

Роль миозин II-регулирующих сигнальных каскадов в динамике фокальных контактов в клетках с мезенхимальным типом подвижности

Научный руководитель – Воробьев Иван Андреевич

Ковалева Анастасия Викторовна

Аспирант

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра клеточной биологии и гистологии, Москва, Россия

E-mail: nasty441@yandex.ru

Клеточная подвижность играет важную роль в процессах эмбрионального развития, заживления ран и иммунного ответа. Нарушение регуляции адгезии и миграции клеток считается основной причиной метастатического роста опухолей. Адгезия клеток тесно связана с динамикой фокальных контактов и актомиозиновым комплексом клетки. Существует предположение, что динамика фокальных контактов регулируется киназой MLCK на краю клетки и ROCK-киназой в теле клетки.

В эксперименте была проанализирована динамика фокальных контактов в различных областях клетки в норме и в присутствии ингибиторов ROCK и MLCK. Фокальные контакты были визуализированы методом двойной трансфекции, где маркерами являлись паксиллин-GFP и винкулин-RFP. Для оценки динамики фокальных контактов измерялись их площадь, количество и плотность.

В контрольных клетках выявляются первичные фокальные адгезии, содержащие только паксиллин, в виде тонкого пояса в ламеллиподии. Винкулин-содержащие адгезии в этой области отсутствуют. На границе ламеллиподия-ламелла локализованы контакты различного размера, которые содержат как винкулин, так и паксиллин.

В теле клетки большинство фокальных контактов содержат только винкулин, а контакты, содержащие оба белка, присутствуют в незначительном количестве. В области активной ламеллы медианная плотность контактов составила 0.15 контактов/мкм², медианная площадь контакта составила 0.43 мкм². В теле клетки плотность контактов была значительно меньше (медиана 0.04 контакта/мкм²), площадь контактов также была меньше, чем на краю (медиана 0.34 мкм²).

Под воздействием ингибитора ROCK (Y-27632) положение и количество фокальных контактов резко меняется. Паксиллин-содержащие адгезии формируют яркую полосу по всему контуру клетки. На краю клетки площадь контактов уменьшилась вдвое (медиана 0.26 мкм², статистически значимые отличия, $p=0.003$), различия для плотности оказались статистически недостоверны. В теле клетки ни площадь, ни плотность не изменились.

Под воздействием ингибитора MLCK (ML-7) площадь контактов в теле клетки возросла вдвое (медиана 0.51 мкм²), тогда как плотность не изменилась, при этом, общее количество контактов также уменьшилось. На краю клетки параметры контактов не менялись. Степень колокализации белков варьировала от 29.14% в теле клетки до 37.14% на краю и не менялась под действием ингибиторов.

Таким образом, в работе показано, что различные киназы RhoA-зависимого каскада играют ключевую роль в динамике фокальных контактов и действуют независимо в различных зонах клетки.

Источники и литература

- 1) Pasapera A, Schneider I, Rericha E, Schlaepfer D, Waterman C. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *JCB*. 2010 Mar 22;188(6):877-90
- 2) G Totsukawa, Y Wu, Y Sasaki, D Hartshorne, Y Yamakita, S Yamashiro, F Matsumura. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *JCB*. 2004. Feb 2; 164(3): 427–439