

УДК 576.385.5

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ, МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ IAR-2, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНОМ RAS: ВКЛАД БЕЛКА МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ E-КАДХЕРИНА

© 2011 г. И. Ю. Житняк, Н. А. Глушанкова

НИИ канцерогенеза, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478 Москва Каширское ш., д. 24

E-mail: natglu@hotmail.com

Поступила в редакцию 09.09.2010 г.  
Окончательный вариант получен 16.12.2010 г.

Разрушение стабильной межклеточной адгезии и приобретение способности к миграции являются закономерными этапами неопластической эволюции опухолевых клеток эпителиального происхождения. В работе были исследованы морфологические и миграционные характеристики эпителиоцитов клонов IAR1162 и IAR1170, полученных из смешанной культуры трансформированных онкогеном N-RasV12 клеток линии IAR-2. Было обнаружено, что мутантный онкоген RAS может вызвать два типа морфологических изменений эпителиоцитов IAR-2. Клетки одного типа (клоны IAR1162) прошли эпителиально-мезенхимальный переход: утратили экспрессию E-кадгерина, приобрели фибробластоподобную морфологию, не образовывали плотные контакты. Клетки другого типа (клоны IAR1170) сохранили морфологию, близкую к морфологии нетрансформированных предшественников, образовывали межклеточные E-кадгерин-содержащие адгезионные контакты и плотные контакты, формировали монослой в конфлуэнтной культуре. Вместе с тем, как в клетках IAR1162, так и в клетках IAR1170 мутантный онкоген RAS вызывал разрушение краевого актинового пучка и реорганизацию межклеточных адгезионных контактов. Трансформированные эпителиоциты IAR1162 и IAR1170 приобрели способность мигрировать по плоскому субстрату, а также через узкие поры в мембранах миграционных камер. Видеомикроскопические исследования культур трансформированных эпителиоцитов продемонстрировали нестабильность межклеточных контактов и независимый характер миграции клеток. Эпителиоциты IAR1170, имеющие E-кадгерин-содержащие АК, были также способны перемещаться в составе группы (коллективная миграция). Клетки IAR1162D3, утратившие в результате Ras-трансформации экспрессию эндогенного E-кадгерина, были трансфицированы плазмидой, несущей ген CDH1, и в результате трансфекции были получены клоны клеток с различным уровнем экспрессии экзогенного E-кадгерина. Высокий уровень экспрессии экзогенного E-кадгерина в трансформированных эпителиоцитах приводил к снижению скорости миграции на двумерном субстрате клеток, находящихся в контакте с соседними клетками, практически не влияя на миграцию одиночных клеток, но, вместе с тем, увеличивал количество клеток, мигрировавших через поры в миграционных камерах. Таким образом, разрушение краевого актинового пучка и изменение пространственной организации межклеточных адгезионных контактов, несмотря на наличие или отсутствие в них E-кадгерина, сопровождается разрушением стабильной межклеточной адгезии и появлением локомоторной активности у Ras-трансформированных эпителиоцитов. Сохранение E-кадгерина в межклеточных адгезионных контактах влияет на локомоторную активность трансформированных эпителиоцитов и играет важную роль в их коллективной миграции.

**Ключевые слова:** трансформированные эпителиоциты, актиновый цитоскелет, межклеточные контакты, E-кадгерин, миграция.

Инвазия и метастазирование клеток из первичной опухоли являются ключевыми моментами опухолевой прогрессии. Нарушения межклеточной адгезии при трансформации играют существенную роль в развитии инвазивного потенциала опухолевых клеток. В настоящее время общепринятой точкой зрения является представление о том, что программа эпителиально-мезенхи-

мального перехода (ЭМП), при котором дифференцированные эпителиальные клетки превращаются в фибробластоподобные клетки, способные к миграции, является основным механизмом эволюции клеток карцином (Thiery, 2002; Askland et al., 2003). В ходе ЭМП происходит разрушение стабильной межклеточной адгезии, главным образом, за счет угнетения экспрессии

или аккумуляции на мембране E-кадгерина, при этом эпителиальные клетки начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры (N-кадгерин, фибронектин, виментин) (Rosivatz et al., 2002; Yang et al., 2004; Wheelock et al., 2007; Thiery et al., 2009).

Угнетение экспрессии E-кадгерина и связанное с этим разрушение межклеточной адгезии часто рассматривается как пусковой механизм инвазии и диссеминации опухолевых клеток (Perl et al., 1998; Brabietz et al., 2001; Prall, 2007). Вместе с тем хорошо известно, что ряд карцином человека, в частности протоковые карциномы молочной железы, карциномы толстой кишки, меланомы могут сохранять экспрессию E-кадгерина (Nabeshima et al., 1999; Gillett et al., 2001; Hegerfeldt et al., 2002). Показано также, что опухолевые клетки способны к миграции и инвазии и в отсутствие ЭМП, что свидетельствует о возможности существования механизмов запуска инвазии, не связанных с угнетением экспрессии и аккумуляции на мембране E-кадгерина (Tarin et al., 2005; Wicki et al., 2006; Wolf et al., 2007).

Ранее мы обнаружили, что неопластическая трансформация эпителиальных клеток может приводить к исчезновению типичного для эпителиоцитов краевого актинового пучка и реорганизации межклеточных E-кадгерин-содержащих адгезионных контактов (АК), разрушающих стабильную межклеточную адгезию (Ayollo et al., 2009). Вместе с тем, до сих пор оставалось неясным, как влияет сохранение в клетках экспрессии главной молекулы межклеточной адгезии E-кадгерина на морфологические и миграционные характеристики трансформированных эпителиоцитов.

Целью данной работы было сравнительное исследование морфологии, межклеточных взаимодействий и миграционной активности Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR1162, утративших экспрессию E-кадгерина, и Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR1170, сохранивших экспрессию E-кадгерина.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клеточные культуры.** В работе была использована постоянная линия нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2, полученная из экспланта печени крысы (Montesano et al., 1975). Линии эпителиальных клеток, трансформированные онкогеном N-RAS, были получены путем инфекции кДНК мутантного гена человека N-RasV12 в составе вириона ретровируса (pPS/hygro) в клетки исходной линии IAR-2, с отбором трансформантов в среде с гигромицином (200 мкг/мл) (Glushankova et al., 1994) с последующим клонированием. Были получены клоны Ras-трансформирован-

ных эпителиоцитов IAR1170: 1170D6, 1170D11, 1170F9, 1170H5, 1170D12, имевших морфологию, близкую к морфологии нетрансформированных эпителиоцитов, а также клоны Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR1162: 1162D3, 1162F4, клетки которых имели вытянутую, фибробластоподобную морфологию. Клетки клона 1162D3 были трансфицированы плазмидой VIEswt, несущей кДНК гена *CDH1* (E-кадгерин). В результате клонирования были получены клоны 1162D3-E17, 1162D3-EK2, 1162D3-EP8, 1162D3-EM5, 1162D3-EJ7, различающиеся по уровню экспрессии экзогенного E-кадгерина.

**Культивирование клеток.** Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, США) с добавлением 7.5% эмбриональной телячьей сыворотки (PPA Lab., Австрия) и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, 100 ед/мл) при температуре 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Линии, трансфицированные плазмидой VIEswt, культивировали в среде с добавлением G-418 (1 мг/мл) (Sigma, США).

**Клонирование клеток.** Клетки снимали с подложки 0.1% трипсином на растворе Версена. Исходя из концентрации клеток в суспензии, производили серию разведений до концентрации клеток 10 кл/мл и раскапывали по 100 мкл в лунки 96-луночной плашки. Выросшие колонии пересаживали в 12-луночные плашки, после чего подросшие клоны окрашивали на E-кадгерин и отбирали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии.

**Трансфекция клеток.** Трансфекция плазмидой VIEswt производилась на 20-часовой редкой культуре клеток в чашках Петри с помощью Lipofectamine™ LTX и Plus™ Reagent (Invitrogen, США). Через 2 суток в среду на 2 недели добавляли селективирующий агент G-418. Для выявления эффективных трансфектантов было использовано иммунофлуоресцентное окрашивание E-кадгерина. В результате клонирования смешанной культуры были получены клоны, в клетках которых в присутствии G-418 стабильно экспрессировался экзогенный E-кадгерин.

**Фиксация клеток.** Для флуоресцентного окрашивания актиновых филаментов клетки фиксировали 3.7% раствором параформальдегида на PBS (фосфатный буфер, pH 7.2) в течение 10 мин, отмывали и обрабатывали 0.5% раствором Triton X-100 (Sigma, США) на PBS в течение 3 мин. Для иммунофлуоресцентного окрашивания белков межклеточных контактов (E-, N-кадгерина, окклюдина) применяли фиксацию метанол-ацетоном (1 : 1) в течение 10 мин при -20°C.

**Иммунофлуоресцентное окрашивание и микроскопия.** В качестве первичных антител в работе использовали моноклональные мышинные анти-

тела к E-кадгерину, N-кадгерину (BD, Transduction Laboratories, США), окклюдину (Invitrogen, Zymed, США). В качестве вторичных антител использовали моноклональные антитела к IgG мыши, меченные родамином (Jackson ImmunoResearch, США), или меченные AlexaGreen<sup>488</sup> (Invitrogen, Molecular Probes, США). Для окраски актина использовался фаллоидин, меченный родамином (Sigma, США), или AlexaGreen<sup>488</sup>-фаллоидин (Invitrogen, Molecular Probes, США). Фиксированные клетки на покровных стеклах помещали в раствор первичных антител на PBS и инкубировали в течение 40 мин, после чего отмывали PBS и окрашивали вторичными антителами. Препараты заключали в раствор поливинилового спирта (Sigma, США) на PBS и исследовали с помощью флуоресцентных микроскопов AxioPlan (Zeiss, Германия) или Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония). Фотосъемку препаратов осуществляли с помощью цифровых камер Olympus DP70 с программным обеспечением DP Controller (Olympus, Япония) и Hamamatsu с программным обеспечением NIS-Elements AR (Nikon, Япония).

**Морфометрия.** Полученные изображения одиночных клеток использовали для морфометрического анализа. Контуры клеток были проанализированы с помощью программы TRACER V1.0. При анализе формы измеряли следующие параметры: площадь, дисперсию, элонгацию, периметр клеток. Параметры дисперсия и элонгация были предложены Данном и Брауном (Dunn, Brown, 1986). Элонгация является величиной, характеризующей степень вытянутости клеток (биполярность), и равна нулю у радиально симметричных фигур. Она определяется как  $Ig_2$  от отношения длинной оси описанного вокруг фигуры эллипса к его короткой оси. Элонгация инвариантна к изменению масштаба (размера) контура (эллипса), но не к его растяжению. Дисперсия — это величина, отражающая степень “изрезанности” края клетки (мультиполярность), и равна нулю для любого эллипса. Она определяется как  $Ig_2$  от отношения площади эллипса, описанного вокруг контура клетки, к ее площади. Дисперсия нечувствительна ни к изменению масштаба контура, ни к его растяжению. Данные морфометрического анализа подвергали статистической обработке. С использованием программы Excel были вычислены средние значения величин, стандартные отклонения и доверительные интервалы для определения достоверности полученных результатов.

**Видеомикроскопия.** С помощью видеомикроскопа Nikon Eclipse Ti была исследована локомоторная активность клеток в редкой культуре через 20 ч после их посева в концентрации 20000 кл/мл. Последовательности видеок кадров, полученные каждые 15 мин в течение 6 ч, обрабатывали в про-

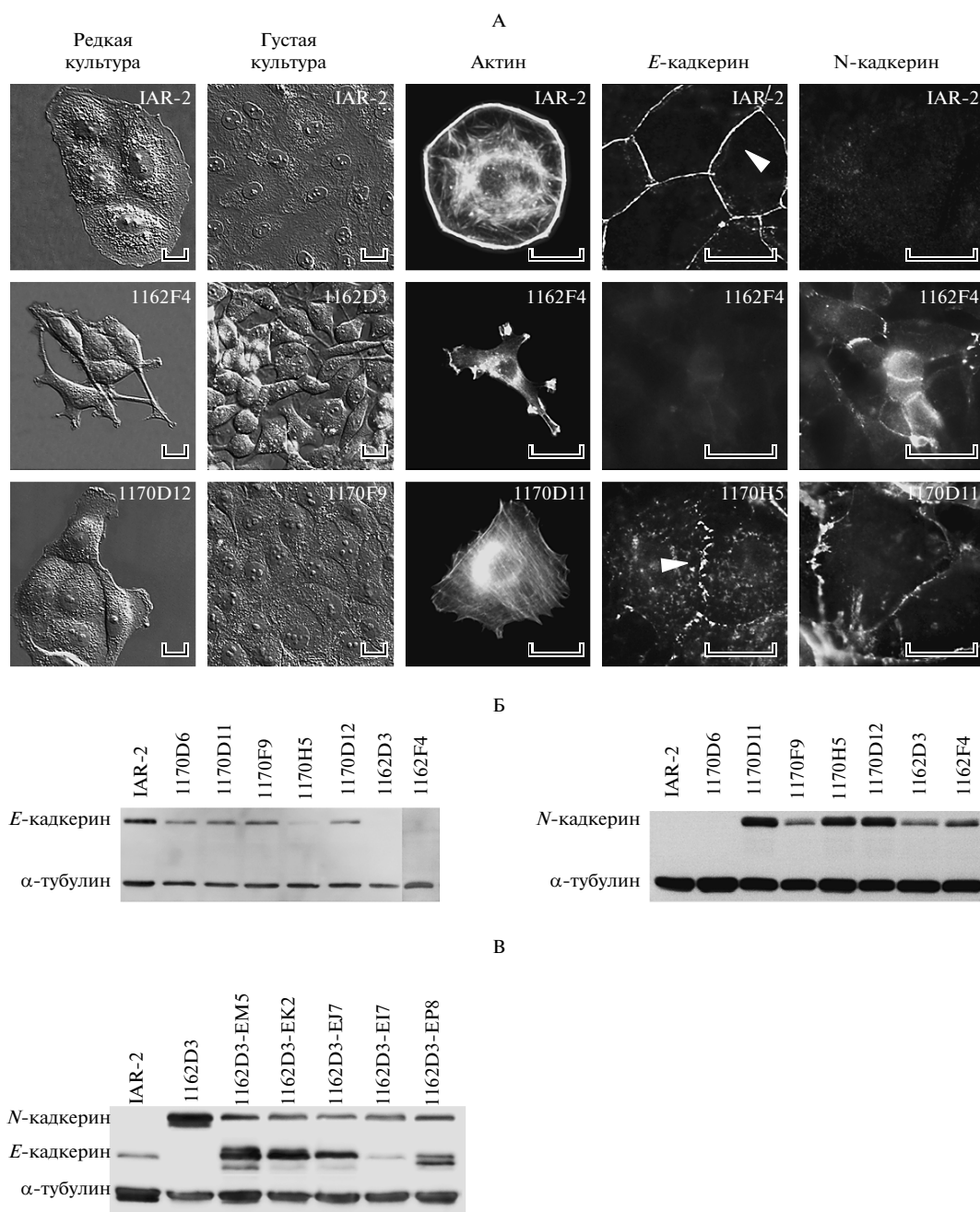
грамме ImageJ, определяя перемещения и скорости индивидуальных клеток.

**Миграционная активность.** Миграционную активность клеток исследовали в BD Bio-Coat<sup>TM</sup> миграционных камерах (Becton Dickinson, США), содержащих поликарбонатные мембранные вставки с порами диаметром 8 мкм. Клетки в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл среды DMEM с эмбриональной телячьей сывороткой добавляли в верхнюю часть миграционной камеры, помещенной в лунку 24-луночной плашки, заполненной той же средой. После 20 ч инкубации при 37°C в термостате клетки с верхней поверхности мембраны удаляли, а клетки на нижней поверхности мембраны фиксировали 100% метанолом и окрашивали DAPI (Sigma, США). Мембраны монтировали на предметное стекло и исследовали микроскопически с использованием 20× объектива. Миграционная активность клеток оценивалась после подсчета количества окрашенных клеток в 15 полях зрения в трех повторах и определения среднего значения.

**Иммуноблоттинг.** Вестерн-блот анализ проводили с использованием ячейки Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, США). В качестве лизирующего буфера использовали буфер RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1% SDS; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% деоксихолат Na) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США). Образцы белка (10–20 мкл), смешанные с буфером для нанесения, выдерживали 5 мин при 95°C и наносили на SDS-ПААГ для электрофореза. Перенос осуществляли на PVDF мембраны (GE Healthcare, Amersham, США), которые затем окрашивали первичными антителами на E-, N-кадгерин и  $\alpha$ -тубулин (в качестве маркера) и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Molecular Probes, Invitrogen, США). Детекция белка осуществлялась с помощью ECL Plus kit (GE Healthcare, Amersham), хемилюминесцентные изображения были получены с помощью системы Chemi-Smart 2000 и программного обеспечения Chemi Capt (Vilber Lourmat, France).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Изменения морфологии, актинового цитоскелета и межклеточных контактов эпителиальных клеток IAR-2 при неопластической трансформации.** Нетрансформированные эпителиоциты линии IAR-2 в редкой культуре образовывали островки плотно сцепленных между собой клеток, которые по всему клеточному краю образовывали псевдоподии (рис. 1А). В густой культуре эпителиоциты IAR-2 росли в виде монослоя. Одиночные клетки IAR-2 имели дискоидную форму. Главная структура актинового цитоскелета нормальных эпителиальных клеток — краевой актиновый пучок, который располагался на свобод-



**Рис. 1.** Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 и их Ras-трансформированные производные IAR1162 и IAR1170.

1А. Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 имеют дискоидную форму, в редкой культуре объединяются в островки, в густой культуре формируют монослой. Трансформированные эпителиоциты IAR1162 имеют фибробластоподобный фенотип и образуют многослойную культуру (клоны 1162F4, 1162D3). Трансформированные эпителиоциты IAR1170 имеют полигональную форму и формируют монослой (клоны 1170D12, 1170F9, 1170D11). В трансформированных эпителиоцитах IAR1162 (клон 1162F4) и IAR1170 (клон 1170D11) утрачивается краевой актиновый пучок, характерный для нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 (окрашивание на *E*-кадгерин). АК нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 организованы в непрерывные тангенциальные пояса (стрелка) (окрашивание на *E*-кадгерин). В трансформированных эпителиоцитах IAR1170 *E*-кадгерин формирует кластеры АК на межклеточных границах (клон 1170H5 – стрелка). В эпителиоцитах IAR1162 и IAR1170 *N*-кадгерин аккумулятивен в кластерах на границах между клетками (клоны 1162F4, 1170D11). 1Б, 1В. Иммуноблоттинг культур эпителиоцитов. Окраска антителами к *E*-кадгерину, *N*-кадгерину,  $\alpha$ -тубулину (маркерный белок).

Морфометрические параметры трансформированных эпителиоцитов

Линия	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Элонгация	Дисперсия	Периметр, мкм
IAR-2	2028 ± 120	0.17 ± 0.02	0.01 ± 0.001	168 ± 6
Ras-трансформированные эпителиоциты				
IAR1162D3	576 ± 47	0.86 ± 0.11	0.25 ± 0.06	122 ± 8
IAR1162F4	533 ± 40	1.36 ± 0.13	0.39 ± 0.04	137 ± 6
IAR1170D6	642 ± 71	0.57 ± 0.08	0.13 ± 0.03	112 ± 7
IAR1170D11	583 ± 58	0.31 ± 0.04	0.08 ± 0.02	108 ± 6
IAR1170F9	863 ± 74	0.33 ± 0.04	0.05 ± 0.01	118 ± 5
IAR1170H5	804 ± 87	0.38 ± 0.05	0.19 ± 0.05	139 ± 9
IAR1170D12	691 ± 59	0.41 ± 0.06	0.14 ± 0.04	126 ± 6
Клетки IAR1162D3, трансфицированные кДНК гена <i>CDH1</i>				
IAR1162D3-EM5	928 ± 98	0.49 ± 0.08	0.15 ± 0.04	131 ± 7
IAR1162D3-EK2	962 ± 96	0.70 ± 0.12	0.49 ± 0.08	204 ± 20
IAR1162D3-EJ7	1004 ± 76	0.66 ± 0.09	0.17 ± 0.03	156 ± 9
IAR1162D3-EI7	1613 ± 226	0.48 ± 0.08	0.16 ± 0.03	181 ± 13
IAR1162D3-EP8	1353 ± 199	0.65 ± 0.11	0.12 ± 0.04	164 ± 14

ных краях эпителиоцитов. Иммуноблоттинг показал, что эпителиоциты IAR-2 экспрессировали эпителиальный E-кадгерин, а N-кадгерин в этих клетках не обнаруживался (рис. 1Б). Межклеточные адгезионные контакты эпителиоцитов IAR-2, образованные E-кадхерином, были организованы в адгезионные пояса, располагавшиеся вдоль межклеточных границ (рис. 1А).

После трансформации эпителиоцитов IAR-2 мутантным онкогеном N-*RAS* были получены два типа клонов: клоны IAR1170 и клоны IAR1162. Клетки клонов IAR1162 в результате трансформации претерпели эпителиально-мезенхимальный переход (рис. 1А). Трансформированные эпителиоциты IAR1162 имели вытянутую фибробластоподобную форму, образуя одну-две ведущие ламеллы. В редкой культуре эпителиоциты IAR1162 в большинстве своем существовали как отдельные клетки, иногда объединяясь в островки. В густой культуре клетки IAR1162 часто подползали под соседние клетки, образуя многослойную культуру. Флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием меченого фаллоидина показало, что в трансформированных эпителиоцитах IAR1162 исчезал краевой актиновый пучок, в цитоплазме обнаруживались немногочисленные тонкие актиновые пучки, ориентированные вдоль длинной оси клетки.

При иммуноблоттинге было обнаружено, что в трансформированных эпителиоцитах IAR1162 E-кадгерин не экспрессировался, но экспрессировался мезенхимальный N-кадгерин (рис. 1Б). При иммунофлуоресцентном окрашивании культуры IAR1162 E-кадгерин также не выявлялся. АК эпителиоцитов IAR1162 были организованы в

кластеры на межклеточных границах, в которых аккумулировался N-кадгерин (рис. 1А).

Морфометрический анализ одиночных клеток (таблица) показал, что по сравнению с нетрансформированными предшественниками IAR-2 существенно (в 3–4 раза) уменьшалась площадь трансформированных клеток IAR1162, увеличивалась элонгация клеток, характеризующая вытянутость клеток, возрастала дисперсия, характеризующая изрезанность клеточного края.

После трансформации клеток IAR-2 онкогеном N-*RAS*, помимо клонов IAR1162, были также выделены 5 клонов IAR1170, клетки которых не претерпели эпителиально-мезенхимальный переход (рис. 1А). Одиночные трансформированные эпителиоциты IAR1170 имели полигональную или дискоидную форму. Трансформированные эпителиоциты IAR1170 формировали широкие псевдоподии вдоль свободного края, при этом образование псевдоподий по клеточному краю было крайне неравномерным. Клетки IAR1170 в редкой культуре часто объединялись в островки, а в густой культуре росли в виде монослоя, похожего на монослой нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2. Флуоресцентное окрашивание филаментного актина выявило в трансформированных эпителиоцитах IAR1170 исчезновение непрерывного краевого актинового пучка. В некоторых клетках можно было видеть актиновые арки, располагающиеся параллельно клеточному краю.

Иммуноблоттинг показал, что трансформированные эпителиоциты IAR1170 продолжали экспрессировать E-кадгерин, при этом в клетках IAR1170 также активировалась экспрессия



**Рис. 2.** Распределение белка плотных контактов окклюдина в нетрансформированных эпителиоцитах IAR-2 и трансформированных эпителиоцитах IAR1162 и IAR1170. В клетках IAR-2 плотные контакты организованы в полосы вдоль межклеточных границ. Трансформированные эпителиоциты IAR1162 (клон 1162D3) плотные контакты не формируют. В трансформированных эпителиоцитах IAR1170 (клон 1170F9) окклюдин собирается в точечные кластеры на границах между клетками.

N-кадгерина (рис. 1Б). Несмотря на то, что в эпителиоцитах IAR1170 E-кадгерин аккумулировался в адгезионных контактах на границах между клетками, организация контактов существенно изменялась (рис. 1А). В отличие от непрерывных адгезионных поясов нетрансформированных эпителиальных клеток, АК трансформированных эпителиоцитов IAR1170 представляли собой изолированные точечные кластеры на межклеточных границах. В густых культурах кластеры АК могли также образовывать фрагментированные линии вдоль межклеточных границ. В состав АК эпителиоцитов IAR1170 наряду с E-кадхерином входил и N-кадгерин.

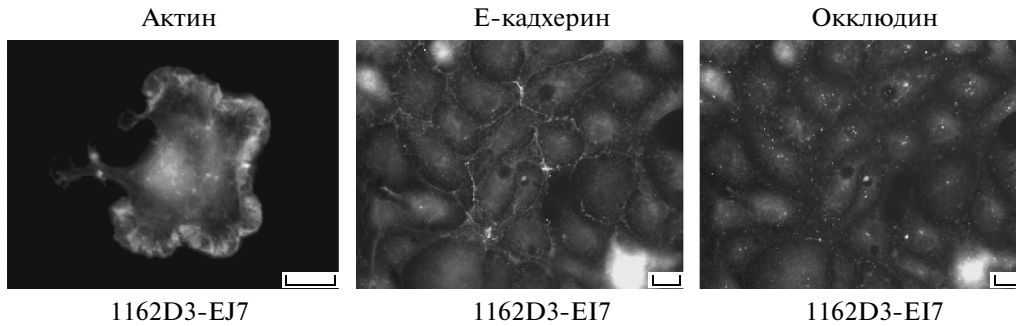
Морфометрический анализ показал, что по сравнению с нетрансформированными эпителиоцитами IAR-2, средняя площадь одиночных трансформированных эпителиоцитов IAR1170 была меньше, а дисперсия и элонгация увеличивались (таблица).

Для исследования возможного влияния экспрессии E-кадгерина на морфологические и миграционные характеристики трансформированных эпителиоцитов была произведена трансфекция экзогенной конструкцией с геном E-кадгерина клеток клона трансформированных эпителиоцитов 1162D3, утративших E-кадгерин (рис. 1В). Экзогенный E-кадгерин аккумулировался в точечных АК на границах между клетками (рис. 3). Экспрессия экзогенного E-кадгерина изменяла морфологию трансформированных эпителиоцитов IAR1162, имевших исходно фибробластоподобный фенотип. Клетки клонов 1162D3-EM5, 1162D3-EK2, 1162D3-EI7, 1162D3-EP8 и 1162D3-EJ7 приобрели полигональную форму, контур клеток был часто изрезан. Экспрессия экзогенного E-кадгерина приводила к существенным изменениям морфометрических характеристик трансформированных эпителиоцитов IAR1162: резко возрастала площадь их расплывания на субстрате, снижалась

элонгация клеток и в большинстве клонов уменьшалась дисперсия (таблица).

Как известно, АК участвуют в формировании и механическом поддержании плотных контактов (tight junctions), которые, в свою очередь, обеспечивают барьерную функцию эпителия и физически разделяют мембрану поляризованных эпителиоцитов на апикальный и базолатеральный домены (Steed et al., 2010). С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии мы исследовали распределение белка плотных контактов, окклюдина, в нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитах IAR и обнаружили, что неопластическая трансформация вызывала разрушение структуры плотных контактов в эпителиальных культурах. Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 формировали плотные контакты, которые располагались в виде полос вдоль межклеточных границ (рис. 2). Трансформированные эпителиоциты IAR1162, лишенные E-кадгерина, плотные контакты не образовывали. В трансформированных эпителиоцитах IAR1170, экспрессирующих E-кадгерин, окклюдин аккумулировался на межклеточных границах, образуя плотные контакты в виде точечных кластеров. Вместе с тем трансфекция в клетки IAR1162D3 гена *CDH1* E-кадгерина не приводила к восстановлению аккумуляции окклюдина на границах клеток и формированию плотных контактов (рис. 3).

**Локомоторная активность нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 и трансформированных эпителиоцитов IAR1162 и IAR1170 в редких культурах.** Видеомикроскопическое исследование выявило существенные различия в поведении нетрансформированных и трансформированных эпителиальных клеток. Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 на протяжении 6 ч практически не меняли свою морфологию. Одиночные клетки IAR-2 имели дисконидную форму, образуя псевдоподии по всему краю. Эпителиоциты IAR-2 могли объединяться



**Рис. 3.** Трансформированные эпителиоциты IAR1162, экспрессирующие экзогенный Е-кадгерин. В результате трансфекции гена *CDH1* форма трансформированных клеток становится полигональной (клон 1162D3-EJ7). Е-кадгерин аккумулирован в точечных АК, плотные контакты не образуются (клон 1162D3-EI7).

в островки, межклеточные контакты в которых оставались стабильными в течение всего времени наблюдения (рис. 4). Относительное расположение клеток в островках практически не менялось. Нетрансформированные эпителиоциты были прикреплены к подлежащему субстрату, они образовывали псевдоподии на свободном крае, но смещения клеток по субстрату были незначительны. В течение 6 ч эпителиоциты IAR-2 сдвигались на 10–13 мкм.

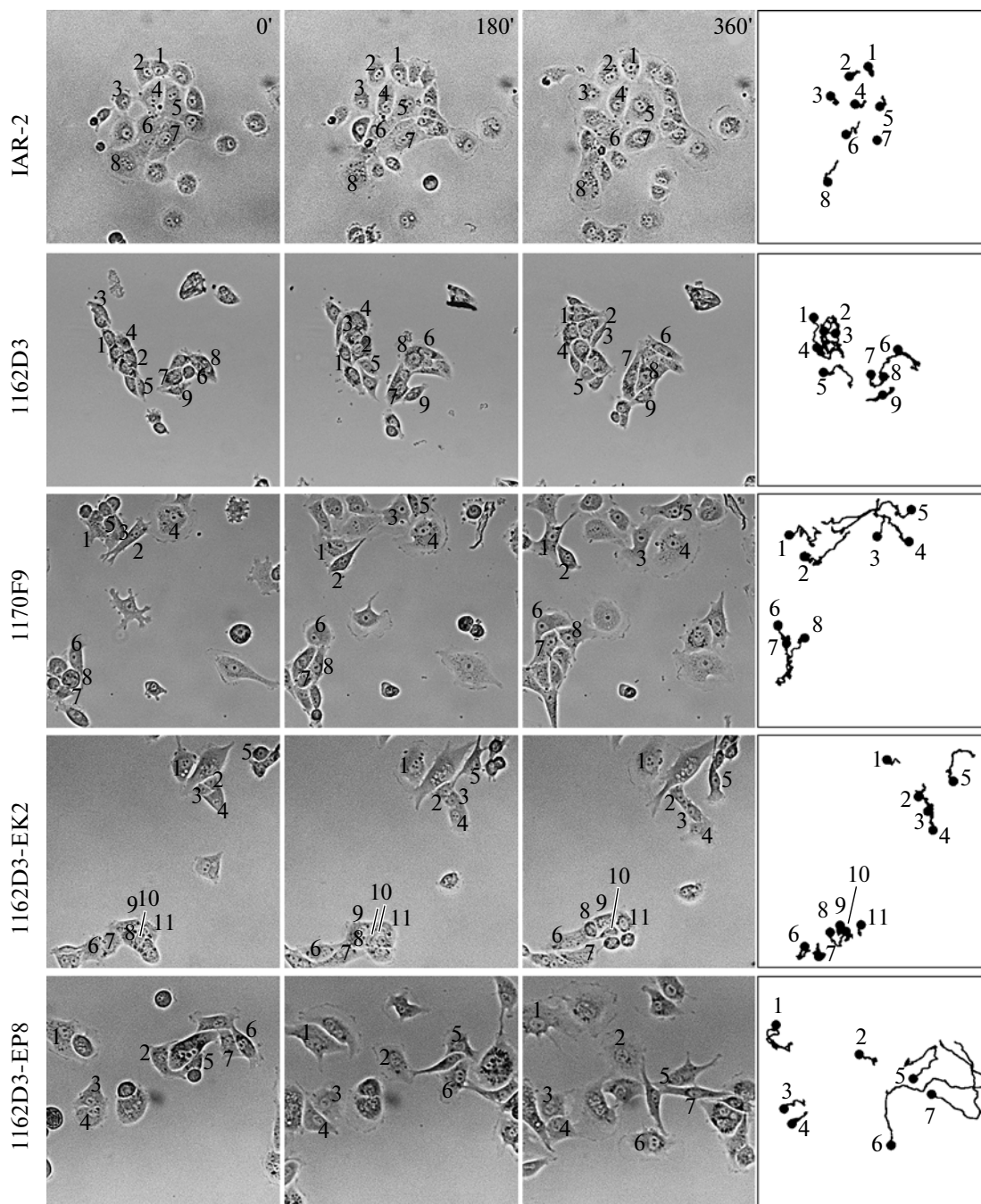
Видеомикроскопическое исследование показало, что фибробластоподобные трансформированные эпителиоциты IAR1162 приобрели способность направленно перемещаться по двумерному субстрату. Клетки IAR1162 могли мигрировать по подложке индивидуально, а также могли зацепляться друг за друга и образовывать островки. Клетки IAR1162 в составе островков довольно легко разрывали межклеточные контакты, перемещаясь друг относительно друга, выходили из островков. Мы измерили скорости и пройденные расстояния трансформированных эпителиоцитов 1162D3, находящихся в контакте с соседними клетками, которые оказались существенно выше по сравнению с аналогичными показателями миграции одиночных клеток (рис. 5). Вместе с тем, мы не наблюдали направленных перемещений групп контактирующих клеток 1162D3 по субстрату (коллективной миграции).

При длительном видеомикроскопическом исследовании было обнаружено, что для трансформированных эпителиоцитов IAR1170, экспрессирующих Е-кадгерин, характерна асимметрия псевдоподиальной активности на свободном крае, что отличает их от нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2. Клетки IAR1170 в ходе наблюдения постоянно меняли области преимущественного образования псевдоподий. Эпителиоциты IAR1170 часто объединялись в островки, однако, в отличие от стабильных контактов нетрансформированных предшественников, межклеточные контакты трансформированных

эпителиоцитов были нестабильными. Трансформированные эпителиоциты IAR1170 могли разрывать контакты с соседними клетками, могли менять положение в группе клеток, образующих островок, перемещаясь друг относительно друга. Эпителиоциты IAR1170 могли мигрировать по субстрату, как в составе группы клеток, так и индивидуально, образуя при встрече с другими клетками новые контакты (рис. 4).

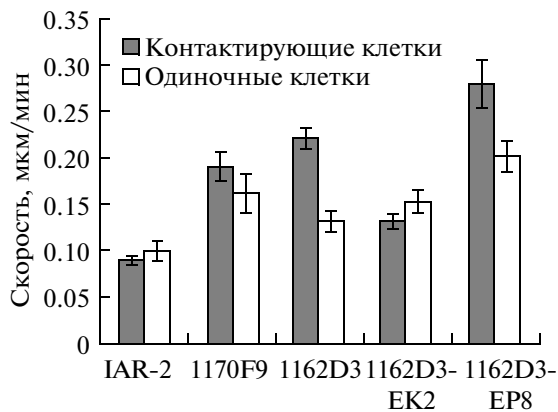
Экспрессия экзогенного Е-кадгерина изменяла миграционные характеристики трансформированных эпителиоцитов IAR1162, утративших эндогенный Е-кадгерин в результате трансфекции онкогена *RAS*. Эти изменения затрагивали, главным образом, подвижность клеток, находящихся в контакте с другими клетками, и были связаны с уровнем экспрессии экзогенного Е-кадгерина в клетках. Скорость перемещений эпителиоцитов клона 1162D3-EK2, экспрессировавших высокий уровень Е-кадгерина (рис. 1В), резко уменьшалась ( $0.22 \pm 0.01$  мкм/мин – у клеток клона 1162D3 и  $0.13 \pm 0.01$  мкм/мин у клеток 1162D3-EK2). Вместе с тем, клетки 1162D3-EK2, в отличие от эпителиоцитов 1162D3 находясь в контакте с другими клетками, могли мигрировать, не разрывая связей с этими клетками (коллективная миграция). Видеомикроскопические исследования показали, что средняя скорость движения клеток 1162D3-EP8 с меньшим уровнем экспрессии Е-кадгерина (рис. 1В), достоверно не отличалась от средней скорости движения клеток исходного клона 1162D3 (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Ras-трансформация приводит к появлению у эпителиальных клеток IAR-2 локомоторной активности. Трансформированные эпителиоциты IAR1170, даже несмотря на сохранение в них эпителиального Е-кадгерина, приобрели способность мигрировать по подложке. Вместе с тем, высокий уровень экспрессии экзогенного Е-кадгерина в клетках клона 1162D3-EK2 замет-



**Рис. 4.** Поведение нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов IAR в редкой культуре. Выбранные кадры из видеопоследовательностей. Траектории перемещений отдельных клеток, обозначенных цифрами, показаны справа (кружком обозначено конечное положение клетки после 6 ч наблюдения). Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 объединяются в островки. Контакты между клетками IAR-2 в островках стабильны, перемещения клеток незначительны. Трансформированные эпителиоциты IAR1170 и IAR1162 приобрели локомоторную активность. Межклеточные контакты трансформированных эпителиоцитов нестабильны. Клетки могут менять положение в островке, перемещаясь друг относительно друга (1162D3 – клетки 1, 2, 3, 4). Клетки, находящиеся в контакте, могут разрывать контакты и двигаться независимо друг от друга (1170F9 – клетки 1, 2, 5). Эпителиоциты 1170F9, экспрессирующие E-кадгерин, в отличие от эпителиоцитов 1162D3, могут мигрировать по подложке в составе группы клеток (коллективная миграция) (1170F9 – клетки 6, 8). Клетки 1162D3-EK2 с высоким уровнем экспрессии экзогенного E-кадгерина способны двигаться по подложке, оставаясь связанными друг с другом (1162D3-EK2 – клетки 2, 3, 4).





**Рис. 5.** Скорости перемещений нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов IAR в редкой культуре. Скорости движения индивидуальных клеток определялись после анализа в программе ImageJ положения ядер клеток в кадрах видеопоследовательностей, полученных каждые 15 мин в течение 6 ч.

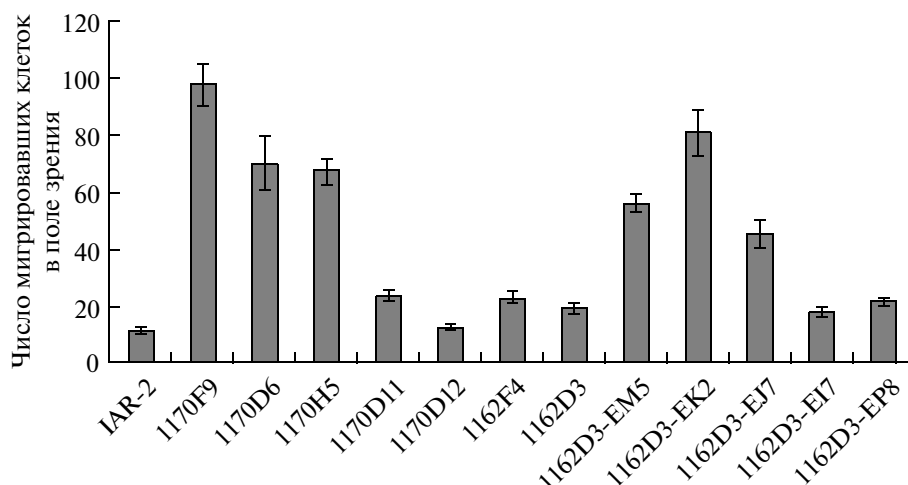
но уменьшал их подвижность, что связано, по-видимому, с усилением межклеточной адгезии.

**Миграционная активность нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 и трансформированных эпителиоцитов IAR1170 и IAR1162.** Миграционная активность нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов была также исследована в камерах с мембранами, имеющими поры диаметром 8 мкм. При подсчете количества клеток на нижней поверхности мембран были обнаружены принципиальные различия в поведении нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов: количество мигри-

ровавших трансформированных клеток было существенно выше по сравнению с количеством нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 (рис. 6). Наибольшая миграционная активность была характерна для трансформированных эпителиоцитов IAR1170, экспрессирующих E-кадгерин, – 1170F9, 1170D6 и 1170H5, среднее количество клеток в поле зрения составляло 70–100 клеток. Миграционная активность клеток IAR1162, утративших в результате трансформации E-кадгерин, была существенно ниже и не превышала 20–22 клеток в поле зрения. Клетки клонов 1162D3-EM5, 1162D3-EK2 и 1162D3-EJ7 с высоким уровнем экспрессии экзогенного E-кадхерина более эффективно, нежели клетки исходного клона, могли мигрировать через поры. Миграционная активность клеток клонов 1162D3-EI7 и 1162D3-EP8 была сравнима с миграционной активностью клеток исходного клона 1162D3, утратившего при трансформации E-кадхерин.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные указывают на возможность реализации при трансформации различных направлений морфологических изменений эпителиальных клеток, приводящих к одному и тому же результату, критическому для опухолевой прогрессии, – возникновению миграционного фенотипа у неподвижных, плотно сцепленных между собой эпителиальных клеток. В наших исследованиях мутантный онкоген RAS вызывал два типа морфологической трансформации эпителиоцитов IAR-2, сопровождавшихся появлением у эпителиальных клеток способности к направленному



**Рис. 6.** Миграционная активность нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 и трансформированных эпителиоцитов IAR1170 и IAR1162. Клетки IAR-2 и клетки клонов IAR1170 и IAR1162 были рассеяны с плотностью  $2 \times 10^5$  клеток/мл в миграционные камеры. Через 20 ч подсчитывали количество клеток, мигрировавших через поры диаметром 8 мкм на нижнюю поверхность мембран. Данные представлены в виде среднего значения количества клеток в поле зрения после подсчета клеток в 15 полях зрения в трех повторах  $\pm$  ошибка среднего.

перемещению по подложке. Клоны одного типа (IAR1162) прошли эпителиально-мезенхимальный переход: утратили E-кадгерин и плотные контакты, начали экспрессировать N-кадгерин, приобрели фибробластоподобную морфологию и локомоторную активность. Вместе с тем, в результате Ras-трансформации эпителиоцитов IAR-2 возникли также клоны трансформированных эпителиоцитов IAR1170, имевших морфологию, близкую к морфологии нетрансформированных предшественников и формировавшихся в густой культуре монослой. Клетки IAR1170 сохраняли экспрессию E-кадгерина и могли образовывать плотные контакты. Тем не менее, несмотря на присутствие в клетках E-кадгерина и возможность его включения в состав межклеточных адгезионных контактов, трансформированные эпителиоциты IAR1170, также как и клетки IAR162, приобрели высокую двигательную активность и могли направленно мигрировать как по плоскому субстрату, так и через узкие поры в мембранах миграционных камер.

Ранее, исследуя распределение GFP-E-кадгерина, трансфицированного в клетки, мы обнаружили принципиальные изменения пространственной организации и динамики E-кадгерин-содержащих АК у эпителиоцитов IAR-6-1, трансформированных химическим канцерогеном диметилнитрозамином (Ayollo et al., 2009). Мы предположили, что обнаруженное превращение тангенциальных поясов АК в радиальные АК (точки и штрихи), связано, прежде всего, с разрушением краевого актинового пучка при трансформации, что приводит к дефициту тангенциального натяжения в зоне межклеточного контакта, исчезновению контактного паралича у трансформированных эпителиоцитов и разрушению стабильной межклеточной адгезии. В настоящей работе, в Ras-трансформированных клетках IAR мы также обнаружили исчезновение краевого актинового пучка и реорганизацию тангенциальных АК в индивидуальные кластеры, что сопровождалось разрушением стабильной межклеточной адгезии. Сохранение E-кадгерин-содержащих АК в трансформированных эпителиоцитах IAR1170 не является препятствием для приобретения клетками локомоторной активности. Проведенные исследования продемонстрировали нестабильность E-кадгерин-содержащих АК в группах клеток IAR1170, разрушение связи между клетками, миграцию клеток друг относительно друга. Таким образом, изменение пространственной организации E-кадгерин-содержащих АК при неопластической трансформации, сопровождающееся разрушением краевого актинового пучка, угнетает стабильную межклеточную адгезию.

Вместе с тем, видеомикроскопические исследования показали, что трансформированные эпителиоциты IAR1170, имеющие E-кадгерин-

содержащие АК, могут перемещаться по подложке в составе группы, когда одна лидирующая клетка тянет за собой клетки, находящиеся с ней в контакте. Это движение цепочек и групп клеток, физически связанных друг с другом (коллективная миграция) *in vitro* описано для клеток опухолей, продолжающих экспрессировать E-кадгерин (Friedl et al., 1995; Nabeshima et al., 1999). Направленное перемещение групп клеток задается активностью “лидирующих” клеток, имеющих поляризованную морфологию, высокую псевдоподиальную активность в отличие от более низкой подвижности клеток артергарда. Предполагается, что различия между передними и задними клетками обусловлены, прежде всего, различиями в экспрессии на клетках поверхностных рецепторов к хемокинам, факторам роста, интегринных рецепторов, асимметрией распределения в клетках зон полимеризации актиновых филаментов и сил в актомиозиновом кортексе, регулируемых малыми ГТФазами семейства Rho. Коллективная миграция клеток, ассоциированная с протеолизом и пенетрацией межклеточного матрикса, была описана также *in vivo* и рассматривается в качестве основного механизма диссеминации опухолевых клеток рабдомиосаркомы, карциномы полости рта, колоректальной карциномы, протоковой карциномы молочной железы и меланомы (Friedl, Gilmour, 2009).

В наших экспериментах трансфекция экзогенного E-кадгерина в эпителиоциты IAR1162, утратившие экспрессию E-кадгерина в результате Ras-трансформации, приводила к увеличению количества клеток, мигрировавших через поры в мембранах. Можно предположить, что коллективная миграция через узкие поры клеток, связанных E-кадгерин-опосредованно, более эффективна, нежели миграция одиночных разобщенных клеток. Между тем, при видео-микроскопическом исследовании поведения клеток на двумерном субстрате мы обнаружили снижение миграционной активности клеток клона 1162D3-EK2 с высоким уровнем экспрессии экзогенного E-кадгерина. Существенное уменьшение скорости миграции в культуре 1162D3-EK2 было характерно для эпителиоцитов, контактирующих с соседними клетками, при этом клетки двигались более направленно. Трансфекция E-кадгерина практически не влияла на локомоторную активность одиночных трансформированных клеток. Вместе с тем, в литературе имеются сообщения об угнетении миграционной и инвазивной активности трансформированных клеток в результате индукции экспрессии E-кадгерина (Vleminckx et al., 1991; Mao et al., 2008). Очевидна необходимость дальнейших детальных исследований, которые могли бы прояснить причины различного влияния экспрессии E-кадгерина в разных экспериментальных системах.

Мы также обнаружили, что трансфекция E-кадгерина изменяет морфометрические характеристики трансформированных эпителиоцитов IAR1162, что указывает на его значение в качестве плейотропного регулятора фенотипа эпителиальных клеток. Морфометрический анализ показал резкое возрастание средней площади распластывания клеток на субстрате, снижение их элонгации и дисперсии при восстановлении экспрессии E-кадгерина в трансформированных эпителиоцитах IAR1162. В лаборатории Вайнберга было обнаружено, что снижение экспрессии E-кадгерина в результате трансфекции специфической shРНК, но не ослабление межклеточной адгезии при введении доминантно-негативного мутанта E-кадгерина резко стимулирует миграцию и метастатическую активность Ras-трансформированных эпителиоцитов. Авторы считают, что формирование миграционного фенотипа и развитие метастатического потенциала у трансформированных клеток при угнетении экспрессии E-кадгерина связано с активацией сигнальной функции  $\beta$ -катенина, изменением спектра специфических киназ и транскрипционных регуляторов (Onder et al., 2008).

Таким образом, проведенные нами исследования продемонстрировали участие E-кадгерина в формировании фенотипа Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR. Разрушение краевого актинового пучка и изменение пространственной организации АК, несмотря на наличие или отсутствие в них E-кадгерина, сопровождается разрушением стабильной межклеточной адгезии и появлением локомоторной активности у Ras-трансформированных эпителиоцитов. Сохранение E-кадгерина в АК влияет на локомоторную активность трансформированных эпителиоцитов и играет важную роль в их коллективной миграции.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00664-а) и ФЦП Минобороны РФ (ГК № 16.512.11.2264).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ackland M., Newgreen D.F., Fridman M. et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells // *Lab. Invest.* 2003. V. 83. P. 435–448.
- Ayollo D.V., Zhitnyak I.Y., Vasiliev J.M., Gloushankova N.A. Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplastic transformation change cell–cell interactions // *PLoS ONE.* 2009. V. 4. e8027.
- Brabletz T., Jung A., Reu S. et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 8. P. 10356–10361.
- Dunn G.A., Brown A.F. Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation // *J. Cell Sci.* 1986. V. 83. P. 313–340.
- Friedl P., Noble P.B., Walton P.A. et al. Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants *in vitro* // *Cancer Res.* 1995. V. 55. P. 4557–4560.
- Friedl P., Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. P. 445–457.
- Gillett C.E., Miles D.W., Ryder K. et al. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast // *J. Pathol.* 2001. V. 193. P. 33–41.
- Gloushankova N.A., Lyubimova A.V., Tint I.S. et al. Role of the microtubular system in morphological organization of normal and oncogene-transfected epithelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 8597–8601.
- Hegerfeldt Y., Tusch M., Brocker E. et al. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell–cell interaction,  $\beta$ 1-integrin function, and migration strategies // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 2125–2130.
- Mao Q., Li Y., Zheng X. et al. Up-regulation of E-cadherin by small activating RNA inhibits cell invasion and migration in 5637 human bladder cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 375. P. 466–470.
- Montesano R., Saint Vincent L., Drevon C. et al. Production of epithelial and mesenchymal tumours with rat liver cells transformed *in vitro* // *Int. J. Cancer.* 1975. V. 16. P. 550–558.
- Nabeshima K., Inoue T., Shimao Y. et al. Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets // *Histol. Histopathol.* 1999. V. 14. P. 1183–1197.
- Onder T.T., Gupta P.B., Mani S.A. et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 3645–3654.
- Perl A.K., Wilgenbus P., Dahi U. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma // *Nature.* 1998. V. 392. P. 190–193.
- Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma // *Histopathology.* 2007. V. 50. P. 151–162.
- Rosivatz E., Becker I., Specht K. et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer // *Am. J. Pathol.* 2002. V. 161. P. 1881–1891.
- Steed E., Balda M.S., Matter K. Dynamics and functions of tight junctions // *Trends Cell Biol.* 2010. V. 20. P. 142–149.
- Tarin D., Thompson E.W., Newgreen D.F. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 5996–6000.
- Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // *Nat Rev Cancer.* 2002. V. 2. P. 442–454.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y.J. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease // *Cell.* 2009. V. 139. P. 871–890.
- Vlemminckx K., Vakaet L. Jr., Mareel M. et al. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role // *Cell.* 1991. V. 66. P. 107–119.
- Wheelerlock M.J., Shintani Y., Maeda M. et al. Cadherin switching // *J. Cell Sci.* 2007. V. 121. P. 727–735.

Wicki A., Lehenbre F., Wick N. et al. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton // *Cancer Cell*. 2006. V. 9. P. 261–272.

Wolf K., Wu Y.I., Liu Y. et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to col-

lective cancer cell invasion // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. P. 893–904.

Yang J., Mani S.A., Donaher J.L. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis // *Cell*. 2004. V. 117. P. 927–939.

## Morphology, Cell–Cell Interactions, and Migratory Activity of IAR-2 Epithelial Cells Transformed with the *RAS* Oncogene: Contribution of Cell Adhesion Protein E-Cadherin

I. Yu. Zhitnyak and N. A. Glushankova

*Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia*  
e-mail: natgtlu@hotmail.com

**Abstract**—The destruction of stable cell–cell adhesion and the acquisition of the ability to migrate are consistent stages of neoplastic evolution of tumor cells of epithelial origin. We studied the morphologic and migration characteristics of epithelial cells of IAR1162 and IAR1170 clones derived from a mixed culture of oncogene *N-RasV12*-transformed cell line IAR-2. It was found that the mutant oncogene *RAS* can cause two types of morphological changes in IAR-2 epithelial cells. Cells of one type (IAR1162 clones) underwent epithelial–mesenchymal transition: they stopped to express E-cadherin, acquired fibroblast-like morphology, and did not form tight junctions. Cells of the other type (IAR1170 clones) retained a morphology close to the morphology of nontransformed progenitor cells, formed E-cadherin-based adherens junctions and tight junctions, and formed a monolayer in confluent culture. However, in both IAR1162 and IAR1170 cells, the mutant oncogene *RAS* caused the destruction of marginal actin bundle and the reorganization of cell–cell adherens junctions. *RAS*-transformed IAR1162 and IAR1170 epithelial cells acquired the ability to migrate on a flat substrate as well as through narrow pores in membranes of migration chambers. A videomicroscopic study of transformed epithelial cell cultures demonstrated the instability of cell–cell contacts and the independent nature of cell migration. IAR1170 epithelial cells, which had E-cadherin-based adherens junctions, were also able to move as a group (collective migration). IAR1162D3 cells, which lost the ability to express endogenous E-cadherin as a result of Ras-transformation, were transfected with a plasmid carrying the *CDH1*. As a result of transfection, clones of cells with different levels of expression of exogenous E-cadherin were obtained. The high level of expression of exogenous E-cadherin in transformed epithelial cells led to a decrease in the rate of migration on a two-dimensional substrate of the cells that were in contact with neighboring cells but almost had no effect on the migration of single cells, at the same time increasing the number of cells that migrated through the pores in migration chambers. Thus, the destruction of marginal actin bundle and the change in the spatial organization of cell–cell adherens junctions, irrespective of the presence or absence of E-cadherin, was accompanied by destruction of stable cell–cell adhesion and the appearance of locomotor activity in Ras-transformed epithelial cells. The retaining of E-cadherin in cell–cell adhesion junctions affects the locomotor activity of transformed epithelial cells and plays an important role in their collective migration.

**Keywords:** transformed epithelial cells, actin cytoskeleton, cell–cell contacts, E-cadherin, migration