

## ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

УДК 591

### РЕОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА – ОСНОВА МОРФОГЕНЕЗА

© 2007 г. Ю. М. Васильев

*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова*

*119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы*

*НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*

*115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24*

*E-mail: yuvasiliev@yahoo.com*

Поступила в редакцию 14.08.06 г.

Дан краткий обзор динамической структуры цитоскелета в клетках двух типов – фибробластах и эпителиоцитах. Описаны различия функций  $\gamma$ -актиновых филаментов и  $\beta$ -актин-миозиновых пучков. Тубулогенез и ангиогенез рассматриваются как следствия частичного эпителиомезенхимного превращения, а неопластическая трансформация – как следствие дефектности  $\gamma$ -актин-миозиновых пучков.

*Ключевые слова:* цитоскелет, фибробласт, эпителиоцит, актин, миозин, эпителиомезенхимное превращение, неопластическая трансформация.

#### УНИКАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА

Чем дальше и глубже ведется анализ молекулярных механизмов морфогенетических процессов в онтогенезе, тем яснее становится, что центром этих механизмов являются реорганизации цитоскелета. Цитоскелет – одна из основных структур клеточной цитоплазмы, имеющая многие особые черты. Цитоскелет состоит из нескольких основных групп белковых фибрилл, каждая из которых возникает в результате полимеризации одного определенного типа белковых мономеров. Дополнительные белки прикрепляются к этим фибриллам снаружи, но не входят в их основной состав (Bershadsky, Vasiliev, 1988). Основные группы цитоскелетных структур во внемышечных клетках составляют:

а) микротрубочки – полимеры тубулина, б) актиновые филаменты, по крайней мере, двух видов, состоящие соответственно из  $\gamma$ - или  $\beta$ -форм актина (Dugina et al., 2004; Дугина и др., 2006), и в) промежуточные филаменты, состоящие из белков одной группы, но разных видов в разных тканях, – кератины в эпителиях, виментин в мезенхимных тканях и т.д. Для этих цитоскелетных структур характерна высокая динамичность. Фибриллы в большинстве клеток все время удлиняются за счет полимеризации или укорачиваются за счет деполимеризации. Они могут менять свое положение и отношение к другим компонентам клетки. Особый интерес представляет внутреннее движение мономеров вдоль фибриллы, когда они перемещаются, не нарушая целостности или положения фибриллы, за счет полимери-

зации на одном конце и деполимеризации – на другом. Этот особый вариант динамики, очень распространенный в структурах цитоскелета, позволяет назвать такие фибриллы “фибриллярными потоками”, идущими внутри цитоплазмы. По этим потокам вдоль фибриллы могут двигаться особые “молекулярные суда” – моторы, такие как кинезины и динеины; к этим моторным молекулам могут быть прикреплены различные мембранные органеллы и рибосомы и, вероятно, ядро. В результате вдоль потока происходит перемещение структур цитоплазмы. Мы еще недостаточно знаем о жидкой среде – цитозоле, в которой происходит жизнь и движение цитоскелетных потоков. В таком цитозоле много цитоскелетных мономеров, а также белков, регулирующих деполимеризацию фибрилл: гельзолинов, кофилинов и других. Цитоскелетная динамика контролируется многими регулирующими системами. Главная из изученных систем такого рода – группа малых ГТФаз Rho, включающая белки RhoA, RhoC и CDC42. Эта система регулирует состояние миозина и его взаимодействие с актиновыми фибриллярными потоками, а также полимеризацию актина на переднем крае клетки и его деполимеризацию при воздействии кофилина.

В целом цитоплазма, наполненная цитоскелетными структурами, является совершенно особым образованием, чем-то вроде покрытого мембраной бассейна. Внутри и по краям этого бассейна непрерывно движутся фибриллярные потоки – “ленты”. По этим “лентам” движутся молекулярные моторы и органеллы, а формы этих “лент”

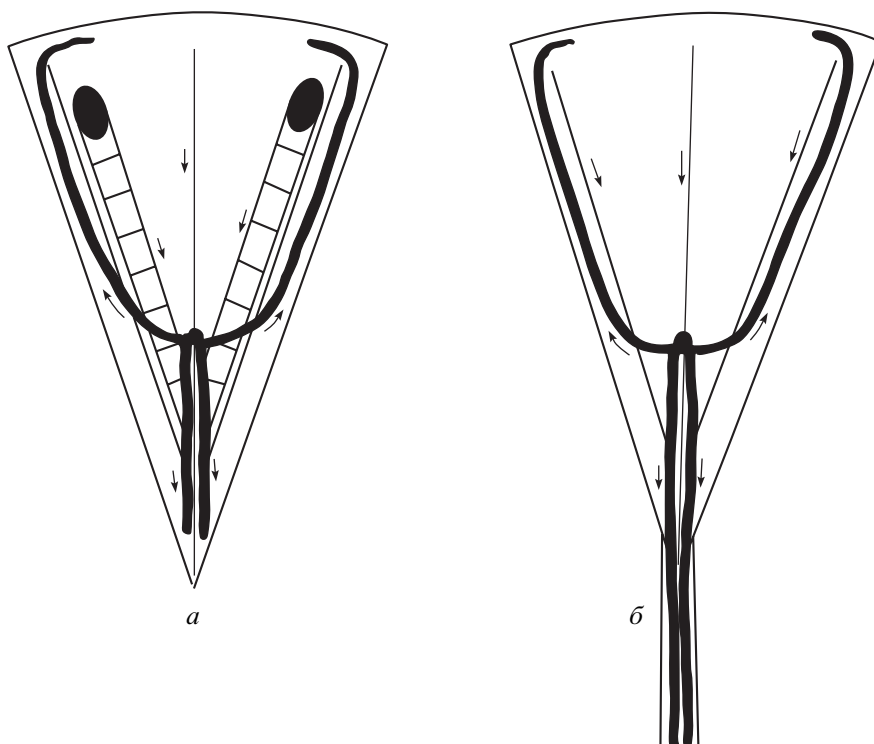


Схема организации цитоскелета в контрольном фибробласте (*a*) и фибробласте, обработанном блебистатином, который вызвал исчезновение актин-миозиновых пучков (*б*). (—) –  $\gamma$ -актиновые филаменты; (▨) – пучки из  $\beta$ -актина и миозина II, на концах пучков – фокальные контакты; (—) – микротрубочки. (Для упрощения схемы число фибрилл каждого типа резко уменьшено по сравнению с действительно присутствующим в цитоплазме.)

постоянно меняются. Ничего похожего в технической человеческой практике мы не знаем.

### ЦИТОСКЕЛЕТ ФИБРОБЛАСТА

В качестве примера конкретной организации цитоскелета мы рассмотрим фибробласт – наиболее изученную в этом отношении эукариотическую клетку. Возможно, и даже вероятно, что фибробласт представляет собой прототип всех мезенхимных клеток.

В этой краткой статье мы не будем пытаться дать полный обзор данных о цитоскелете фибробласта, а рассмотрим лишь некоторые новые результаты, в том числе полученные в последнее время в работах нашей группы.

В цитоплазме фибробласта есть несколько основных фибриллярных потоков (рисунок, *a*): поток микротрубочек; связанный с ним поток промежуточных филаментов и потоки микрофиламентов, разделяющиеся на два типа –  $\gamma$ -актиновых филаментов и связанных с миозином  $\beta$ -филаментов. Рассмотрим каждый из них чуть подробнее.

*Поток микротрубочек* начинается в районе centrosомы, где они нуклеируются и двигаются к периферии. На периферии возле края клетки микротрубочки могут поворачиваться. По ходу

движения к периферии микротрубочки могут разрываться, испытывать “катастрофы” (переходить от роста к распаду), затем опять переходить к росту и т.д.

*Поток промежуточных филаментов, связанный с микротрубочками.* Эти фибриллы растут из неизвестного источника вблизи центра клетки вдоль микротрубочек и параллельно им. При разрушении последних промежуточные филаменты испытывают коллапс, т.е. собираются вокруг ядра, уходя с периферии. Есть данные, что для стабильного расположения промежуточных филаментов на периферии и для предотвращения коллапса необходимо нормальное состояние актиновых филаментов, которые, по-видимому, растягивают пучки промежуточных филаментов.

*Поток  $\gamma$ -актиновых филаментов* зарождается на периферии клетки на ее активном крае за счет специального полимеризующего механизма. Эти филаменты образуют затем сеть, движущуюся к центру клетки навстречу микротрубочкам. Такая сеть разделяется на верхний и нижний кортекс и в итоге покрывает всю клетку. На периферии нижняя часть сети  $\gamma$ -актиновых филаментов входит в контакт с субстратом и образует специальные фокальные комплексы – зачаток фокальных контактов клетки с субстратом. В фокаль-

ных комплексах участвуют интегрин – компоненты внеклеточного матрикса – и специальные белки: паксиллин, винкулин и другие, соединяющие субстрат с актиновым микрофиламентом. Расположение фокальных комплексов определяет границу между периферической, чисто  $\gamma$ -актиновой, частью микрофиламентной системы, так называемой ламеллоподией, и более внутренней частью, где наряду с сетью  $\gamma$ -филаментов образуется также второй тип микрофиламентных потоков.

*Пучки  $\beta$ -актиновых филаментов.* Точное место возникновения таких филаментов неясно, скорее всего, они начинают полимеризоваться из мономеров вблизи фокальных контактов. Так или иначе пучки  $\beta$ -филаментов растут центростремительно от таких фокальных комплексов до внутренней части клетки, а иногда и дальше, до ее хвостовой части. В состав пучков  $\beta$ -актиновых филаментов всегда входят миозиновые филаменты и миозин IIb, по-видимому, полимеризующийся одновременно с ними или где-то в цитоплазме и немедленно встраивающийся в состав пучков. Заметим, что угнетение активности миозина IIb блебистатином или другими ингибиторами медленно приводит к разрушению всего пучка (Шутова, Александрова, 2006). Поэтому можно думать, что миозин IIb играет организующую роль в формировании такого пучка. Опыты с ингибиторами миозина IIb дают также принципиально новые данные для понимания механизмов функций двух типов микрофиламентных структур в клетке.

Как уже сказано, такие ингибиторы, например блебистатин, угнетают образование пучков, состоящих из  $\beta$ -актина и миозина, а также снимают актин-миозиновое натяжение, существующее в клетке и развиваемое такими пучками. В то же время сеть  $\gamma$ -актиновых филаментов остается мало измененной (рисунки, б). В клетках, обработанных блебистатином или другими ингибиторами, движения по субстрату происходят с той же или даже с большей скоростью, чем в контрольной. Следовательно, эти движения могут осуществляться и без участия миозина и актин-миозиновых пучков. Наиболее вероятным механизмом таких движений является направленная полимеризация  $\gamma$ -актина на переднем конце клетки и постепенная деполимеризация его в теле клетки. Мономеры актина, возникающие в результате деполимеризации, переносятся затем к переднему краю (Zicha et al., 2003). Главное отличие клетки, обработанной блебистатином, от контрольной состоит в том, что, хотя тело клетки движется вперед, на заднем ее конце постепенно образуется длинный узкий “хвост”, содержащий в основном микротрубочки и промежуточные филаменты. Этот “хвост” пассивен и активно передвигаться не может. Таким образом, если  $\gamma$ -акти-

новая сеть нужна для перемещения тела клетки вперед, то  $\beta$ -актин-миозиновые пучки необходимы для подтягивания заднего конца клетки и сокращения хвостового отростка.

Микротрубочки и, возможно, связанные с ними промежуточные филаменты имеют множество функций, наиболее очевидная из которых – обеспечение поляризации клеточной формы и движений. При разрушении микротрубочек с сопровождающим его коллапсом промежуточных филаментов у клетки нарушается разделение на активные и стабильные края: форма ее становится неправильной, а способность к направленному движению исчезает, причем ламеллоподии продолжают образовываться по всему краю. У клетки с деполимеризованными микротрубочками появляется большее число актин-миозиновых пучков. Это является результатом того, что из разрушенных микротрубочек в цитоплазму выделяется фактор, индуцирующий образование пучков (Крендель, 2003). Нарушение поляризации не связано с этим эффектом. Клетки с деполимеризованными микротрубочками при разрушении пучков ингибитором все равно теряют полярность (Omelchenko et al., 2002). В целом можно себе представить следующий механизм поляризации формы и направленных движений фибробластов.

Начальный сигнал дается внешними агентами (факторами роста, хемиотактическими веществами, изменениями контакта с субстратом и др.), которые активируют соответствующие рецепторы и индуцируют полимеризацию  $\gamma$ -актина на одном из краев фибробласта. Образованием фокальных комплексов вблизи этого края первично стабилизируется направление поляризации, а затем это направление подтверждается и усиливается образованием актин-миозиновых пучков, растущих к центру от этих комплексов. Вростание микротрубочек от центра к активному краю вызывает дополнительную значительную стабилизацию того же направления. Возможно, что микротрубочки на концах имеют ферменты типа Rac, которые стимулируют полимеризацию актина на переднем крае.

Наряду с поляризованным состоянием фибробласт может приобрести и иные формы, одной из них является сферическая, в которую фибробласт переходит при отделении его от субстрата. Об организации цитоскелета в такой сферической клетке мы знаем мало. По-видимому, здесь происходит сжатие  $\beta$ -актиновых пучков, поддерживающее сферическую форму. При прикреплении к субстрату (распластывании) клетка не сразу переходит в поляризованную форму. Предварительно она некоторое время проводит в дисковидной форме, когда ее ламелла расширяется равномерно во все стороны. При этом на краю клетки образуется кольцевой актин-миозиновый пучок,

а все микротрубочки располагаются внутрь от этого пучка. Механизмы образования такой дисковидной формы еще неясны. Возможно, при формировании кольцевого пучка микротрубочки в центральной части клетки оттесняют микрофиламенты на периферию. Действительно, при обработке поляризованных клеток таксоллом, который вызывает образование многочисленных фрагментов микротрубочек в центральной части клетки, вокруг этих фрагментов образуется кольцевой пучок, и клетка становится весьма похожей на дисковидную клетку при распластывании (Pletjushkina et al., 2001).

Таким образом, в зависимости от соотношения микротрубочек,  $\gamma$ -актиновых филаментов и актин-миозиновых пучков фибробласт может принимать существенно различные морфологические формы.

### РОЛЬ НАТЯЖЕНИЯ В ОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА И ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА

Как регулируется деятельность и организация цитоскелета? Наряду с обычными химическими регуляциями, такими как деятельность малых ГТФаз типа Rho, о которых речь шла выше, здесь действует особый механохимический фактор – натяжение, создаваемое в основном взаимодействием  $\beta$ -актина и миозина. Такое натяжение регулирует многие стороны организации цитоскелета. Наглядным примером чего является его влияние на организацию фокальных контактов с субстратом и некоторых типов межклеточных контактов кадхериновой группы. К концам таких контактов прикрепляются концы пучков актин-миозиновых филаментов. Повышение натяжения в этих пучках вызывает парадоксальный эффект: длина и размеры контактов при этом резко увеличиваются. Иначе говоря, натяжение пучков, стремящееся оторвать контакт от субстрата, вызывает увеличение прочности этих контактов. Такой эффект стабилизирует прикрепленное, распластанное состояние клетки и ее адгезию к другим клеткам, что может иметь существенное значение в морфогенезе. Натяжение, возможно, играет определяющую роль не только в организации цитоскелета, но и в определении судьбы клетки, ее жизнеспособности. Если распластанные клетки оторвать механически или каким-либо другим способом от субстрата, то в суспендированном состоянии они очень быстро вступают в апоптоз и гибнут. Это явление называют анойкизом. Уже через 15 минут после отрыва клетки от подложки и ее перехода в суспендированное сферическое состояние начинается экспрессия каспаз, инициирующих апоптоз (Grossmann et al., 2001). По-видимому, разрушение белковой структуры контактов вызывает индукцию сигнальной системы пути, приводящую к апоптозу. Мы не

знаем пока точной природы компонентов этого сигнального пути. Через контактные структуры натяжение может передаваться на другие клетки и на фибриллы внеклеточного матрикса и таким образом вызывать изменения не только формы и ориентировки отдельных клеток, но и целых эмбриональных зачатков (см., например: Harris, 1973; Белоусов и др., 2000).

### ВАРИАНТЫ ОСНОВНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ ЦИТОСКЕЛЕТА ОПРЕДЕЛЯЮТ СПЕЦИФИКУ МОРФОГЕНЕЗА РАЗНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК

Цитоскелетные организации фибробласта, о которых говорилось выше, изучены наиболее детально. Исследование других типов клеток, которое еще только началось, выявляет в общем те же формы реорганизации, но в иных соотношениях. Приведем в качестве примера реорганизацию эпителия.

Одиночная эпителиальная клетка при полном окончании распластывания имеет дисковидную форму и образует кольцевой пучок, очень похожий на пучок фибробласта ранней стадии распластывания. Эпителиоцит образует прочные контактные структуры с другими гомологичными клетками. Клетки в таких пластах, прочно спаянные, сохраняют по краю обычно кольцевидные пучки из  $\beta$ -актина и миозина. Эпителиальные клетки двигаются направленно лишь в составе пласта, при этом краевые клетки пласта могут разрывать кольцевой пучок и образовывать прямые пучки, перпендикулярные краю. Такие клетки, однако, не разрывают полностью контакты с другими клетками пласта, но, напротив, по-видимому, тянут их за собой, так что образуются ленточные тяжи, в которых передняя клетка (“лидер”) в свою очередь тянет несколько рядов клеток–“последователей” (Омельченко, 2003). Здесь можно говорить о частичном эпителиомезенхимном переходе. Образование тяжей с “лидерами” во главе особенно ярко выражено при росте эпителия в некоторых особых условиях (культуры в коллагеновом геле с добавлением специальных факторов роста). В этих условиях длинные тяжи постепенно превращаются в систему ветвящихся трубок, очень похожих на те, которые образуются при онтогенезе трубчатых органов, например слюнных желез, почек и т.д., и на ветвящиеся сосуды при ангиогенезе. Таким образом, и здесь в основе морфогенеза лежит частичное превращение некоторых эпителиальных клеток в фибробластоподобные. Наконец, наиболее выраженным вариантом эпителиомезенхимного превращения является полный распад пласта на отдельные, свободно движущиеся фибробластоподобные клетки при воздействии на культуры специальных факторов роста. Этот процесс полного эпи-

телиомезенхимного превращения очень похож на многие ключевые процессы в онтогенезе, например на миграцию клеток из нервного гребня, а также на некоторые варианты гастрюляции (Васильев, Гельфанд, 2006).

### НЕОПЛАСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Наряду с нормальными процессами морфогенеза цитоскелетные преобразования, по-видимому, являются основой изменения формы и движения клеток при патологических процессах, в особенности при генетической опухолевой трансформации. Такую трансформацию культивируемых фибробластов или эпителиоцитов можно вызвать трансдукцией в клетку мутантных онкогенов, таких как *SV40*, *ras* и многих других. При таких трансформациях эпителиальный пласт распадается на отдельные фибробластоподобные клетки, т.е. происходит процесс, очень похожий на эпителиомезенхимную трансформацию, рассмотренную выше. При неопластических трансформациях фибробластов центральным является уменьшение расплывания клеток, а также исчезновение системы  $\gamma$ -актин-миозиновых пучков при сохранении  $\beta$ -актиновых сетей (см. обзор: Vasiliev, 2004; Dugina et al., 2005; Zwaenepoel et al., 2005). Это изменение очень похоже на таковое при инактивации миозина блебистатином и другими ингибиторами. Отметим, однако, что у трансформированных опухолевых клеток “хвосты” гораздо меньшей длины, чем у нормальных, обработанных блебистатином клеток. Кроме того, такие клетки сокращаются при движении. По-видимому, неопластическая трансформация не полностью инактивирует  $\beta$ -актин-миозиновую систему, а лишь частично ее ослабляет и угнетает. Возможно, что экспрессия онкогенов каким-то образом тормозит функции миозина II. Другая особенность трансформированных клеток – распад системы межклеточных контактов. Механизмы этого процесса еще недостаточно изучены. Косвенные данные указывают на то, что и это изменение может быть связано с нарушениями систем актиновых филаментов, вызванными онкогенами. Все эти преобразования актин-миозиновой системы и контактов, вероятно, могут способствовать опухолевой инвазии – важнейшей особенности злокачественных клеток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы указали на некоторые механизмы цитоскелетных преобразований, которые могут иметь определяющее значение при нормальном и патологическом морфогенезе. Исследования этих преобразований только начинаются. Многие проблемы, может быть большинство, еще не решены.

Мы не знаем, как взаимодействуют  $\beta$ -актиновые и миозиновые компоненты в пучках, как образуются  $\beta$ -актиновые полимеры. Нам неизвестно, какова точно роль микротрубочек в поляризации клеток, какова связь формирования и редукции межклеточных и фокальных контактов с натяжением актин-миозиновых пучков. Мы не знаем также, какие точно молекулярные изменения приводят к редукции актин-миозиновой системы и контактных систем при неопластической трансформации. Наконец, мы ничего не знаем о функциях промежуточных филаментов в нормальных и трансформированных клетках. Многочисленные вопросы такого рода изучаются в настоящее время очень интенсивно, поэтому можно надеяться, что в ближайшем будущем многие из них будут решены.

*Автор выражает глубокую благодарность В.И. Самойлову и Э.Н. Васильевой за неоценимую помощь в подготовке текста и рисунка.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В., Штейн А.А., Лучинская Н.Н. и др. Механические аспекты морфогенеза эпителиальных пластов // Современные проблемы биомеханики. М.: Изд-во МГУ, 2000. Вып. 10. С. 20–93.
- Васильев Ю.М., Гельфанд И.М. Поиск миграции клеток в нормальном развитии и в канцерогенезе // Биохимия. 2006. Т. 71. № 8. С. 1013–1020.
- Дугина В.Б. Цитоплазматические изоформы актина организуют различные цитоскелетные структуры клетки // Молекулярные механизмы процессов онтогенеза: эмбриогенез, геномы, эволюция. М.: ОБН РАН и др., 2006. С. 24.
- Крендель М.Ф. Роль катализаторов обмена нуклеотидов ГТФаз семейства Rho в передаче сигналов от микротрубочек к актиновому цитоскелету // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2003. № 3. С. 73–75.
- Омельченко Т.А. Организация движущегося эпителиального пласта // Там же. 2003. № 3. С. 92–93.
- Шутова М.С., Александрова А.Ю. Как ползет клетка. Перестройки цитоскелета, обеспечивающие движение клеток в культуре, роль актина и миозина II // Молекулярные механизмы процессов онтогенеза: эмбриогенез, геномы, эволюция. М.: ОБН РАН и др., 2006. С. 23.
- Bershadsky A.D., Vasiliev J.M. Cytoskeleton. N. Y.: Plenum Press, 1988. 380 p.
- Dugina V., Gabbiani G., Chaponnier C. The cytoplasmic actins beta and gamma are differentially distributed in motile cells // FEBS special meeting on cytoskeletal dynamics: from cell biology to development and disease. Helsinki, 2004. P. 47.
- Dugina V., Tchypysheva T., Ermilova V. et al. Cytoplasmic actins are differently distributed in normal, dysplastic and carcinoma cells of human breast // FEBS-ESF Workshop “Integrated approaches in cytoskeleton research”. Luxembourg, 2005. P. 49.

- Grossmann J., Walther K., Artinger M. et al.* Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis (“anoikis”) of primary human intestinal epithelial cells // *Cell Growth Differ.* 2001. V. 12. P. 147–155.
- Harris A.* Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness // *Exp. Cell Res.* 1973. V. 77. P. 285–297.
- Omelchenko T., Vasiliev J.M., Gelfand I.M. et al.* Mechanisms of polarization of the shape of fibroblasts and epitheliocytes: separation of the roles of microtubules and Rho-dependent actin-myosin contractility // *PNAS.* 2002. V. 99. P. 10452–10457.
- Pletjushkina O.J., Rajfur Z., Pomorski P. et al.* Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules // *Cell Motil. Cytoskel.* 2001. V. 48. № 4. P. 235–244.
- Vasiliev J.M.* Cytoskeletal mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells // *Int. J. Devel. Biol.* 2004. V. 48. P. 425–439.
- Zicha D., Dobbie J.M., Holt M.R. et al.* Rapid actin transport during cell protrusion // *Science.* 2003. V. 300. P. 142–145.
- Zwaenepoel I., Dugina V., Chaponnier C.* Expression of cytoplasmic actins is modulated in transformed compared to normal cells // *FEBS-ESF Workshop “Integrated approaches in cytoskeleton research”.* Luxembourg, 2005. P. 127.

## Reorganization of Cytoskeleton as a Basis of Morphogenesis

**Ju. M. Vasiliev**

*Research Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia*  
*Research Institute of Carcinogenesis, Blokhin Russian Oncological Center of the Russian Academy of Medical Sciences,*  
*Kashirskoe sh. 24, Moscow 115478 Russia*  
*E-mail: yuvasiliev@yahoo.com*

**Abstract**—A brief review of the cytoskeleton dynamic structure in cells of two types: fibroblasts and epitheliocytes. Differences have been described between the functions of  $\gamma$ -actin filaments and  $\beta$ -actomyosin bundles. Tubulogenesis and angiogenesis have been considered as consequences of partial epitheliomesenchymal transformation and neoplastic transformation as a consequence of  $\gamma$ -actomyosin bundles disturbance.

*Key words:* cytoskeleton, fibroblast, epitheliocyte, actin, myosin, epitheliomesenchymal transformation; neoplastic transformation