

Влияние организации виментиновых промежуточных филаментов на миграцию опухолевых клеток

Научный руководитель – Ломакина Мария Евгеньевна

Козлова Екатерина Алексеевна

Студент (магистр)

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

E-mail: mymail.kozlova@gmail.com

Одним из основных маркеров клеток, прошедших эпителиально-мезенхимальный переход, является наличие виментиновых промежуточных филаментов (ВПФ). Однако, на данный момент не сформирована полная картина роли ВПФ в регуляции клеточной подвижности и миграционной пластичности. Ранее была создана и исследована экспериментальная модель, за основу которой были взяты эмбриональные крысиные фибробласты REF52, из которых были получены клетки REF-/- с нокаутом виментина и REF117, содержащие аминокислотную замену Y117L, предотвращающую сборку ULFs (unit-length filaments) виментина в длинные филаменты. Было показано, что для направленной миграции нормальных фибробластов необходима экспрессия виментина (дикого типа или в виде ULFs), а скорость движения не зависит от наличия и организации ВПФ [1]. Известно, что опухолевые клетки обладают повышенной миграционной пластичностью, но как организация ВПФ влияет на подвижность опухолевых клеток изучено плохо.

Целью данного проекта является выяснение роли наличия и организации ВПФ в регуляции подвижности опухолевых клеток.

Исследование проводилось на клетках аденокарциномы легкого человека A549. Клетки с нокаутом виментина и мутацией Y117L создавались с помощью технологии Crispr/Cas9. Путем single-cell клонирования для каждой полученной линии было отобрано по два клона. Цитоскелет и фокальные контакты клонов были охарактеризованы при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания и Вестерн-блоттинга. На основании прижизненной цейтраферной видеосъемки в режиме DIC микроскопии проводилась оценка направленности и скорости миграции одиночных клеток в полученных линиях.

Внесенные в ген виментина мутации не повлияли на структуру сети микротрубочек и филаментов цитокератина. Во всех клонах A549 с нокаутом или мутацией виментина Y117L площадь фокальных контактов была меньше, чем в контрольной линии, при этом разницы в числе фокальных контактов и уровне экспрессии винкулина обнаружено не было. Скорость движения клеток обоих клонов с нокаутом виментина была ниже, чем в контроле и у клонов с виментином в виде ULFs. При оценке направленности миграции не было выявлено статистически значимых отличий в направленности миграции клеток с нокаутом виментина от контроля, однако оба клона с мутантным виментином мигрировали более направленно.

Таким образом, нокаут виментина приводит к снижению скорости миграции. Нарушение сборки полноразмерных ВПФ в результате внесения мутации Y117L не приводит к снижению скорости, но ассоциировано с увеличением направленности клеточной миграции. И нокаут, и нарушение организации ВПФ вызывает уменьшение размеров фокальных контактов. Однако, связи между изменением характера миграции опухолевых клеток и изменением в системе фокальных контактов мы не обнаружили.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-25-00454 и компании Хеликон.

Источники и литература

- 1) Vakhrusheva A., et al. The role of vimentin in directional migration of rat fibroblasts // Cytoskeleton (Hoboken). 2019;76(9-10):467-476