

## **Zróżnicowanie funkcjonalne izoform aktyny $\beta$ i $\gamma$ w procesie migracji komórek nowotworowych**

Migracja komórek odgrywa istotną rolę w trakcie wielu procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych takich jak embriogeneza, gojenie się ran, angiogeneza czy metastaza. Komórki nowotworowe wykorzystują w trakcie przerzutowania jeden z dwóch typów migracji – mezenchymalny lub ameboidalny. Ruch mezenchymalny jest zależny od obecności kinazy Rac oraz proteaz. Wiąże się z występowaniem wypustek typu lamellipodiów i invadopodiów zbudowanych z aktyny filamentarnej. Ruch ameboidalny jest zależny od kinaz Rho/ROCK. Komórki poruszające się w ten sposób posiadają zaokrągloną morfologię i tworzą pęcherzyki migracyjne typu „blebbs”. Niezależnie jednak od sposobu migracji komórek, kluczową rolę w tym procesie odgrywa cytoszkielet aktynowy. Aktyny to konserwatywne białka zaangażowane w wiele różnorodnych procesów takich jak skurcz mięśni, ruch komórki, adhezja i nadanie komórce kształtu. Dwie spośród jej izoform – niemięśniowe, cytoplazmatyczne aktyny  $\beta$  i  $\gamma$  są obecne we wszystkich komórkach organizmu i niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania. Różnią się pomiędzy sobą jedynie czterema aminokwasami w obrębie N-końca łańcucha polipeptydowego. Ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja oraz pełnione przez nie funkcje nadal pozostają w sferze badań.

Celem niniejszej pracy było ustalenie czy istnieje zróżnicowanie funkcjonalne cytoplazmatycznych izoform aktyny  $\beta$  i  $\gamma$  w procesie migracji komórek nowotworowych. Modele komórkowe użyte w pracy to migrujące mezenchymalnie komórki ludzkiego nowotworu piersi linii MDA-MB-231 oraz poruszające się ameboidalnie komórki ludzkiego nowotworu jelita grubego linii LS174T.

Uzyskane wyniki wskazują, iż poziom izoform  $\beta$  i  $\gamma$  aktyny w obu typach komórek jest zbliżony, zaś obydwie badane izoformy występują głównie w obszarze podbłonowym i w obrębie wypustek związanych z ruchem komórki – lamellipodiów i invadopodiów w komórkach migrujących mezenchymalnie oraz pęcherzyków migracyjnych w komórkach migrujących ameboidalnie.

W celu ustalenia roli aktyn w migracji, w badanych komórkach podwyższono poziom ekspresji genów kodujących obydwie cytoplazmatyczne aktyny. Komórki transfekowano plazmidami zawierającymi cDNA kodujące odpowiednio  $\beta$  lub  $\gamma$  aktynę. W obu typach komórek podwyższenie ekspresji genów obu cytoplazmatycznych izoform aktyny

spowodowało wzrost ich zdolności migracyjnych i inwazyjnych. Doprowadziło również do podwyższenia stopnia spolimeryzowania aktyny mierzonego stosunkiem ilości aktyny filamentarnej do monomerycznej. Egzogenne aktyny, obecne w komórkach wskutek transfekcji, występowały głównie w formie spolimeryzowanej i były zlokalizowane w obszarze podbłonowym. Ich obecność powodowała również wzrost zdolności obu typów komórek do tworzenia wypustek migracyjnych.

W kolejnym etapie badań przeanalizowano rolę cytoplazmatycznych izoform aktyny w tworzeniu inwadopodiów - struktur występujących w komórkach migrujących mezenchymalnie. Są one zbudowane m.in. z filamentarnej aktyny, białek oddziałujących z aktyną, integryn i posiadają zdolność proteolizy składników macierzy pozakomórkowej. Dotychczas nie ustalono, która z izoform aktyny buduje te wypustki. Uzyskane w pracy doktorskiej rezultaty wskazują, iż obie cytoplazmatyczne izoformy aktyny –  $\beta$  i  $\gamma$  są obecne w obrębie inwadopodiów tworzonych przez komórki MDA-MB-231 hodowane zarówno w środowisku 2D, jak i 3D. Wyniki te uzyskano z użyciem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko obu izoformom oraz poprzez wywołanie ekspresji znakowanych fluorescencyjnie aktyn w badanych komórkach. Ponadto wykazano, iż obie aktyny budują jednocześnie te same inwadopodia. Komórki o podwyższonej ekspresji genów kodujących cytoplazmatyczne aktyny tworzyły inwadopodia, których ilość i powierzchnia były większe niż w przypadku komórek kontrolnych.

*Podsumowując, uzyskane rezultaty wskazują, iż cytoplazmatyczne izoformy aktyny -  $\beta$  i  $\gamma$  są zaangażowane w proces migracji i inwazji komórek nowotworowych – zarówno tych wykorzystujących mezenchymalny, jak i ameboidalny typ ruchu. Obie izoformy wchodzi również w skład inwadopodiów – wypustek adhezyjnych o zdolnościach proteolitycznych, wspierających inwazję komórek poruszających się mezenchymalnie.*