

УДК 576.385.5

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ЭКСПРЕССИЕЙ ОНКОГЕНА *N-RAS*, В ХАРАКТЕРЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ПСЕВДОПОДИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ¹

© 2009 г. М. Е. Ломакина, А. Ю. Александрова

НИИ канцерогенеза, ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

115478 Москва, Каширское ш., д. 24

E-mail: tonya_alex@yahoo.com

Поступила в редакцию 03.09.08 г.

Окончательный вариант получен 05.12.08 г.

Неизвестно, какие морфологические особенности фибробластов являются существенными для изменения характера их миграции в результате опухолевой трансформации. Мы исследовали изменения распределения и динамики активного края фибробластов мышцы линии 10(3) в результате их трансформации онкогеном *N-RAS^{asp13}* и проанализировали изменения, происходящие в характере клеточного движения. Показано, что трансформация приводит к возрастанию доли активного края и существенному перераспределению псевдоподиальной активности вдоль периметра клетки. В результате трансформации на стабильных боковых участках клеточного периметра, типичных для нормальных фибробластов, часто образуются мелкие псевдоподии, т.е. боковой край перестает быть истинно стабильным. Также обнаружено, что псевдоподиальная активность ведущего края у трансформированных фибробластов выше, чем у нормальных. При этом сразу после стимулирования активность ведущего края одинаково высока как в норме, так и при трансформации, но у нормальных клеток со временем происходит ее подавление, тогда как у трансформированных она остается на постоянно высоком уровне. Указанные особенности приводят к усилению ненаправленной составляющей движения опухолевых клеток и к изменению характера миграции клеток при трансформации.

Ключевые слова: ламеллоподия, активный край, трансформированный фибробласт, актиновый цитоскелет, направленное движение клеток.

Способность к миграции – свойство клеток, существенное для таких жизненно важных процессов, как эмбриональное развитие, заживление ран, развитие иммунного ответа. Эффективность миграции может регулироваться как скоростью, с которой движутся индивидуальные клетки, так и их способностью поддерживать определенное направление движения. Направленная клеточная миграция может быть ответом клетки на внешние сигналы, например, хемотаксис в ответ на действие ростовых факторов или химических аттрактантов. При этом происходит активация малой ГТФазы Ras (Ridley et al., 1992; Edme et al., 2002), что в свою очередь приводит к активации комплекса Agr2/3 и образованию протрузий за счет полимеризации актина (Mullins et al., 1998; Svitkina, Borisy, 1999; Higgs, Pollard, 2001; Goley, Welch, 2006); формированию первичных адгезионных комплексов с субстратом (Rottner et al., 1999) и выдвиганию активного клеточного края в сторону действия хемоаттрактантов. В других случаях направление клеточного движе-

ния может определяться местным подавлением псевдоподиальной активности в ответ на семафорины при участии малой ГТФазы Rho, как это происходит при развитии нейронов (Gallo, Letourneau, 2004; Wu et al., 2005). Однако многие миграционные процессы при эмбриональном развитии и при формировании тканей происходят в отсутствие видимого участия внешних сигналов (Trinkaus, 1969). В таких случаях способность поддерживать направленность движения должна регулироваться внутриклеточными структурами или сигналами.

Показано, что одними из основных клеточных структур, определяющих способность клеток к направленной миграции, являются микротрубочки (Vasiliev et al., 1970). Разрушение микротрубочек с помощью колцемида приводит к полной остановке клеточного движения. При этом наблюдается ослабление псевдоподиальной активности и перераспределение ее вдоль всего периметра клетки (Bershadsky et al., 1991). В недавних исследованиях было показано, что повышение уровня активности малой ГТФазы Ras приводит к появлению дополнительных участков псевдопо-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 08-04-00452а, 05-04-4146а).

диальной активности у движущихся клеток и усилению их ненаправленной миграции (Pankov et al., 2005).

В процессе развития опухоли клетки приобретают способность к инвазии в окружающие ткани. В опытах *in vitro* показано, что опухолевая трансформация приводит к тому, что клетки (и эпителиального, и мезенхимного происхождения) могут более эффективно мигрировать сквозь фильтры, и эта их особенность прямо коррелирует со способностью инвазировать *in vivo*. При этом существенно изменяется морфология клеток, например, у эпителия нарушаются межклеточные контакты, происходит существенная перестройка актинового цитоскелета (Свиткина, Каверина, 1989; Schoenenberger et al., 1991), и клетки от коллективной миграции в составе островков переходят к индивидуальному движению (Friedl, Wolf, 2003). Очевидно, что такие изменения облегчают проникновение клеток через окружающий матрикс и в соседние ткани и увеличивают инвазивные способности эпителиоцитов. Для фибробластов также описаны существенные перестройки, происходящие в результате опухолевой трансформации, – уменьшение степени расплывания клетки, исчезновение крупных актомиозиновых пучков, редукция зрелых фокальных контактов клетки с субстратом (Vasiliev, Gelfand, 1981). Однако до сих пор остается неясным, в какой степени и как морфологические изменения увеличивают способности фибробластов к инвазии. В частности, анализа изменения характера и распределения псевдоподиальной активности у опухолевых клеток не проводилось.

Цель нашей работы – исследование особенностей распределения и описание активного края у трансформированных фибробластов, а также анализ изменений в характере клеточного движения при трансформации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. В работе использовали клетки линий 10(3), являющиеся иммортализованными мышинными фибробластами (Harvey, Levine, 1991), и 10(3)RAS, полученные путем трансфекции исходной линии 10(3) плазмидой с геном конститутивно активного белка N-RAS^{asp13} (любезно предоставлены П.Б. Копниным).

Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, "Sigma", США) с добавлением 5%-ной FCS (Fetal Calve's Serum, "PPA Lab.", Австрия) и антибиотиков (по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина) при температуре 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂.

Иммуноблоттинг. Клетки лизировали при помощи буфера RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay Buffer) (100 мкл на чашку Петри диаметром 6 см), содержащего ингибиторы протеаз, и цен-

трифугировали при 10000 g (4°C). Концентрацию белка в лизате определяли при помощи системы белкового анализа ("Bio-Rad Lab.", США). Затем с 20 мг полученного клеточного лизата проводили электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле с последующим переносом белка на мембрану ("Amersham Biosci.", Великобритания).

Для окраски в качестве первых антител использовали моноклональные мышинные антитела pan-ras ("Oncogene Res. Prod.", Великобритания) и вторые антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой. Сначала производили забивку мембраны обезжиренным молоком. Затем добавляли первые антитела на блокирующем растворе (1–2 мкг/мл) на 2 ч, после чего производили отмывку 0.1%-ным Tween на буфере PBS (Phosphate Buffer Solution). Далее проводили окрашивание вторыми антителами на блокирующем растворе 40 мин на качалке и аналогичную первой отмывку 0.1%-ным Tween на PBS. Проявление производили при помощи растворов Determin ECL Adrance Western Blotting Detection Kit ("American Biosci.", Великобритания): Sol A – Lumigen TMA-6 и Sol B – Lumigen TMA-6 (1 : 1). Полученные результаты отражены в фотографиях.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и микроскопия. Клетки фиксировали 3.7%-ным параформальдегидом на PBS с последующей обработкой 0.5%-ным раствором Тритон X-100 на PBS в течение 3 мин. Для окрашивания F-актина применяли флуоресцентный краситель Alexa Fluor 488 phalloidin ("Molecular Probes", США); для окрашивания фокальных контактов – первые моноклональные антитела, а именно антивинкулин hVIN-1 ("Sigma", США), а в качестве вторых антител использовали антимышинные антитела, меченные родамином (TRITC-anti-mouse, "Sigma", США); для окрашивания субъединицы p34 Arp2/3-комплекса (Actin-related protein 2/3 complex) – поликлональные антитела anti-p34-Arc/ARPC2 ("Upstate", США), а в качестве вторых антител использовали антикроличьи антитела, меченные родамином (TRITC-anti-rabbit IgG (H + L), "Jackson Immuno Res.", Великобритания). Окрашивание ядер производили флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, "Sigma", США).

Препараты заключали в раствор эльванола на PBS и затем исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioplan ("Zeiss", Германия) с масляным объективом Plan-Neofluolar ×100. Микрофотосъемку препаратов осуществляли с использованием цифровой камеры Olympus DP70, Япония с программным обеспечением (DP Controller, "Olympus", Япония).

Прижизненное наблюдение и микрофотосъемка. Стекла с клетками помещали в подогреваемую камеру для прижизненного наблюдения. Микрофотосъемку препаратов осуществляли на

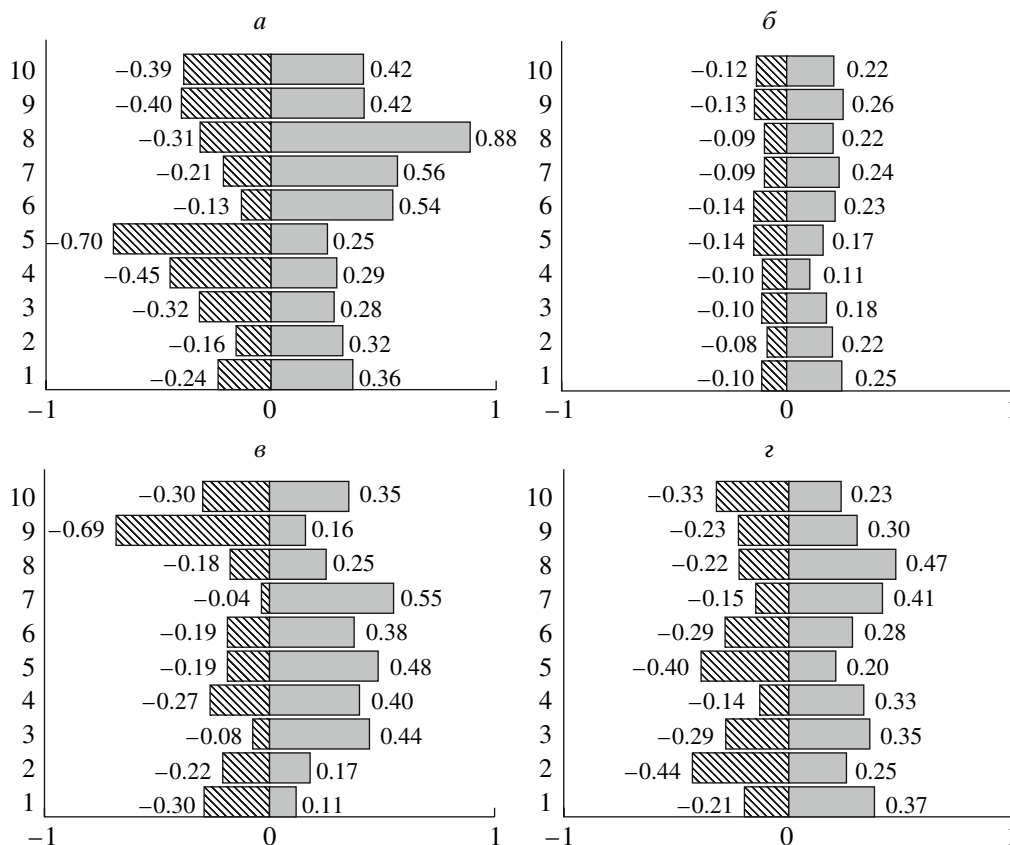


Рис. 1. Активность протрузий (■) и ретракций (▨) на ведущем краю контрольных 10(3) (а, б) и трансформированных 10(3)RAS (в, г) клеток через 2 (а, в) и 24 (б, г) ч после нанесения экспериментальной раны. Каждая строка диаграммы отражает активность изменения ведущего края за 30 с; общее время наблюдений – 5 мин.

микроскопе Axioplan (“Zeiss”, Германия) в режиме DIC (Differential Interference Contrast) с использованием цифровой камеры Hamamatsu (Mode C8484-05G) с программным обеспечением Wasabi (“Hamamatsu Co.”, Япония) в режиме цейтраферной съемки с межкадровым интервалом в 2 с.

Для анализа направленного движения клеток использовали модель экспериментальной раны в культуре. Для этого клетки доращивали до монослоя, после чего наносили рану, т.е. часть монослоя удаляли с помощью бритвы. Через 2 и 24 ч после нанесения раны анализировали *активность ведущего края* у выползающих в рану клеток. Для этого производили съемку отдельных клеток (по 5 клеток для каждой из четырех групп опытов) в течение 5 мин с увеличением объектива $\times 40$ и дополнительным увеличением $\times 2.5$. Данные анализировали по методу, предложенному Бершадским с соавторами (Bershadsky et al., 1991). По результатам измерений строили линейные диаграммы: вправо от оси откладывали активность протрузий, а влево – активность ретракций (приведены со знаком минус). Каждая строка диа-

граммы отражает активность ведущего края за 30 с наблюдения (рис. 1).

Для количественной оценки *морфологических характеристик* (периметра, площади, а также длины и количества участков краевой активности) производили съемку клеток в течение 1 мин с увеличением объектива $\times 40$ и дополнительным увеличением $\times 1.5$ на меченых стеклах (“Bellco Biotechnology”, США). Для этого после нанесения раны и последующей инкубации в течение 24 ч были произвольно выбраны и отсняты одиночные клетки, активно идущие в рану (по 20–22 клетки каждой из двух линий) через 24 ч после нанесения раны. Активными считали участки края, которые изменяли свою форму в течение наблюдения.

Для описания *характера и направления миграции* производили съемку клеток (по 21–26 клеток для каждой из двух линий) в редкой культуре на меченых стеклах. На следующий день после пересадки клетки фотографировали с интервалом в 2 ч, общее время наблюдения составило 8 ч. Кадры одного и того же поля зрения накладывали друг на друга с помощью программы Adobe Photoshop

Таблица 1. Морфометрический анализ изменений, вызванных трансформацией фибробластов 10(3) онкогеном *N-RAS*

Фибробласты	Площадь клеток [#] , мкм ²	Периметр клеток, мкм	Общая длина активного края, мкм	Доля активного края ^{*:#}	Количество участков активности
10(3)	1733.4 ± 92.7	275.1 ± 14.8	126.4 ± 13.0	0.44 ± 0.03	1–5 (в среднем 3.3)
10(3)RAS	1078.5 ± 98.1	238.1 ± 19.0	151.3 ± 11.4	0.65 ± 0.03	3–11 (в среднем 4.9)

Примечания. Здесь и в табл. 2: * доля активного края – отношение общей длины активного края к периметру клетки; [#] параметры, достоверно отличающиеся для нормальных и трансформированных клеток ($p < 0.05$).

(“Adobe”, США), таким образом мы получали путь, пройденный клеткой за 8 ч (трек). По трекам был измерен общий путь и расстояние от начальной точки движения до конечной – прямолинейное движение. Для обработки всех полученных результатов использовали программу Simple PCI (“Hamamatsu Co.”, Япония).

Анализ миграции клеток в экспериментальную рану. Для количественной оценки клеточной миграции было подсчитано число клеток, вышедших в рану за 1 сут и расстояние их выполнения на участке в 1000 мкм (и для нормальных, и для трансформированных клеток представлены результаты пяти измерений). Для этого один и тот же участок фотографировали два раза: сразу после нанесения раны и после инкубации в течение 1 сут, фиксации и окраски флуоресцентным красителем DAPI. Съемку производили на инвертированном микроскопе Axiovert 200 (“Zeiss”, Германия) при помощи камеры Axio Cam MRc с увеличением объектива ×10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологические изменения, вызываемые трансфекцией онкогеном N-RAS^{asp13}. Одношаговая моноонкогенная трансфекция фибробластов мыши линии 10(3) онкогеном *N-RAS* приводит к существенному изменению морфологии клеток, их цитоскелета и адгезионных контактов, а также к появлению признаков, типичных для трансформированных клеток. В отличие от контрольных 10(3) трансформированные клетки 10(3)RAS имеют значительно редуцированную систему пучков актиновых микрофиламентов, адгезионные контакты этих клеток представлены фокальными комплексами – мелкими точечными структурами, расположенными вдоль края клетки. Крупные зрелые фокальные контакты, типичные для контрольных клеток, у трансформи-

рованных клеток отсутствуют совсем (рис. 2). Площадь направленно двигающихся контрольных клеток больше, чем у трансформированных (табл. 1). Эти результаты соответствуют полученным в предыдущих работах (Минина и др., 2003; Alexandrova et al., 1993; Kharitonova et al., 2007) и служат доказательством того, что в используемой клеточной системе трансфекция геном *N-RAS* приводит к ярко выраженной морфологической трансформации фибробластов.

Изменение распределения краевой активности у фибробластов, трансформированных онкогеном N-RAS^{asp13}. Чтобы проанализировать распределение краевой активности у нормальных и трансформированных, направленно двигающихся фибробластов, мы исследовали клетки, выползающие в экспериментальную рану. Как контрольные, так и трансформированные фибробласты выползали как индивидуальные клетки. Для анализа мы использовали одиночные клетки, не образующие контактов с соседними. На основании видеоматериалов мы анализировали распределение активных и неактивных участков периметра у нормальных и трансформированных клеток. При подсчете количества и длины активных участков (см. “Материал и методику”) было показано, что у контрольных клеток активный край занимает в среднем $44 \pm 3\%$ периметра (табл. 1). Всего встречается от 1 до 5 участков активности, при этом основная активность сосредоточена на ведущем краю (1–2 ведущие ламеллы), возможно наличие маленького активного участка на хвостовом отростке или, реже, на боковой поверхности клетки. У контрольных клеток четко выражены протяженные стабильные участки по бокам.

У *N-RAS*-трансформированных клеток активный край занимает в среднем $65 \pm 3\%$ клеточного края, его распределение существенно отличается

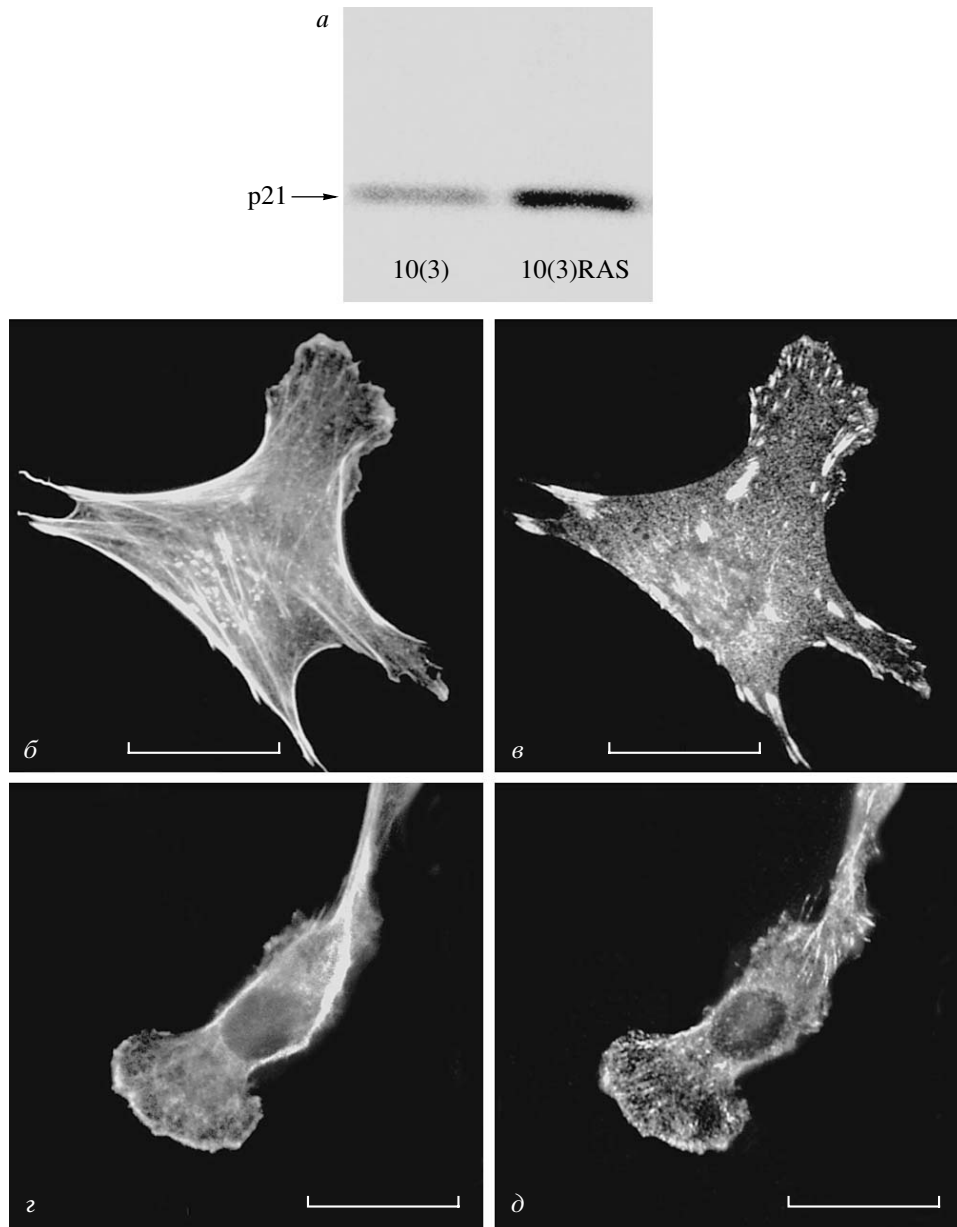


Рис. 2. Изменение цитоскелета фибробластов в результате трансформации: *a* – иммуноблоттинг, демонстрирующий повышение уровня экспрессии *N-RAS^{asp13}* при трансформации; *b*, *c* – иммунофлуоресцентное окрашивание соответственно клеток 10(3) и 10(3)RAS меченым фаллоидином; *d*, *e* – то же антителами к винкулину. У контрольной 10(3) клетки (*b*, *c*) ярко выражены пучки актиновых микрофиламентов, точечные фокальные комплексы и зрелые фокальные контакты; у трансформированной (*d*, *e*) актиновые пучки значительно редуцированы, зрелых фокальных контактов нет, сохраняются лишь точечные фокальные комплексы. Масштаб здесь и на рис. 3, 4: 40 мкм.

от такового у контрольных клеток. Ламелла на ведущем краю, как правило, небольшая, но общее количество активных участков больше, чем у нормальных клеток (от 3 до 11, в среднем – 4,9; табл. 1), часть из них расположена на боковых краях, внешне кажущихся стабильными. Надо отметить, что при длительном наблюдении (1 ч) стабильные края нормальных клеток так и остаются

стабильными, а у трансформированных клеток на внешне стабильном краю часто возникают мелкие протрузии (рис. 3).

Еще одним способом исследования распределения краевой активности фибробластов было иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к p34 – одному из белков, входящих в состав комплекса Arp 2/3. Известно, что комплекс

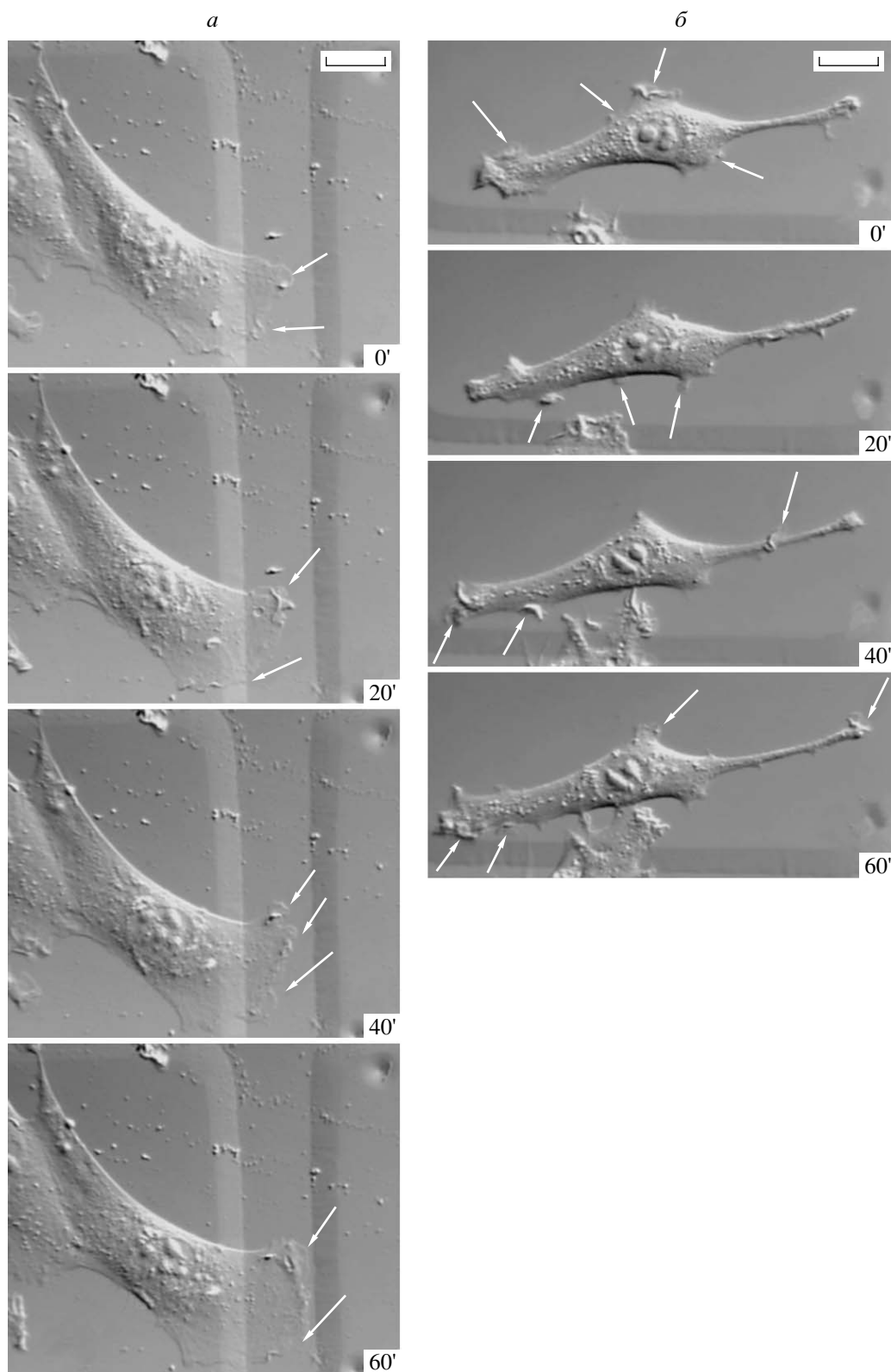


Рис. 3. Формирование активного края у контрольных 10(3) (а) и трансформированных 10(3)RAS (б) клеток в течение 1 ч. (→) – места образования новых протрузий.

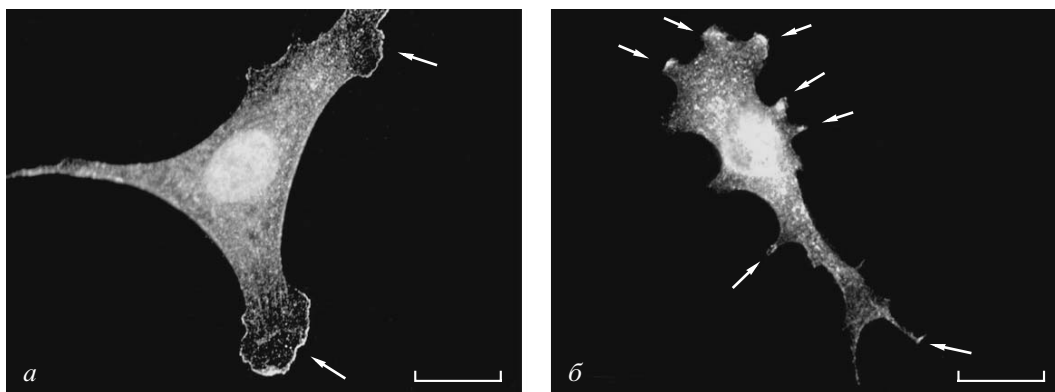


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание контрольной 10(3) (а) и трансформированной 10(3)RAS (б) клеток антителами к комплексу Agr2/3. Яркое свечение кромки края (→) соответствует протрузиям на активных участках края; у контрольной клетки они сконцентрированы лишь на двух ведущих участках, а у трансформированной распределены по всему периметру.

Agr 2/3 участвует в полимеризации актиновых филаментов на краю клетки, и поэтому может служить маркером протрузий, т.е. участков, где происходит активная полимеризация актина (Welch et al., 1997; Svitkina, Borisy, 1999). В контрольных клетках при окраске этими антителами виден яркий ободок свечения на самой кромке ведущей ламеллы, тогда как боковые края клетки не окрашены (рис. 4, а). При *N-RAS*-трансформации свечение кромки края было более прерывистым, наблюдались небольшие участки светящегося края, разбросанные по всему периметру клетки (рис. 4, б).

Изменение активности ведущего края фибробластов в результате N-RAS^{asp13}-трансформации. Кроме анализа распределения активного края вдоль периметра клетки, мы также исследовали изменение характера псевдоподиальной активности на ведущем краю клетки в результате *N-RAS*-трансформации. Для этого мы на основе анализа 5-минутных видеофильмов измеряли скорости протрузий и ретракций у фибробластов, выползающих в экспериментальную рану через 2 и 24 ч после ее нанесения (см. “Материал и мето-

дику”). На схеме (рис. 1) приведены диаграммы псевдоподиальной активности типичных клеток (по одной из каждой группы), а в таблице 2 суммированы средние скорости протрузии и ретракции на ведущем краю клеток. Из полученных результатов видно, что через 2 ч после нанесения раны как нормальные, так и трансформированные клетки обладают высокой псевдоподиальной активностью. У нормальных клеток сразу после их активации, вызванной нанесением раны, псевдоподиальная активность даже слегка выше, чем у трансформированных, при этом скорость протрузий в обоих случаях незначительно превышает таковую ретракций (табл. 2). После 24 ч ситуация изменяется. Активность контрольных клеток 10(3) существенно снижается: в два раза относительно протрузий и в четыре – в отношении ретракций. Активность клеток 10(3)RAS остается примерно на прежнем уровне, снижение незначительное (в 1.1 раза в отношении протрузий и в 1.3 раза в отношении ретракций). Таким образом, псевдоподиальная активность нормальных и трансформированных фибробластов сразу после активации, вызванной нанесением раны, не различается, но у нормальных клеток со временем наблюдается подавление этой активности, тогда как псевдоподиальная активность трансформированных клеток все время находится на стабильно высоком уровне.

Таблица 2. Средние скорости протрузий и ретракций активного края клеток 10(3) и 10(3)RAS при движении в рану

Время после нанесения раны, ч	Скорость, мкм/мин	
	протрузий	ретракций
	10(3)	
2	0.70 ± 0.10	0.88 ± 0.08
24	0.34 ± 0.02 [#]	0.22 ± 0.02 [#]
	10(3)RAS	
2	0.64 ± 0.07	0.56 ± 0.05
24	0.56 ± 0.07 [#]	0.44 ± 0.06 [#]

Изменение характера миграции клеток в результате N-RAS^{asp13}-трансформации. Для более точного анализа характера миграции клеток использовали две разные экспериментальные системы для исследования движения фибробластов: стандартный метод подсчета клеток, выползших из монослоя в экспериментальную рану (рис. 5), и исследование траекторий движения одиночных клеток на поверхности стекла в течение 8 ч (рис. 6).

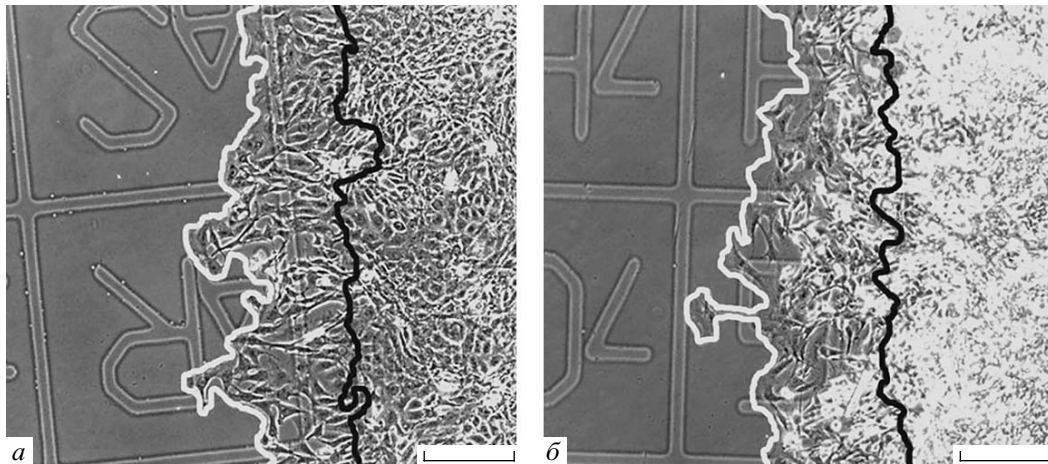


Рис. 5. Миграция контрольных 10(3) (а) и трансформированных 10(3)RAS (б) клеток в экспериментальную рану. Черная линия – граница клеток сразу после нанесения раны, белая – через 24 ч последующего культивирования. Масштаб: 200 мкм.

Миграция клеток в экспериментальную рану за 24 ч выглядит следующим образом.

Клетки	Количество клеток (ядер), выползших в рану	Расстояние, пройденное клетками, мкм
10(3)	157.0 ± 26.3*	24.2 ± 1.4
10(3)RAS	590.0 ± 70.2*	31.5 ± 1.7

* Параметры, достоверно различающиеся у нормальных и трансформированных клеток ($p < 0.05$).

Видно, что, согласно оценке подвижности клеток по их выползанию в рану, трансформированные клетки оказываются гораздо более активными. Однако этот метод имеет целый ряд недостатков. Увеличение числа выползших в рану клеток может происходить не только за счет их способности к направленному движению по субстрату, но и может объясняться более активным делением трансформированных клеток и их способностью организовывать более плотный монослой, благодаря тому что размеры трансформированных клеток существенно меньше. Кроме того, трансформированные клетки могут напозать друг на друга и формировать многослойные структуры, поэтому мы также оценивали способность клеток к направленному движению, анализируя траектории движения одиночных клеток в редкой культуре в течение 8 ч.

Клетки	Общий путь, мкм	Средняя скорость, мкм/ч	Прямолинейное расстояние, мкм
10(3)	43.6 ± 3.7	5.5	35.1 ± 3.7
10(3)RAS	57.2 ± 6.5	7.1	36.9 ± 5.4

Из данных, приведенных выше, видно, что при движении одиночных клеток на подложке скорость движения *N-RAS*-трансформированных клеток выше, чем у нормальных, и соответственно за 8 ч они проползают большее расстояние.

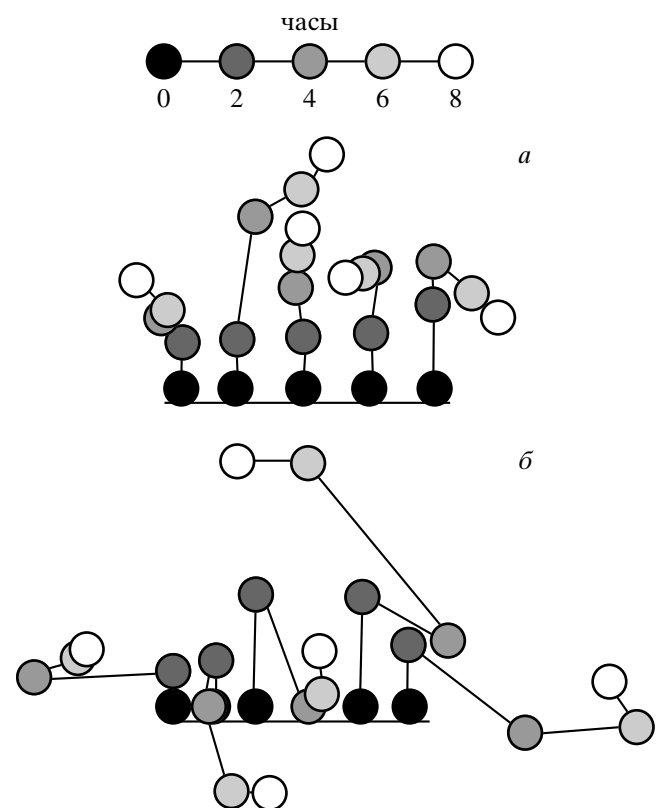


Рис. 6. Траектории движения одиночных контрольных 10(3) (а) и трансформированных 10(3)RAS (б) клеток в редкой культуре.

Однако прямолинейное расстояние (расстояние, пройденное клетками от начальной точки движения до конечной) оказывается одинаковым и для нормальных, и для трансформированных клеток. При анализе траекторий движения клеток (рис. 6) видно, что если для нормальных фибробластов даже в отсутствие специального стимула характерно направленное движение, то трансформированные клетки легко меняют направление.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования распределения и особенностей активного края у трансформированных клеток и анализа изменений характера клеточного движения при трансформации мы выбрали клеточную систему, в которой трансфекция фибробластов одним геном приводит к ярко выраженной морфологической трансформации. При этом проявляются такие признаки трансформации, как редукция пучков актиновых филаментов и уменьшение количества зрелых фокальных контактов, что типично для разных линий (Gelfand, 1981; Lombardi et al., 1990). Также площадь проекции 10(3)RAS на субстрат уменьшается на 35–38% по сравнению с контролем 10(3), что подтверждает ранее полученные результаты (Минина и др., 2003; Alexandrova et al., 1993; Kharitonova et al., 2007) и доказывает эффективность морфологической трансформации этих клеток.

В настоящей работе показано, что у клеток с выраженными признаками морфологической трансформации, вызванной онкогеном *N-RAS*, достоверно возрастает доля активного края по отношению к общему периметру клетки (с 44 до 66%), увеличивается количество активных участков, в частности на боковых клеточных краях. Таким образом, трансформация онкогеном *N-RAS* приводит к перераспределению и увеличению общей протяженности краевых участков с выраженной псевдоподиальной активностью, а также к нарушению стабильности боковых краев у мигрирующих трансформированных фибробластов. Механизмы этого явления остаются неясными. 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 актомиозинового 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. Кроме того, показано, что усиленная экспрессия *N-RAS* приводит к увеличению количества дефосфорилированного кофилина (Chan et al., 2000; DesMarais et al., 2005), который в свою очередь может разрезать актиновые филаменты в составе кра-

евых пучков, высвобождая свободные плюс-концы, на которых может осуществляться полимеризация новых филаментов, приводящая к образованию новых протрузий.

Еще одной задачей работы было сравнительное исследование характера псевдоподиальной активности на ведущем краю нормальных и трансформированных клеток. Измерения скорости протрузий и ретракций у клеток, выползающих в экспериментальную рану, показали, что через 2 ч после нанесения раны псевдоподиальная активность на ведущем краю одинаково высока и у нормальных, и у трансформированных клеток. Однако через 24 ч скорость и протрузий, и ретракций у нормальных клеток существенно снижается (в два и четыре раза соответственно), тогда как у трансформированных клеток псевдоподиальная активность остается практически на прежнем уровне. Мы предлагаем возможную схему активации метаболических путей при движении нормальных и трансформированных фибробластов (рис. 7). Сразу после нанесения раны и высвобождения свободного клеточного края происходит активация клетки в результате снятия контактного торможения движения клеток в монослое (Abercrombie, 1970). Механизмы этого явления неизвестны. Однако очевидно, что на вновь образовавшемся свободном краю клетки происходит формирование новых фокальных контактов, что в свою очередь приводит к повышению активности малой ГТФазы Ras (Price et al., 1998; Del Pozo et al., 2000; Arthur et al., 2002), которая тоже активирует белки WAVE, обеспечивающие Atp2/3-опосредованную полимеризацию актина и образование протрузий (Ridley et al., 1992; Ridley, 2001; Burridge, Wennerberg, 2004). Эти регуляторные пути приводят к усилению псевдоподиальной активности и у нормальных, и у трансформированных клеток. Помимо этого ГТФаза Ras активирует p65PAK (p65 protein activating kinase), которая фосфорилирует и активирует LIMK (LIM domain kinase), осуществляющую фосфорилирование кофилина. Фосфорилированный кофилин утрачивает способность разрезать актиновые микрофиламенты, создавая свободные плюс-концы (Arthur et al., 2002). Этот путь может приводить к ингибированию полимеризации новых актиновых филаментов на ведущем краю клетки и тем самым к снижению псевдоподиальной активности у контрольных клеток через 24 ч после нанесения раны.

У *N-RAS*-трансформированных клеток постоянно высокий уровень псевдоподиальной активности скорее всего обусловлен тем, что активированный белок Ras, во-первых, способен связываться с PI3K (phosphoinositol-3-kinase) и запускать путь активации Ras, действующего по такому же механизму, как и в нормальных клетках, но на постоянно высоком уровне; а во-вторых, как уже было сказано выше, приводит к увеличению содержания дефосфо-

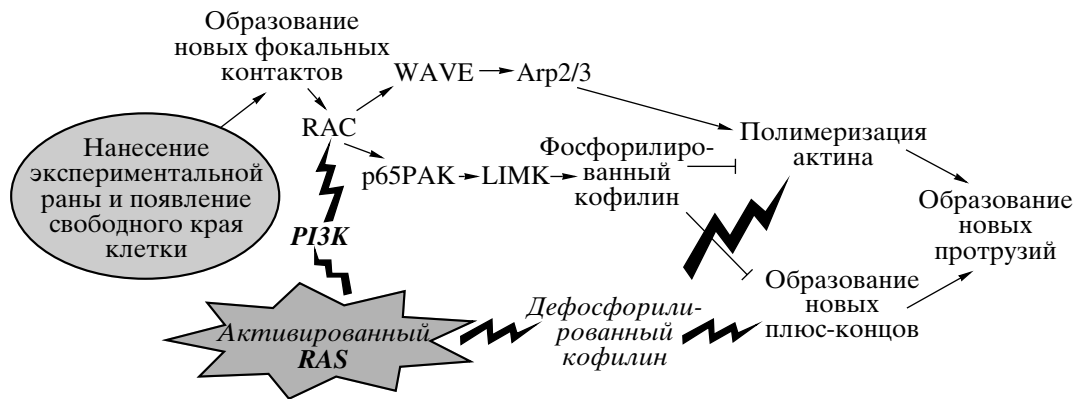


Рис. 7. Метаболические пути, регулирующие псевдоподиальную активность на ведущем краю клетки. (■) – первичные стимулы, приводящие к активации регуляторных путей; (—) – метаболические пути, работающие в нормальных клетках; (⚡) – дополнительная активация при *N-RAS*-трансформации, вызванная постоянно высоким уровнем белка Ras (стабильно высокий уровень Ras маскирует обратную регуляцию, приводящую к снижению псевдоподиальной активности у нормальных клеток).

рилированного (активного) кофилина (Chan et al., 2000; DesMarais et al., 2005). Активация кофилина в свою очередь индуцирует деполимеризацию, что ускоряет обмен актина на ведущем краю клетки и приводит к усилению разрезания микрофиламентов в составе пучков, а также к появлению дополнительных плюс-концов и соответственно к обеспечению возможности для полимеризации актина (DesMarais et al., 2005).

Таким образом, разница в скорости протрузий и ретракций у нормальных и трансформированных клеток может объясняться нарушением обратной регуляции псевдоподиальной активности, вызванным постоянной гиперактивацией белка Ras у трансформированных клеток.

Еще одной задачей работы был анализ характера клеточного движения нормальных и *N-RAS*-трансформированных клеток. Поскольку направленное движение клеток – сложный процесс, в котором играют роль многие факторы, мы оценивали способность клеток к миграции двумя разными независимыми способами. Одним из широко распространенных методов оценки клеточной подвижности является миграция клеток в экспериментальную рану. При оценке таким способом показано, что в результате трансформации число выползающих в рану клеток возрастает почти в 4 раза и они проползают расстояние в 1.3 раза большее, чем контрольные клетки (см. выше). Однако, несмотря на широкое распространение, 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. Во-вторых, в конфлюэнтной культуре густота

нормальных и трансформированных клеток различается благодаря тому, что у трансформированных клеток отсутствует контактное торможение пролиферации. Оба эти фактора могут оказывать существенное влияние на полученный результат. Поэтому дополнительно мы оценивали подвижность клеток вторым независимым способом – по перемещению клеточных ядер 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. При этом оказалось, что и нормальные, и трансформированные клетки переместились на одно и то же расстояние, но при этом скорость движения трансформированных клеток была выше, они чаще меняли направление движения и общий путь, пройденный трансформированными клетками, был больше (рис. 6).

Таким образом, выявленные нами морфологические отличия нормальных и *N-RAS*-трансформированных клеток, а именно: возрастание псевдоподиальной активности на ведущем краю трансформированных клеток, перераспределение активности вдоль клеточного периметра и (возможно, самое существенное) нарушение стабильности боковых краев при трансформации – приводят к изменению характера клеточного движения. Движение трансформированных клеток ускоряется, но становится более ненаправленным. Возможно, при миграции *in vivo* именно эти особенности дают возможность опухолевым клеткам находить “оптимальный” путь для инвазии.

Авторы выражают благодарность П.Б. Копнину за предоставление клеток 10(3)Ras и Ю.М. Васу-

леву за продуктивную дискуссию и высказанные критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Минина С.А., Александрова А.Ю., Васильев Ю.М. Изменения формы клеток и актинового цитоскелета при трансформации, вызванной онкогеном RAS: возможная роль Rho-киназы // Докл. АН. 2003. Т. 388. № 3. С. 1–3.
- Свиткина Т.М., Каверина И.Н. Нарушения актинового цитоскелета в трансформированных эпителиальных клетках // Цитология. 1989. Т. XXXI. С. 1441–1447.
- Abercrombie M. Contact inhibition in tissue culture // *In vitro*. 1970. V. 6. P. 128–142.
- Alexandrova A.Y., Dugina V.B., Paterson H. et al. Motility of intracellular particles in rat fibroblasts is greatly enhanced by phorbol ester and by over-expression of normal p21N-ras // *Cell Motil. Cytoskel.* 1993. V. 25. № 3 P. 254–266.
- Arthur W.T., Noren N.K., Burridge K. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion // *Biol. Res.* 2002. V. 35. № 2. P. 239–246.
- Bershadsky A.D., Vaisberg E.A., Vasiliev J.M. Pseudopodial activity at the active edge of migrating fibroblast is decreased after drug-induced microtubule depolymerization // *Cell. Motil. Cytoskel.* 1991. V. 19. № 3. P. 152–158.
- Burridge K., Wennerberg K. Rho and Rac take center stage // *Cell*. 2004. V. 116. № 2. P. 167–179.
- Chan A.Y., Bailly M., Zebda N. et al. Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion // *J. Cell Biol.* 2000. V. 148. № 3. P. 531–542.
- Del Pozo M.A., Price L.S., Alderson N.B. et al. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 9. P. 2008–2014.
- DesMarais V., Ghosh M., Eddy R. et al. Cofilin takes the lead // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. № 1. P. 19–26.
- Edme N., Downward J., Thiery J.P. et al. Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways // *Ibid.* 2002. V. 115. № 12. P. 2591–2601.
- Friedl P., Wolf K. Tumor-cell invasion and escape mechanisms // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. № 5. P. 362–374.
- Gallo G., Letourneau P.C. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues // *J. Neurobiol.* 2004. V. 58. № 1. P. 92–102.
- Goley E.D., Welch M.D. The Arp2/3 complex: an actin nucleator comes of age // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 7. № 10. P. 713–726.
- Harvey D.M., Levine A.J. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts // *Genes Devel.* 1991. V. 5. № 12B. P. 2375–2385.
- Higgs H.N., Pollard T.D. Regulation of actin filament network formation through Arp2/3 complex: activation by a diverse array of proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 649–667.
- Kharitonova M.A., Kopnin P.B., Vasiliev J.M. Transformation by RAS oncogene decreases the width of substrate-spread fibroblasts but not their length // *Cell Biol. Int.* 2007. V. 31. № 3. P. 220–223.
- Lombardi L., Ballinari D., Bongarzone I. et al. Ultrastructural cytoskeleton alterations and modification of actin expression in the NIH/3T3 cell line after transformation with Ha-ras-activated oncogene // *Cell Motil. Cytoskel.* 1990. V. 15. № 4. P. 220–229.
- Mullins R.D., Heuser J.A., Pollard T.D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. V. 95. № 11. P. 6181–6186.
- Pankov R., Endo Y., Even-Ram S. et al. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration // *J. Cell Biol.* 2005. V. 170. № 5. P. 793–802.
- Pollack R., Osborn M., Weber K. Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. № 3. P. 994–998.
- Price L.S., Leng J., Schwartz M.A. et al. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading // *Mol. Biol. Cell.* 1998. V. 9. № 7. P. 1863–1871.
- Ridley A.J. Rho family proteins: coordinating cell responses // *Trends Cell Biol.* 2001. V. 11. № 12. P. 471–477.
- Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L. et al. The small GTP-binding protein Rac regulates growth-factor induced membrane ruffling // *Cell.* 1992. V. 70. № 3. P. 401–410.
- Rottner K., Hall A., Small J.V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics // *Curr. Biol.* 1999. V. 9. № 12. P. 640–648.
- Schoenenberger C.A., Zuk A., Kendall D. et al. Multilayering and loss of apical polarity in MDCK cells transformed with viral K-ras // *J. Cell Biol.* 1991. V. 112. № 5. P. 873–889.
- Shutova M.S., Alexandrova A.Y., Vasiliev J.M. Regulation of polarity in cells devoid of actin bundle system after treatment with inhibitors of myosin II activity // *Cell Motil. Cytoskel.* 2008. V. 65. № 9. P. 734–746.
- Svitkina T.M., Borisy G.G. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia // *J. Cell Biol.* 1999. V. 145. № 5. P. 1009–1026.
- Trinkaus J.P. Cells into organs: The forces that shape the embryo. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1969. 237 p.
- Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Neoplastic and normal cells in culture. Cambridge: Univer. Press, 1981. 325 p.
- Vasiliev J.M., Gelfand I.M., Domnina L.V. et al. Effect of colcemid on the locomotory behavior of fibroblasts // *J. Embriol. Exp. Morphol.* 1970. V. 24. № 3. P. 625–640.
- Welch M.D., DePace A.H., Verma S. et al. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly // *J. Cell Biol.* 1997. V. 138. № 2. P. 375–384.
- Wu K.Y., Hengst U., Cox L.J. et al. Local translation of RhoA regulates growth cone collapse // *Nature.* 2005. V. 436. № 18. P. 1020–1024.

Analysis of Changes Induced by Oncogene *N-RAS* Expression in Pattern and Distribution of Pseudopodial Activity of Fibroblasts

M. E. Lomakina and A. Y. Alexandrova

*Institute of Carcinogenesis, Blokhin Cancer Research Center, Kashirskoye shosse 24, Moscow, 115478 Russia
e-mail: tonya_alex@yahoo.com*

Abstract—It is not known which morphological properties of fibroblasts induced by malignant transformation modulate their migration pattern. We studied the changes in the distribution and dynamics of the leading edge of 10(3) mouse fibroblasts after their transformation by oncogene *N-RAS^{asp13}* and analyzed the changes in the pattern of cell migration. Transformation proved to increase the leading edge proportion and to considerably redistribute pseudopodial activity along the cell edge. As the result of transformation, small pseudopodia are formed in the stable lateral regions of the cell edge typical of normal fibroblasts, i.e., the lateral edge is no more truly stable. In addition, pseudopodial activity of the leading edge in transformed fibroblasts proved higher compared to normal ones. It is necessary to notice, the leading edge activity is equally high immediately after induction in both normal and transformed fibroblasts; although, it is suppressed with time in normal cells but not in transformed ones where it remains steadily high. These properties promote the random component of malignant cell motility and modify the cell migration pattern after transformation.

Key words: lamellipodium, leading edge, transformed fibroblasts, actin cytoskeleton, directional cell migration.