда с увеличением объектива  $\times 40$  и дополнительным увеличением  $\times 2$  (в случае SV40-трансформации).

### **Анализ характера псевдоподиальной активности**

Для анализа характера псевдоподиальной активности на активном крае клетки были использованы кимограммы (диаграмма, показывающая смещение отдельной точки вдоль заданной линии в течение заданного времени) (Hinz et al, 1999; Bear et al, 2002), построенные при помощи программы Image J. Для обработки были взяты 8-10-минутные кадровые последовательности видеосъемки клеток (с межкадровым интервалом равным 1 с) для каждой из исследуемых линий. В нашем случае, кимограмма иллюстрирует смещение отдельной точки активного клеточного края, вдоль линии, проведенной перпендикулярно клеточному краю, на протяжении 8-10 минут нашего наблюдения. Это позволило нам определить величину появляющейся на краю протрузии и ретракции, частоту смены протрузии на ретракцию, их скорости, частоту раффлов клеточной мембраны, «паузы» между протрузией и ретракцией.

### **Морфометрический анализ клеточной формы**

Путем анализа контуров отдельно взятых клеток в программе Simple PCI были измерены площадь и периметр клеток, а также проанализировано распределение различных форм краевой активности. Для этого использовали 2-минутные кадровые последовательности. На основании оценки псевдоподиальной активности были выделены активные, слабо-активные, ретрактирующие и стабильные участки края и измерены их количество и протяженность. Мы проанализировали распределение разных форм краевой активности у нормальных и трансформированных клеток и статистически обработали полученные результаты

### **Исследование клеточной миграции**

Мы анализировали миграцию клеток тремя способами.

(1) Анализировали характер и направленность миграции одиночных клеток на двумерном субстрате. Для этого клетки (около 30 клеток для каждой из линий) в редкой культуре на вторые сутки после посадки на размеченные покровные стекла (Bellco Biotechnology, США) фотографировали с интервалом в 2 часа в течение 8 часов. Съемка производилась на инвертированном микроскопе Axiovert 200 (Zeiss, Германия) при помощи камеры Axio Cam MRc (Zeiss, Германия) с увеличением объектива  $\times 10$ . Позицию клетки определяли по положению ядра. При помощи программы Simple PCI измеряли общий путь, а также расстояние от начальной до конечной точки движения— прямолинейное (эффективное) движение (D). Направленность миграции оценивали как отношение D/T.

(2) Анализировали миграцию клеток в экспериментальную рану (Valster et al., 2005). Клетки высаживались на размеченные покровные стекла (Bellco Biotechnology, США) ( $24 \times 24$  мм), дорастивались до монослоя и удаляли часть монослоя с помощью бритвы. Фотографировали три участка раны с каждого стекла (опыта) сразу после нанесения раны и после 24-часовой инкубации. Съемка производилась на инвертированном микроскопе Axiovert 200 (Zeiss, Германия) при помощи камеры AxioCam MRc (Zeiss, Германия) с увеличением объектива  $\times 10$ . Количественная оценка миграции клеток в рану осуществлялась путем подсчета ядер клеток, вышедших в рану за сутки на участке длиной 1000 мкм. Кроме того, измерялись расстояния выполнения клеток за это время.

(3) Для анализа трехмерной миграции исследуемых культур применялись камеры Бойдена с фильтрами, которые имели диаметр пор 8 нм (BD Falcon), а для



оценки инвазии использовали камеры с фильтрами дополнительно покрытыми матригелом (BD Falcon). Для этого клетки высевали в камеры в количестве  $5 \times 10^4$  кл/мл для MRC-5, MRC-5V1, MRC-5V2, 1036 и HT-1080 и  $10^5$  кл/мл для 10(3) и 10(3)RAS в среде DMEM с добавлением 5% FCS. В качестве хемоаттрактанта использовали среду DMEM с добавлением 10% FCS. Камеры культивировали в течение 10, 12, 20 часов при температуре 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки фиксировали холодным метанолом при температуре -20°C и окрашивали флуоресцентным красителем DAPI и исследовали при помощи флуоресцентного микроскопа Axioplan (Zeiss, Германия) с объективом Plan-Neofluar  $\times 20$ . Съемку препаратов осуществляли с использованием цифровой камеры Olympus DP70 (Olympus, Япония) с программным обеспечением DP Controller (Olympus, Япония). Затем подсчитывали количество клеток (по количеству ядер), выплзших на внешнюю сторону фильтра в 10-15 полях зрения. Кроме того, определяли % инвазии (INV) и индекс инвазивности (I), рассчитываемые по формулам приведенным в методическом пособии.

### **Конфокальная микроскопия**

Для более подробного исследования строения актинового цитоскелета часть иммунофлуоресцентно окрашенных препаратов снимали на конфокальном микроскопе (Zeiss, Германия) с увеличением объектива Plan-Neofluar  $\times 100$ . Полученные Z-серии обрабатывались при помощи программы Image Examiner, в результате чего были получены Z-сечения клеток и измерена средняя толщина ламеллы и средняя толщина раффла.

### **Платиновые реплики и электронная микроскопия**

Электронная микроскопия платиновых реплик применялась нами для тонкого строения актинового цитоскелета на электронно-микроскопическом уровне. Метод получения платиновых реплик с цитоскелетных препаратов включал в себя следующие этапы обработки культивируемых клеток: экстракция, фиксация, высушивание методом перехода критической точки, напыление, отмывка реплик (подробно см. Svitkina and Borisy, 1998; Svitkina, 2007). Платиновые реплики цитоскелета исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL 1200EX (JEOL, Япония) и CCD камеры ORIUS 835.10W (Gatan) с программным обеспечением Gatan Digital Micrograph. Изображения представляли в инвертированном виде.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Изменение морфологии и актинового цитоскелета у фибробластов при трансформации**

Контрольные фибробласты всех трех исследованных линий (10(3), MRC-5 и 1036) в редкой культуре - хорошо распластанные и поляризованные, плоские клетки. Они имеют хорошие контакты с субстратом, к которым подходят крупные акто-миозиновые пучки. Имеется развитая система микротрубочек. Активный край, как правило, сосредоточен в передней (ведущей) части клетки и представлен 1-2 тонкими широкими ламеллами. (рис. 1 и 2)

Морфология всех исследованных трансформированных клеток существенно изменена. Общим является значительное уменьшение площади клеток, редукция актиновых пучков, снижение числа и размера фокальных контактов (рис. 1). Все эти изменения являются типичными для неопластической трансформации и описаны многими авторами (Vasiliev and Gelfand, 1980; Минина и др., 2003; Young et al., 2003; Vasiljev, 2004; Shutova et al., 2008), что доказывает, что в нашем случае клетки действительно претерпели морфологическую трансформацию.

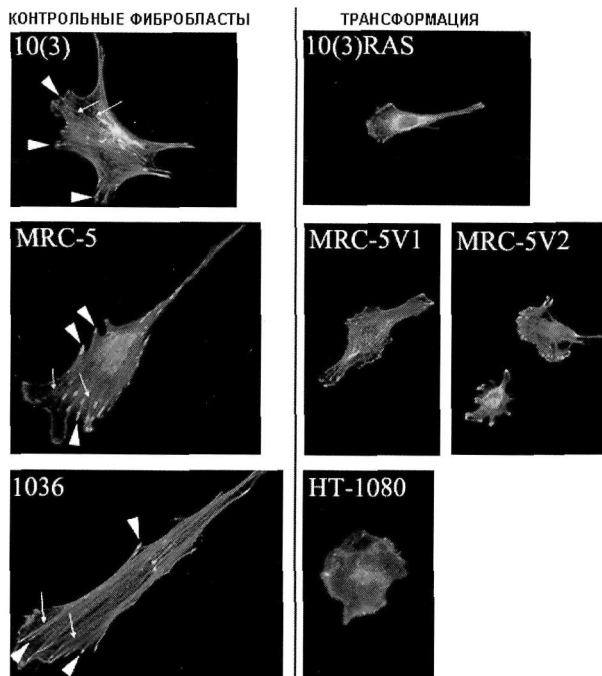


Рис. 1. Организация актинового цитоскелета и фокальных контактов контрольных и трансформированных фибробластов. У контрольных клеток хорошо видны мощные актиновые пучки (отмечены тонкими стрелками) и крупные штриховые фокальные контакты (отмечены толстыми стрелками), отсутствующие у трансформированных клеток. Окрашивание актина фаллоидином, конъюгированным с ФИТЦ (зеленый) и фокальных контактов антителами к винкулину (красный).

Было установлено, что использованные нами трансформированные клетки несколько отличаются между собой по степени изменения морфологии и актинового цитоскелета. Моноонкогенная Ras-трансформация может рассматриваться, как промежуточный этап на пути к приобретению клеткой инвазивного фенотипа, и наблюдаемые нами приобретенные нарушения выражены у 10(3)RAS клеток несколько слабее, чем у других, рассмотренных нами трансформированных линий. Форма клеток данной культуры изменилась: по нашим данным площадь трансформированных фибробластов уменьшилась в 1,6-раза по сравнению с контролем, возросла дисперсия и элонгация (по данным ранее полученным в нашей лаборатории (Минина и др., 2002), актиновые пучки и

фокальные контакты существенно редуцированы, но все же у многих клеток сохраняются остаточные актиновые пучки. Т.е. это начальный этап морфологических изменений. SV40-трансформированные клетки культур MRC-5V1 (в меньшей степени) и MRC-5V2 (в большей степени) по многим исследованным признакам приближаются по своим характеристикам к инвазивному фенотипу клеток фибросаркомы HT-1080 и могут рассматриваться как клетки с большей степенью морфологической трансформации. Так клетки MRC-5V2 как и клетки HT-1080 практически теряют поляризацию и у многих клеток полностью отсутствуют актиновые пучки и остаются лишь точечные фокальные комплексы (рис. 1).

## **2. Перераспределение и реорганизация псевдоподиальной активности в результате трансформации**

Прижизненное наблюдение и окрашивание фиксированных клеток антителами к Atp2/3-комплексу позволило нам выявить существенные различия в распределении различных форм края (стабильного, сильно- и слабо-активного, ретрактирующего) по периметру.

Контрольные клетки представляют собой "классические фибробласты". Они хорошо поляризованы и имеют четко различимые активные и стабильные края. Общая длина нестабильного края у контрольных клеток всех линий составила 44-55% от всего клеточного периметра. Большая часть его представлена сильноактивными участками (САУ), и лишь небольшая слабоактивными (СЛАУ), которых вовсе нет у мышинных фибробластов 10(3). У них имеется довольно крупный сильноактивный участок края (САУ) на переднем (ведущем) конце клетки. Боковые части клетки и хвостовая часть, как правило, представляют собой ярко-контрастирующие стабильные участки (СтУ), которые занимают 45-56% периметра. Небольшие дополнительные участки активности (как правило, ретрактирующие участки (РУ) (2-9% периметра), но иногда и САУ) могут встречаться в дистальной части хвоста (рис. 2А).

Таким образом, у самых разных фибробластов стабильный край занимал около 50% клеточного периметра и, вероятно, это может являться характерной чертой нормальных клеток.

Мы показали, что трансформация клеток приводит к увеличению доли активного края перераспределению активности вдоль периметра клетки и, как крайнее проявление, частичной утрате ярко выраженной полярности клетки. Так, у менее измененных клеток культур 10(3)RAS и MRC-5V1 поляризация сохраняется, а у 10(3)RAS даже увеличивается: часто имеется довольно крупный участок сильной активности (САУ) на переднем конце клетки, но, кроме того, встречаются довольно крупные участки активности на хвосте и на боковых поверхностях клетки (рис. 2) У более трансформированных MRC-5V2 и у клеток фибросаркомы HT-1080 утрата поляризации более заметна: у части клеток сильно активный край занимает большую часть периметра, а у части разделен на несколько практически равноценных САУ, что затрудняет визуальное определение ведущего края (рис. 2).

Кроме того, у некоторых трансформированных клеток (что особенно выражено при SV40-трансформации) появляется довольно ярко выраженный слабоактивный край (СЛАУ), который как бы заменяет стабильный. СЛАУ предельно мелкими ламеллиподиями и филоподиями, кромка которых, как и кромка САУ, окрашивается антителами к Agr2/3-комплексу. Это позволяет нам считать эти участки активными, так как позитивная окраска антителами к Agr2/3-комплексу указывает на то, что там происходит Agr2/3-зависимая полимеризация актина.

Одним из факторов, стабилизирующих боковой край мигрирующих клеток, может быть наличие актиновых стресс-фибрилл, натянутых вдоль стабильного края клетки. Показано, что у клеток, обработанных ингибиторами акто-миозинового сокращения (Y27632 или блебистатином), у которых разрушены стресс-фибриллы, количество псевдоподий на боковых краях существенно возрастает (Shutova et al., 2008). В случае трансформированных клеток количество и размер стресс-фибрилл значительно редуцированы, что может приводить к ослаблению стабилизации боковых краев клетки.

Общим для трансформированных клеток всех исследованных линий является то, что доля нестабильного края у них значительно возрастает. И если у Ras-трансформированных клеток доля нестабильного края увеличилась лишь до 65% (в 1,5 раза), то у SV40-трансформированных клеток и у клеток фибросаркомы доля активного края увеличилась еще больше и составила 86-87% и 92% соответственно. Таким образом, при увеличении степени трансформации возрастала и доля активного края. Соответственно, отмечалось существенное снижение доли стабильного края (в 1,6–7 раз в зависимости от клеточной линии), вплоть до 8% клеточного периметра у клеток фибросаркомы. Возрастание общей доли нестабильного края происходит, в основном, за счет увеличения доли его сильно-активной составляющей и небольшого увеличения СЛАУ у MRC5-V1 и MRC-5V2 клеток; ретракции не имеют четких тенденций к убыванию или возрастанию и их изменения могут не рассматриваться, как серьезные. Хотелось бы отметить, что наибольший процент СЛАУ отмечен у менее измененных клеток «переходной» в плане морфологической трансформации линии MRC-5V1, у MRC-5V2 процент несколько снижается и приближается к контрольному значению, а у HT-1080 процент СЛАУ даже немного меньше контрольного. Это может свидетельствовать о возможности вновь появившихся СЛАУ впоследствии увеличивать свою активность и превращаться в САУ, что и происходит у более трансформированных MRC-5V2. Таким образом, СЛАУ можно охарактеризовать как переходную от стабильного к активному состоянию форму края. Следует также отметить, что при более длительном наблюдении (до 40 минут) у трансформированных клеток наблюдалась слабая активность на «стабильных участках» или они и вовсе сменялись сильно-активными участками, в то время как у контрольных клеток этого не происходило. Т.е., полученные нами данные по снижению доли стабильного края у трансформированных клеток могут быть несколько занижены из-за ограниченного времени наблюдения, и вполне вероятно, что не стоит говорить о наличии «истинно стабильного» края у трансформированных клеток. В то же время, у контрольных клеток стабильные края оставались таковыми даже при длительном наблюдении, а процесс смены местоположения ведущей ламеллы занимал гораздо большее время и чаще всего осуществлялся под давлением внешних факторов (например, контактов с соседней клеткой).

Столь существенное увеличение активного края и редукция стабильных участков края у трансформированных клеток, скорее всего, связана с увеличением количества активного Ras, вызывающего WASP-опосредованную, Agr2/3-зависимую полимеризацию актиновой сети. Скорее всего, перераспределение активного края (существенное увеличение активного края и редукция стабильных

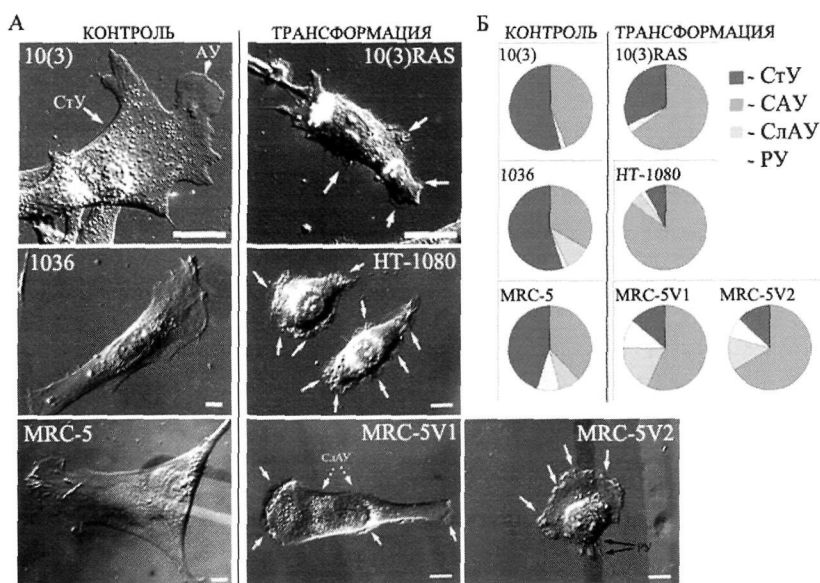


Рис. 2. Распределение псевдоподиальной активности по периметру клеток исследуемых культур. А. Изображения клеток исследуемых культур, снятые в режиме DIC. У клеток контрольных линий видны стабильные (СтУ) и активные (АУ) участки края (отмечены на примере клетки 10(3)). У трансформированных клеток видны многочисленные активные участки края (отмечены белыми стрелками), в том числе слабоактивные участки (отмечены прерывистыми стрелками на примере клетки MRC-5V1. На примере клетки MRC-5V2 показаны участки ретракции (РУ) (отмеченные черными стрелками, представленные у данной клетки в виде ретракционных фибрилл). Б. Диаграммы, иллюстрирующие распределение псевдоподиальной активности у клеток исследуемых культур.

участков) и частичная утрата клеточной полярности происходит благодаря изменению баланса малых ГТФаз. В случае SV40-трансформации это связано с экспрессией ST вируса. ST способен вызывать повышение активного Ras и Cdc42 (Nunbhakdi-Craug et al., 2003), что может обуславливать появление дополнительных участков Агр2/3-зависимой полимеризации актина (участков активности) и, в частности, появление дополнительных Cdc42-индуцированных филоподий в составе СлАУ у исследуемых клеток. Кроме того, для всех исследованных линий было установлено увеличение уровня экспрессии Ras (рис. 3), который, также приводит к увеличению активного Ras (Bag-Zagi and Hall, 2000; Lambert et al., 2002; Reparsky et al., 2004; Strumane et al., 2006). Помимо этого, показано, что усиленная экспрессия *N-RAS* приводит к увеличению количества дефосфорилированного кофилина (Chan et al., 2000; DesMarais et al., 2005; Alexandrova et al., 2006), который в свою очередь может разрезать актиновые филаменты в составе краевых пучков, высвобождая свободные плюс-концы, стимулируя, таким образом, полимеризацию новых филаментов, приводящая к образованию новых протрузий.

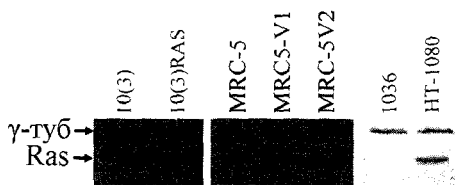


Рис. 3. Анализ экспрессии Ras в клетках исследуемых культур. Окрашивание антителами panRas (p21) и GTU88 (к  $\gamma$ -тубулину, p48). Наблюдается повышенная экспрессия Ras в клетках всех трансформированных линий.

### 3. Изменение ультраструктуры актинового цитоскелета при трансформации

Нами были проведены ультраструктурные исследования актинового цитоскелета нормальных и SV40-трансформированных фибробластов на электронно-микроскопическом уровне методом платиновых реплик (Svitkina and Borisy, 1998; Svitkina, 2007), в которых мы обращали особое внимание на периферические области клетки с целью выявления возможных различий в строении актинового цитоскелета на САУ, СЛАУ и СтУ у контрольных и трансформированных клеток.

На электронно-микроскопическом уровне, также как и на световом, у контрольных фибробластов выявляются толстые актиновые пучки (рис.4 А). В передней части клетки имеются плоские ламеллоподии, образованные густой довольно регулярной актиновой сетью с большим количеством свободных концов актиновых микрофиламентов в зоне протрузии (рис. 4 А. и Б); далее следует зона разрежения, там же, как правило, начинаются пучки. По боковому стабильному краю клетки (СтУ) идет мощный натянутый краевой актиновый пучок, за счет которого обеспечивается стабильность клеточного края (рис.4 В. и Г.).

При ультраструктурном исследовании в SV40-трансформированных клетках мы не наблюдали крупных актиновых пучков. Краевой пучок микрофиламентов у таких клеток тонкий и не очень плотный, а с его внешней стороны наблюдаются филоподии и мелкие ламеллоподии (рис. 5 Д). Этот пучок, вероятно, не создает должного натяжения, т.е. не препятствует образованию ламеллоподий и филоподий на боковых поверхностях и в хвостовой части клетки (рис. 5 Е). Таким образом, полученные данные подтверждают отсутствие у трансформированных клеток «истинно стабильного края».

Ультраструктура ламеллоподий трансформированных клеток также отличается от таковой у контрольных клеток: сеть актиновых микрофиламентов становится менее равномерной (рис. 5 А и Б). Наблюдается большое количество крупных раффлов, особенно в зоне ведущей ламеллы. (рис. 5 А). Эти изменения в строении активного края во многом обуславливают изменение его динамики у трансформированных клеток.

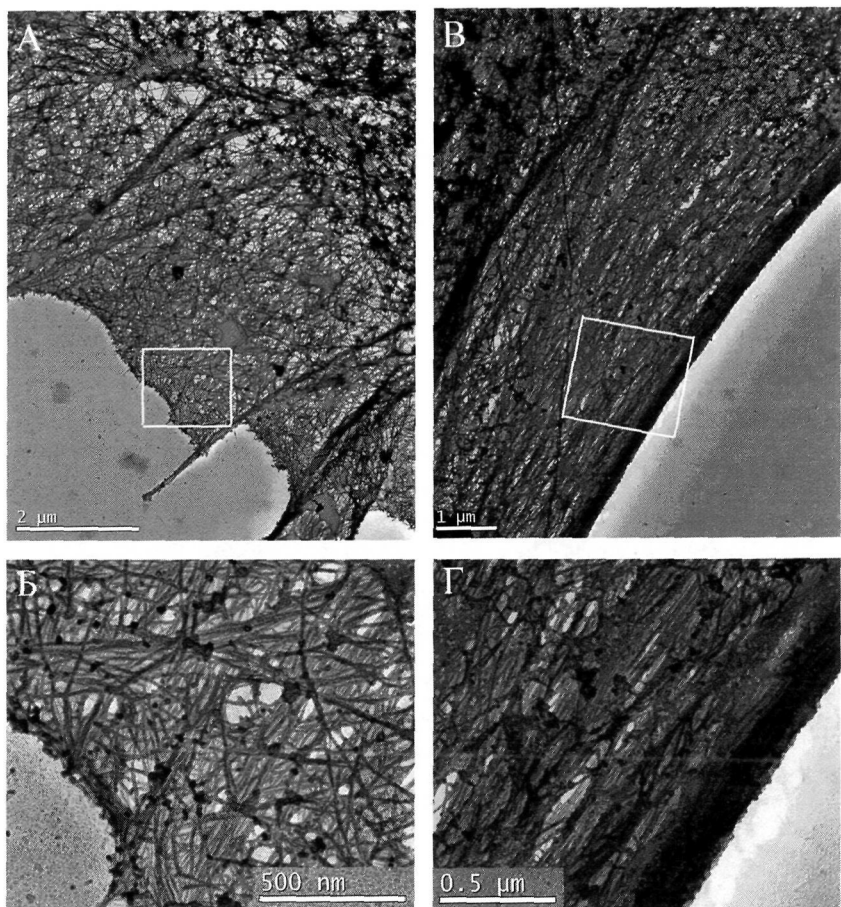


Рис. 4. Ультраструктура актинового цитоскелета клетки MRC-5. Видны толстые актиновые пучки в стабильной части клетки (справа) и зона ведущего края с ламеллой, ламеллиподиями и филоподиями (слева). **А.** Участок ведущего края. Видна густая упорядоченная актиновая сеть ламеллиподии (**Б**), филоподия, с подходящим к ней актиновым пучком. **В.** и **Г.** Участок стабильного края клетки. Виден краевой актиновый пучок и идущие параллельно ему стресс-фибриллы.

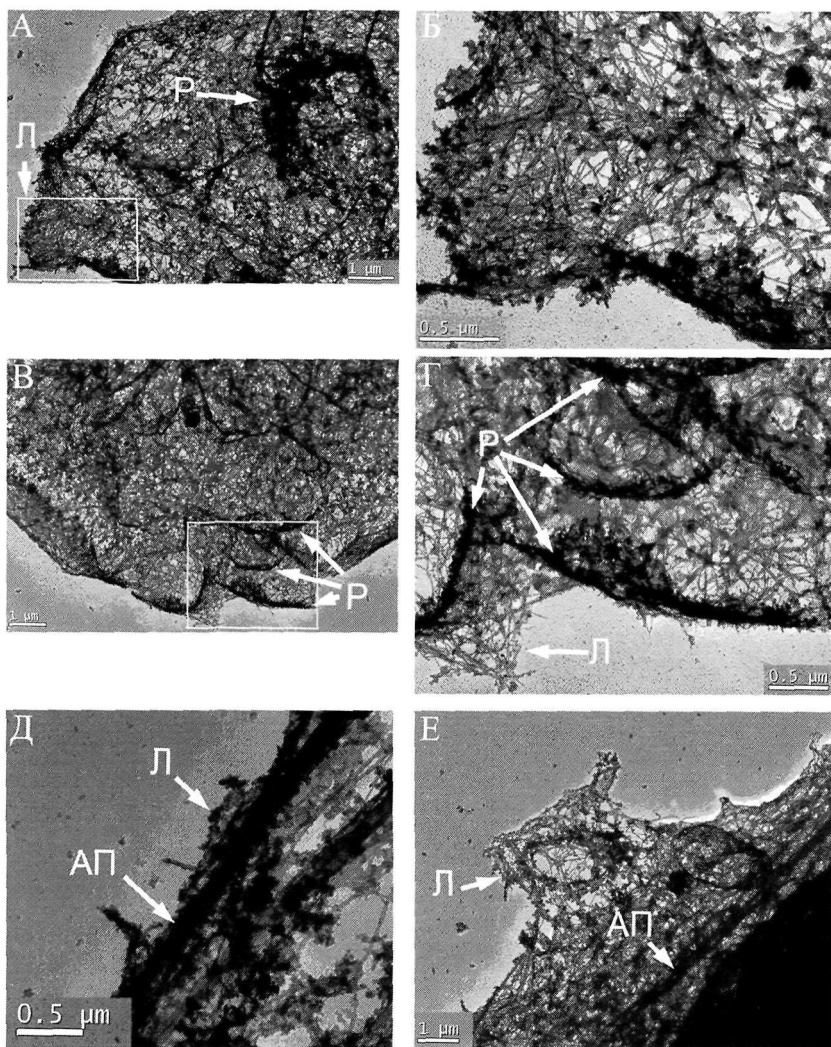


Рис. 5. Ультраструктура актинового цитоскелета клетки MRC-5V2. А. Нет крупных актиновых пучков, видны многочисленные раффы (более темные участки) на периферии клетки. А. Сильноактивный участок ведущего края. Видна небольшая ламеллиподия (Л) с нерегулярной актиновой сетью (крупно показана на Б), крупный рафл в виде розетки (Р). В. и Г. Сильноактивный участок края с многочисленными раффлами (Р), расположенными в несколько рядов, и мелкими ламеллиподиями (Л) (крупно показаны на Г). Д. Тонкий «краевой пучок» актина (АП) в хвостовой части клетки с мелкими ламеллиподиями (Л), выходящими за его границы. Е. Слабоактивный участок края в боковой части клетки. Виден тонкий актиновый пучок (АП) и ламеллиподия (Л) с нерегулярной сетью актиновых микрофиламентов.



#### 4. Характерные изменения в динамике активного края трансформированных клеток

При помощи DIC-микроскопии, видеосъемки живых клеток и последующего построения кимограмм нами была детально исследована псевдоподиальная активность контрольных и трансформированных клеток.

Характерными чертами псевдоподиальной активности всех исследованных контрольных клеток являются крупные, плоские и широкие протрузии и довольно низкая активность раффлинга. Частота образования протрузий и раффлов практически равны, т.е. каждая протрузия, как правило, переходит в небольшой раффл. Следует отметить, что скорость протрузии и ретракции не равны друг другу (рис. 6). Помимо этого, для клеток 10(3) и 1036 характерно наличие «пауз» динамической активности - участков покоя на краю, когда не образуются протрузии, и не происходит ретракция края.

Наиболее значимым и общим изменением динамики активного края при трансформации является значительное увеличение раффлинга у всех исследованных трансформированных линий. Если в норме мы видим отдельные всплески дорзальной активности, появляющиеся вслед за крупной протрузией (рис. 6), то у всех исследованных трансформированных клеток частота раффлов существенно повышается (в 1,5-3,2) и превышает частоту протрузий, т.е. раффлы образуются и в отсутствие видимой протрузии. Раффлы могут как бы сливаться в единый «вал», видимый позади небольшой ламеллоподии (рис. 6) или располагаться в несколько рядов (рис. 6), что также может свидетельствовать о довольно частом возникновении дорзальных раффлов, не ассоциированных с образованием протрузий. Это подтверждается при исследовании препаратов с помощью как электронного, так и конфокального микроскопов. На Z-срезах трансформированных клеток видны значительные утолщения ламеллы, которые по толщине у MRC-5V2 соответствуют толщине клетки в ядерной области (4,5 мкм), тогда как у контрольных клеток MRC-5 толщина раффлов не превышает 2 мкм.

У трансформированных клеток всех исследованных линий были отмечены и другие изменения характера псевдоподиальной активности разной степени выраженности. У трех из 4 исследованных линий протрузии уменьшаются в размерах, и их частота значительно увеличивается (в 1,8-2,5 раза) (кроме HT-1080, у которых протрузии все же довольно крупные, а частота протрузий даже немного падает по сравнению с контролем).

Результаты исследования скоростей протрузий и ретракций не позволяют выявить однозначной динамики изменений у трансформированных клеток. Однако у всех исследованных трансформированных клеток прослеживаются изменения, направленные на уравнивание скоростей протрузии и ретракции относительно друг друга. Так, в результате Ras-трансформации разница между скоростями протрузии и ретракции лишь сокращается, а у трансформированных клеток, использованных в других системах, эти скорости и вовсе становятся равными.

«Паузы» динамической активности, характерные для контрольных 10(3) фибробластов и подкожных фибробластов 1036 пропадают у клеток трансформированных линий.

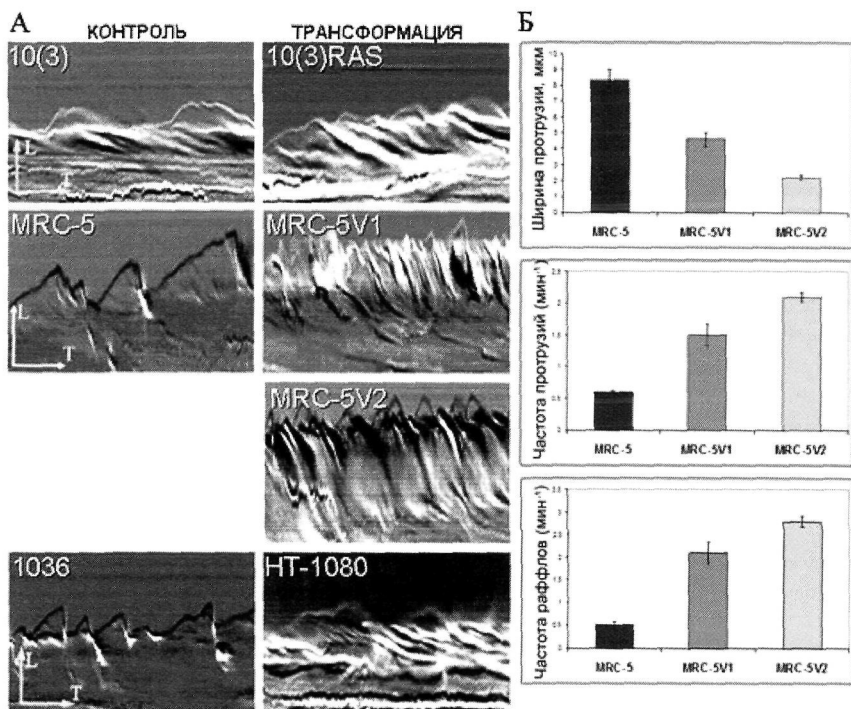


Рис. 6. Динамика активного края контрольных и трансформированных фибробластов. А. Кимограммы ведущего края контрольных 10(3), MRC-5, 1036 и трансформированных 10(3)RAS, MRC-5V1, MRC-5V2, HT-1080 клеток. Б. Диаграммы, иллюстрирующие динамические характеристики активного края на примере контрольных MRC-5 и SV40-трансформированных (MRC-5V1 и MRC-5V2) клеток.

Все описанные изменения позволяют утверждать, что трансформация клеток всеми исследованными способами приводит к тому, что активный край становится в целом более динамичным. Это, скорее всего, связано как с изменением ультраструктуры актиновой сети ламеллиподии и уменьшением числа и размера фокальных контактов, так и с изменением регуляции полимеризации актина. Так как ультраструктурные исследования показали, что сеть актиновых филаментов в ламеллиподии трансформированных клеток гораздо менее регулярна и более разрежена, чем в контроле, формируется меньше актиновых пучков, способных связываться с фокальными контактами (рис. 5), что может препятствовать образованию крупных протрузий, поскольку для успешного выдвигания крупной плоской протрузии клетка должна зацепиться за субстрат (Alexandrova et al., 2008). Снижение размеров и числа фокальных контактов (отсутствуют крупные штриховые контакты) у трансформированных клеток (рис. 1), по-видимому, отражает пониженную способность этих клеток к адгезии; клетка не может генерировать натяжение, не могут собираться полноценные акто-миозиновые пучки. Сходные данные были неоднократно описаны ранее (Mercurio et al., 2001; Ramos et al., 2002; Vasiljev, 2004; Maschler et al., 2005). Повышенная активность

Рас, который в свою очередь активирует белки WAVE, обеспечивающие Arp2/3-опосредованную полимеризацию актина и образование протрузий (Ridley et al., 1992; Ridley, 2001; Burrige and Wennerberg, 2004), приводит к усилению полимеризации актина и образования псевдоподий. Не все из них способны закрепиться на субстрате, таким образом, увеличивается количество раффлов и возникает ярко выраженная дорзальная активность. По данным других авторов образование дорзальных раффлов довольно часто является результатом трансформации (Viccione et al., 2004).

## 5. Изменение локомоторного поведения фибробластов в результате трансформации

Нашей основной целью было выяснить, как описанные нами отличия в динамике и распределении активного края, определяющиеся строением актинового цитоскелета контрольных и трансформированных клеток, влияют на эффективность клеточной миграции. Существует несколько общепринятых методов оценки эффективности миграции: индивидуальная миграция, миграция клеток в экспериментальную рану или через миллиметровые фильтры. Мы применили все эти методы и сравнили результаты. Во всех опытах были получены существенные различия в локомоторном поведении контрольных и трансформированных клеток, как на двумерном, так и на трехмерном субстрате.

### 5.1. Миграция клеток в экспериментальную рану

Для изучения количественной миграции клеток был проведен опыт с 24 часовой раной, и рассчитаны расстояния выползания и количество клеток, идущих в рану за это время. Полученные результаты представлены в таблице 1. Ras- и SV40-трансформированные клетки вышли в рану на несколько большее расстояние, чем контрольные (в 1,2-1,5 раза), а расстояние выползания у клеток фибросаркомы и вовсе не отличалось от контрольного. Однако клетки фибросаркомы приобрели способность открепляться от монослоя и «высеваться» в свободную область экспериментальной раны. Существенные различия наблюдались в количестве вышедших в рану клеток: в зависимости от культуры число вышедших в рану трансформированных клеток превышало это число в контроле в 2-10 раз. Кроме того, трансформированные клетки двигались в рану фронтом, в отличие от нормальных клеток, которые двигались поодиночке.

Таблица 1. Миграция клеток исследуемых культур в экспериментальную рану за 24 часа.

Клеточная линия	Среднее расстояние выползания (мкм/сутки)	Среднее кол-во клеток*
10(3)	296±13	361±28*
10(3)RAS	351±11	712±49*
MRC-5	134±10*	53±11*
MRC-5V1	206±6*	470±22*
MRC-5V2	186±5*	547±57*
1036	565±70,0	77±11,7*
HT-1080	493±3,9	534±15,2*

\* Параметры достоверно различающиеся у контрольных и трансформированных клеток с  $p < 0,01$ .

Однако стоит отметить, что, несмотря на частое применение, такой метод оценки имеет целый ряд недостатков. Во-первых, при такой постановке опыта мы не учитываем скорость деления клеток, хотя известно, что у трансформированных клеток скорость пролиферации выше, чем у нормальных, что может объяснить столь сильное увеличение количества клеток в области раны. Экспрессия Ras индуцирует Raf-MAPK каскад (Van Aelst et al., 1993, Vojtek et al., 1993), который регулирует изменение активности транскрипционных факторов и прежде всего активирует пролиферацию клеток через регуляцию активности циклин-зависимых киназ циклинD/Cdk4 и циклинE/Cdk2, ответственных за вход S-фазу клеточного цикла (Mittnacht, 1998; Helin, 1998). Экспрессия LT-антигена вируса SV40 тоже вызывает активацию клеточного деления (DeCaprio et al, 1988; Hannon et al, 1993). Во-вторых, в конfluence культуре плотность нормальных и трансформированных клеток различается благодаря тому, что у трансформированных клеток отсутствует контактное торможение. Они часто образуют многослойную культуру. Оба эти фактора могут оказывать существенное влияние на полученный результат.

### 5.2. Локомоторное поведение одиночных фибробластов в редкой культуре

Оценив недостатки предыдущего метода, мы решили дополнительно проанализировать подвижность клеток вторым независимым способом – по перемещению клеток в редкой культуре на протяжении 8 ч. В этом случае нет специального внешнего стимула для клеточного движения и миграция клеток, направленная или нет, происходит только под влиянием внутриклеточных регуляций. Мы оценивали общий путь миграции и направленность клеточного движения (см. материалы и методы).

Таблица 3. Параметры движения контрольных и трансформированных клеток в редкой культуре.

Клеточная линия	Общий путь (Т), (мкм)	Средняя скорость (мкм/ч)	Эффективный путь (D) (мкм)	Направленность движения (D/T) *
10(3)	44±4	5,5	35±4	0,78±0,03*
10(3)RAS	57±6	7,1	37±5	0,66±0,05*
MRC-5	194±14*	24±2*	139±14*	0,71±0,04*
MRC-5V1	108±8*	14±1*	54±6*	0,51±0,04*
MRC-5V2	63±3*	8±0,4*	40±3*	0,66±0,04**
1036	93±5,8*	12±0,7*	74±6,8*	0,77±0,038*
HT-1080	42±2,6*	5±0,3*	23±2,3*	0,56±0,044*

Параметры достоверно отличающиеся у контрольных и трансформированных клеток \* с  $p < 0,01$ ; \*\* с  $p < 0,05$ .

Общий путь, пройденный Ras-трансформированными клетками, был сравним с контрольным значением (больше в 1,3 раза), а общий путь, пройденный SV40-трансформированными клетками и клетками фибросаркомы, оказался в 1,8-3,1 раза меньше, чем путь, пройденный контрольными клетками. Таким образом, скорость движения одиночных Ras-трансформированных клеток немного возросла, а скорость движения SV40-трансформированных клеток и клеток фибросаркомы даже снизилась (табл.3). Стоит отметить, что скорость движения одиночных клеток наиболее морфологически трансформированных линий была более низкой, а именно

6 и 8 мкм/ч у MRC-5V2 и HT-1080 соответственно. Наиболее важным в изменении характера миграции было то, что движение клеток всех исследованных трансформированных линий стало более ненаправленным (рис. 7). Увеличение ненаправленности движения четко коррелировало со степенью выраженности морфологической трансформации, оно наглядно выражается через отношение эффективного пути к общему пройденному пути (D/T), которое составляет 0,71-0,77 в контроле и падает до 0,51-0,66 у трансформированных клеток. Нужно отметить, что среди MRC-5V2 и клеток фибросаркомы наблюдалось значительное количество «стоячих» клеток. Ядра этих клеток хаотически смешались на небольшие расстояния и постоянно меняли направление движения. Часть этих клеток готовилась к делению, чем можно объяснить остановку движения. Другие явно относились к интерфазным клеткам, но, тем не менее, не совершали направленного движения, в отличие от большинства одиночных контрольных клеток. Это свидетельствует о том, что часть трансформированных клеток попросту не способна выбрать единое направление движения в отсутствие дополнительного стимула. Скорее всего, данное явление обусловлено наличием нескольких равноценных ламелл в разных сторонах клетки и отсутствием поляризации. Кроме того, примечательно, что наименьшее расстояние проходят клетки культуры HT-1080.

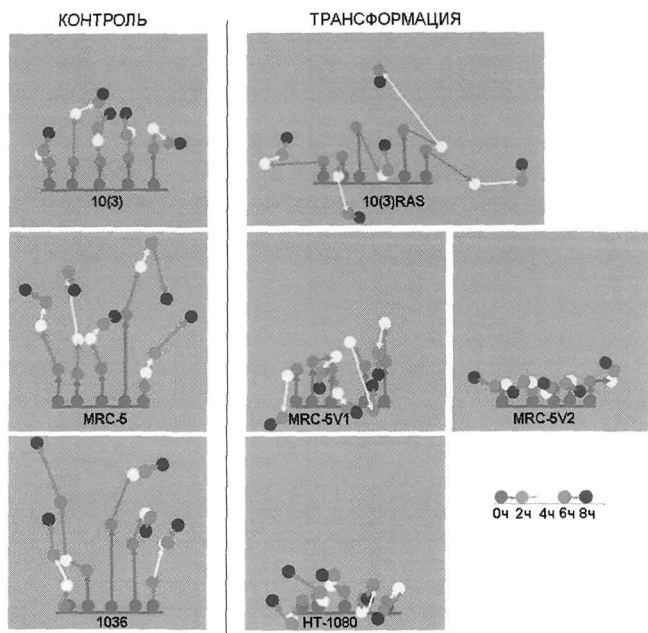


Рис. 7. Общий путь миграции (треки) клеток контрольных (10(3), MRC-5, 1036) и трансформированных (10(3)RAS, MRC-5V1, MRC-5V2, HT-1080) культур за 8 часов.

Увеличение ненаправленности движения при трансформации, скорее всего, связано с активацией Ras, обуславливающей повышение псевдоподиальной

активности и, возможно, сопутствующей перераспределению активного края. Ранее было показано, что даже сравнительно небольшое повышение активности Ras1 вызывает увеличение ненаправленного движения, но может не влиять на скорость клеточной миграции в целом или даже снижать ее (Pankov et al., 2005). Одиночной неполяризованной клетке сложно выбрать направление движения, и она движется довольно медленно и хаотично, или вовсе остается на месте. Однако в ране, когда соседние клетки задают направление движение друг друга, ограничивая возможность выбора, клетки могут двигаться с большей скоростью, локализуя всю псевдоподиальную активность на ведущем крае, что и обуславливает полученные нами эффект увеличения скорости миграции в этой модели. Скорее всего, именно перераспределение псевдоподиальной активности, в результате которого трансформированные клетки легко меняют направление движения, лежит в основе поискового поведения и является определяющим в проявлении способности опухолевых клеток к инвазии.

Кроме того, примечательно, что наименьшее расстояние при миграции на двумерном субстрате проходят клетки культуры HT-1080, для которых показана способность переходить от мезенхимального движения к амебoidalному и инвазировать матригель (Wolf and Friedl, 2009; наши данные).

### 5.3. Трехмерная миграция: миграция в камерах Бойдена

Для оценки способностей изученных нами клеток к миграции и инвазии в трехмерной системе нами были проведены соответствующие тесты в камерах Бойдена (см. материалы и методы) В отличие от предыдущих опытов по двумерной миграции на стеклах, в этих опытах трансформированные клетки вели себя гораздо активнее. В результате Ras-трансформации клетки приобрели способность к трехмерной миграции, которая отсутствовала у контрольных 10(3) фибробластов. Контрольные человеческие фибробласты (MRC-5) исходно обладали способностью к трехмерной миграции, но в результате SV40-трансформации эта способность значительно увеличилась и была сравнима со способностью к трехмерной мигра-

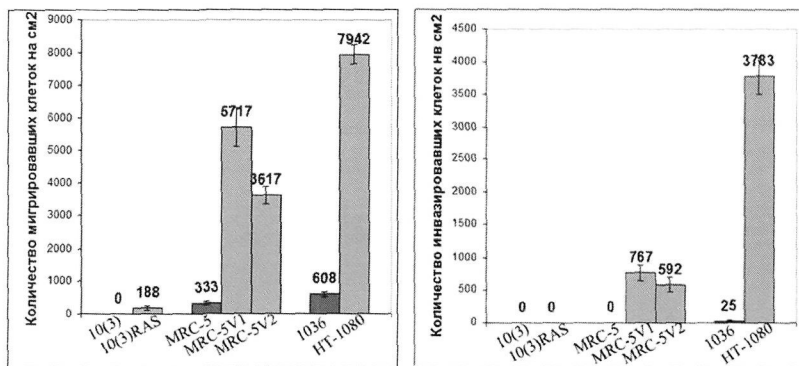


Рис. 8. Диаграммы, иллюстрирующие способность клеток исследуемых культур к трехмерной миграции и инвазии.

ции у клеток фибросаркомы. Кроме того, все исследуемые трансформированные линии, кроме 10(3)RAS, приобретали способность к инвазии, выраженную в

проценте инвазии от 13-14% для SV40-трансформированных линий до 47% для линии фибросаркомы (рис. 8). Данные результаты согласуются со способностями данных линий расти в матрикеле, описанными другими авторами (Huschtscha and Holliday, 1983; Wolf et al, 2003).

Таким образом, наиболее активными в опытах по трехмерной миграции оказались клетки «наименее приспособленные» к индивидуальному движению на двухмерном субстрате (стекле), а также, обладающие способностью отделяться и «высеваться» из клеточного монослоя. В большей степени это касается клеток HT-1080 и клеток MRC-5V2, характеризующиеся наибольшими морфологическими изменениями: крайней степенью редукции актиновых пучков и фокальных контактов, практически полным отсутствием поляризации и стабильного клеточного края, наличием активного дорзального раффлинга и «блеббообразных» утолщений в зоне ведущего края. Это может свидетельствовать о том, что перераспределение псевдоподиальной активности скорее необходимо не для увеличения скорости миграции (особенно на искусственном двумерном субстрате не характерном для биологических систем), а для облегчения поиска клеткой путей инвазии. Так, поведение исследуемых нами трансформированных клеток сходно с поведением лейкоцитов при их проникновении в кровяное русло. (Nourshargh et al, 2010). Как показали недавние исследования, лейкоциты мыши при попытке преодолеть стенку сосуда проявляют «поисковое» поведение в ответ на множественную стимуляцию воспалительными факторами, выбирая для миграции места, свободные от перичитов (Wang et al., 2006; Voisin et al, 2010). Скорее всего, наблюдаемое нами ненаправленное «поисковое» движение, сопровождающееся увеличением раффлинга и наличием «блеббообразных» натеков у трансформированных клеток является аналогом подобного движения на двумерном субстрате. Тем более, что одна из используемых нами линий (HT-1080), для которой характерны все вышеперечисленные изменения способна легко переключаться с одного типа движения на другой, за счет изменения баланса малых ГТФаз семейства Rho (Yamazaki, 2005).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, в данной работе мы проанализировали фенотип, псевдоподиальную активность и локомоторное поведение контрольных и трансформированных фибробластов, а также клеток фибросаркомы. В результате нами были выявлены изменения в структуре актинового цитоскелета трансформированных фибробластов, и, в частности, в ультраструктуре актинового цитоскелета ведущего края, которые приводят к появлению у трансформированных клеток таких отличительных особенностей, как редукция стабильного клеточного края и увеличение дорзальной динамической активности, сопровождающееся общим изменением характера псевдоподиальной активности на более динамичный. Было, также показано, что все эти изменения существенным образом отражаются на локомоторном поведении трансформированных фибробластов, а именно, являются определяющими для приобретения клеткой склонности к инвазивному поведению.

Кроме того, сравнение данных, полученных нами на различных системах трансформации, позволило нам показать, что моноонкогенная трансформация по гену RAS является недостаточной для приобретения клеткой способности к

инвазии. Это согласуется с данными о том, что опухоли у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный активированный *RAS* имеют клональную природу, то есть образуются из редких клеточных вариантов, в которых вероятно произошли дополнительные генетические изменения. А также, с данными о том, что в экспериментах на культурах клеток *in vitro* и бестимусных мышах установлено, что для приобретения эпителиальными клетками человека способности формировать злокачественные опухоли необходимо несколько изменений, приводящих, наряду с активацией *Ras*-регулируемых сигнальных путей, к инактивации опухолевых супрессоров p53, pRb и/или p16Ink4a и инактивации теломеразы и др. (Копнин, 2004). Выявленные нами морфологические признаки (утрата стабильного края, потеря поляризации, усиление раффлинга и изменение динамики ламеллиподий) у неспособных к инвазии *Ras*-трансформированных клеток выражены гораздо слабее, чем у других исследованных инвазионных культур, что доказывает влияние этих признаков на локомоторное поведение клетки и ее способность к инвазии.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что трансформация клеток приводит к существенному перераспределению краевой активности у фибробластов. У нетрансформированных клеток активный край сосредоточен на переднем конце клетки, и есть хорошо выраженные стабильные участки края. У трансформированных и опухолевых клеток относительная длина активного края существенно возрастает, и практически нет стабильных краев.

2. Перераспределение краевой активности сопряжено с изменением строения актинового цитоскелета ведущего края. Наряду с исчезновением стресс-фибрилл и крупных фокальных контактов увеличивается толщина ведущего края клетки в основном за счет формирования раффлов на дорзальной стороне клетки.

3. Исследование ультраструктуры актинового цитоскелета показало, что актиновая сеть в ламеллиподии становится менее регулярной, наблюдается большое количество «дырок» в подмембранном слое микрофиламентов. Краевой актиновый пучок в боковых и хвостовой частях клетки существенно редуцирован и не обеспечивает стабильность клеточного края.

4. При трансформации клеток существенно изменяется не только распределение, но и характер псевдоподиальной активности: протрузии на переднем крае становятся более мелкими, а частота их образования и частота образования раффлов значительно возрастает. Эти изменения коррелируют с изменениями строения актиновой сети ламеллиподии, а также с отсутствием полноценных контактов клетки с субстратом.

5. В результате трансформации изменяется характер миграции клеток. Движение одиночных трансформированных клеток носит менее направленный характер и скорость их миграции падает, в основном в результате отсутствия поляризации активности на ведущем крае. Одновременно появляется и/или усиливается способность к трехмерной миграции через поры камеры Бойдена.



6. Трансформированные клетки приобретают способность инвазировать матригель, однако, мутации одного гена *ras* недостаточно для приобретения инвазивных свойств. Способность к инвазии среди изученных клеточных линий увеличивается параллельно с нарастанием указанных изменений актинового цитоскелета, возрастанием краевой активности и уменьшением направленности движения клеток.

7. Перераспределение псевдоподиальной активности, вызванное изменениями структуры актинового цитоскелета, в результате которого трансформированные клетки легко меняют направление движения, является определяющим в проявлении способности опухолевых клеток к инвазии.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ломакина М.Е., Александрова А.Ю. Анализ изменений, вызываемых экспрессией онкогена *N-RAS* в характере и распределении псевдоподиальной активности фибробластов. // Онтогенез. – 2009. - Т. 40.- №4. – С. 1-12.

2. Ваулина М.Е., Александрова А.Ю. Изменение активности ведущего края фибробластов в результате их трансформации онкогеном *N-RAS*. // Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2006». – Москва, 2006. – С. 38-39.

3. Ваулина М.Е., Александрова А.Ю. Влияние экспрессии онкогена *N-RAS* на псевдоподиальную активность фибробластов при их движении. // Тезисы конференции «Биология клетки в культуре». – Санкт-Петербург. – Цитология. - 2006. – Т. 48. №9. – С. 749-750.

4. Александрова А.Ю., Ломакина М.Е., Шутова М.С., Васильев Ю.М. Реорганизация актинового цитоскелета фибробластов в процессе движения. Нарушения, приводящие к инвазии при опухолевой трансформации. // Материалы XII Российского онкологического конгресса. – Москва, 2008. – С. 123-124.

5. Ломакина М.Е., Александрова А.Ю. Изменение распределения и характера псевдоподиальной активности в процессе трансформации фибробластов. // Тезисы конференции «Петровские чтения 2008». - Санкт-Петербург. – Вопросы онкологии. -2008. – Т. 54. №2. – С. 7-8.

6. Ломакина М.Е., Александрова А.Ю. Анализ псевдоподиальной активности и локомоторного поведения трансформированных фибробластов. // Сборник тезисов 13-й международной пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века». – Пушино, 2009 – С. 107-108.

7. Lomakina M., Vasiliev J.M., Alexandrova A.Y. Associated Analysis of Protrusive Activity and Motile Behavior of Transformed Fibroblasts. // Thesis of International Symposium “Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies”. – Pushchino. – Synchronbook. – 2010. – P. 152-153.

Автор выражает глубокую благодарность Антонине Юрьевне Александровой за активное участие и помощь на всех этапах работы, Татьяне Михайловне Свиткиной за проведения электронно-микроскопических исследований, а также Юрию Марковичу Васильеву за ценные научные консультации.

Подписано в печать: 19.04.2011

Заказ № 5374 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)