

УДК 616-006.6

ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *SNAIL1*

© 2023 Н.И. Литовка*, И.Ю. Житняк#, Н.А. Глушанкова*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
115478 Москва, Россия; электронная почта: natglu@hotmail.com

Поступила в редакцию 01.09.2022

После доработки 27.10.2022

Принята к публикации 11.11.2022

Программа эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) используется опухолевыми клетками при активации инвазионно-метастатического каскада. С помощью конфокальной и видеомикроскопии нами изучены изменения цитоскелетных структур клеток линии рака молочной железы MCF-7 в ходе ЭМП при активации транскрипционного фактора *Snail1*. В работе была использована линия клеток MCF-7, стабильно экспрессирующая *tetOff*-регулируемую конструкцию *SNAIL1* (MCF-7-SNAIL1). При отмывке от тетрациклина и активации *Snail1* клетки MCF-7-SNAIL1 вступали в ЭМП и приобретали миграционный фенотип, сохраняя при этом экспрессию E-кадгерина. Мы выделили пять вариантов мезенхимального фенотипа, различающихся по морфологии клеток и скорости миграции. Мигрирующие клетки обладали выраженной пластичностью и были способны быстро изменять как фенотип, так и скорость движения. Как показала иммунофлуоресцентная микроскопия, в основе изменений фенотипа клеток MCF-7-SNAIL1 при ЭМП лежат *Ap2/3*-зависимая полимеризация актиновой сети в ламеллиподиях на ведущем крае, активация контрактильности миозина в зоне за ядром, перераспределение белков межклеточной адгезии из зон межклеточного взаимодействия на ведущий край и реорганизация сети промежуточных кератиновых филаментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолевая клетка, *Snail1/SNAIL1*, эпителиально-мезенхимальный переход, клеточная миграция, пластичность опухолевых клеток, межклеточная адгезия, цитоскелет, актин, миозин.

DOI: 10.31857/S0320972523010025, EDN: PAZYUU

ВВЕДЕНИЕ

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), в результате которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип и способность к миграции, играет важную роль в эмбриональном развитии [1]. Опухолевые клетки используют программу ЭМП для инициации инвазионно-метастатического каскада [2]. В опухолях активация ЭМП связана с дерегуляцией или активацией сигнальных путей (EGF, HGF, Wnt, TGF- β , IGF, Notch-сигналингом) в результате мутаций генов рецепторов и других компонентов сигнальных путей; сигналами от матрикса и от клеток опу-

холевого микроокружения; гипоксией [3–5]. Одним из признаков ЭМП является гиперэкспрессия транскрипционных факторов ЭМП из семейств *Snail*, *Twist*, *Zeb*, которые подавляют экспрессию эпителиальных генов и активируют экспрессию мезенхимальных генов [6, 7]. Во многих случаях опухолевые клетки, вступая в ЭМП, переходят в гибридное эпителиально-мезенхимальное состояние. Такое состояние не является стационарным, позволяя опухолевым клеткам претерпевать дальнейшие изменения, а также способствует их выживанию и диссеминации [8, 9].

Транскрипционный фактор *Snail1*, относящийся к семейству *Snail*, имеет четыре цинковых пальца, домены SNAG, NES и богатый серином SRD-домен. Основной мишенью *Snail1* является ген *CDH1*, продукт которого – белок межклеточных адгезионных контактов (АК) E-кадгерин [10–12]. Посредством цинковых пальцев *Snail1* связывается с

Принятые сокращения: ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; АК – межклеточные адгезионные контакты.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

Е-боксами (5'-CACCTG-3') промоторной области гена *CDH1*, а N-концевой SNAG-домен взаимодействует с корепрессорными комплексами, что приводит к репрессии транскрипции гена *CDH1* через эпигенетические модификации хроматина (метилование и деацетилирование гистонов H3 и H4) [6, 13]. При исследовании образцов рака молочной железы, рака желудка, рака толстой кишки и гепатокарцином была показана обратная корреляция между уровнем экспрессии Snail1 и E-кадхерина [14]. В клетках плоскоклеточной карциномы полости рта было обнаружено также, что Snail1 может активировать эндоцитозный путь деградации E-кадхерина [15]. Подавление экспрессии или аккумуляции E-кадхерина на цитоплазматической мембране сопровождается разрушением АК, что приводит к ослаблению связи опухолевой клетки с соседними клетками, активирует миграцию, инвазию и метастазирование [10, 11]. Наряду с E-кадхерином, Snail1 подавляет также экспрессию других эпителиальных маркеров, таких как белки клеточной полярности Crumbs3, Pals1, Patj, белки плотных контактов окклюдин и клаудины, белки десмосом десмоплакин и плакофилин, цитокератины 17, 18, 19, 20, интегрины $\alpha 6$, $\beta 4$ [10, 11, 16–20]. Snail1 рекрутирует коактиваторы к промоторам мезенхимальных генов, и тем самым индуцирует экспрессию виментина, N-кадхерина, металлопротеиназ MT1-MMP, MMP 1, 2, 7, интегринов $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$, коллагена, фибронектина, клаудина 11, что может стимулировать миграцию опухолевых клеток [11, 21–23]. В тестах *in vitro* показано, что экспрессия экзогенного Snail1 индуцирует миграционную и инвазивную активность эпителиальных клеток [24]. Оверэкспрессия Snail1 обнаружена на инвазивном фронте многих карцином [11, 25]. В опухолевых клетках, экспрессирующих Snail1, индукцию миграции связывают с активным Rac1 [21, 26]. Также показано, что в клетках рака простаты Snail1 подавляет экспрессию RKIP (Raf kinase inhibitor protein) – ингибитора Raf/MEK/ERK и NF- κ B сигнальных путей, вовлеченных в активацию метастазирования [27]. Вместе с тем до настоящего времени остаются практически не изученными изменения структур цитоскелета, определяющие возникновение миграционного фенотипа у опухолевых клеток при активации драйвера ЭМП – Snail1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии, антитела и реагенты. В работе использовали линию рака молочной

железы человека MCF-7 и ее производную MCF-7-SNAI1 с tetOff-регулируемой экспрессией гена *SNAI1* [28]. В работе также использовали линию эпителия молочной железы человека MCF-10A («ATCC», США). Клеточные линии предоставлены проф. А. Готро.

В работе использовали первичные мышечные моноклональные антитела: анти-E-кадхерин, клон 36 и анти- β -катенин, клон 14 («BD Transduction Laboratories», США); анти- β -актин, клон 4C2 («Merck Millipore», США); анти- α -тубулин, клон DM1A; анти-винкулин, клон hVin1; анти- α -актинин-1, клон BM-75.2; анти- γ -тубулин, клон GTU88 («Sigma-Aldrich», США); анти- α -катенин, клон 15D9 («Enzo», США), анти-кератин-8, клон H1 [29], кроличьи поликлональные антитела: анти-p34-Arc/ARPC2 («Upstate, Merck», Германия), анти-фосфорилированные легкие цепи миозина («Cell Signaling Technology», США), анти-Snail1 и крысиные поликлональные антитела, анти-Snail1 («Cell Signaling Technology»). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с флуорохромами AlexaFluor 488, AlexaFluor 594 или AlexaFluor 647 («Jackson ImmunoResearch», США). В качестве вторичных антител для Вестерн-блоттинга также использовали вторичные антитела козы к иммуноглобулинам мыши и крысы, конъюгированные с пероксидазой («Jackson ImmunoResearch»). Также использовали флуоресцентные красители, которые добавляли вместе со вторичными антителами: Phalloidin, конъюгированный с AlexaFluor 488 («Molecular Probes», США) или с TRITC («Fluka», США); DAPI («Sigma-Aldrich»).

Видеомикроскопия, обработка видео и кимограммы. DIC (differential interference contrast)-видеомикроскопию проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ti («Nikon», Япония) с использованием объектива Plan Apo 20 \times /0.75 DIC N2 («Nikon») на разных сроках отмывки клеток от тетрациклина (24, 48, 72 ч). Для съемки использовали 35-мм чашки со стеклянным дном («MatTek Corporation», США) или меченые стекла («Bellco Biotechnologies», США), помещенные в 35-мм чашки со стеклянным дном («Greiner Bio-One», Австрия). Непосредственно перед съемкой культуральную среду DMEM («Sigma-Aldrich») заменяли на DMEM/F12 («Sigma-Aldrich»). Съемку проводили с частотой 1 кадр в мин. С помощью программы ImageJ 1.53C («NIH», США) и плагина Manual Tracking были определены координаты клеток для построения треков и анализа характера их перемещения. С помощью программы Excel были построены диаграммы и графики. Для построения кимограмм клеточного края

снимали видео с частотой 1 кадр в 4 с с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti с объективом Plan Apo VC 100×/1.40 Oil («Nikon»). С помощью программы ImageJ и плагина Multi KymoGraph были построены кимограммы вдоль вектора перемещения клетки. Ширина линии для построения кимограммы – 1 пиксель.

Коиммунопреципитация и Вестерн-блоттинг.

Для лизирования клеток использовали буфер (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,025% Na-дезоксихолат, PIC (коктейль ингибиторов протеаз, «Roche» США). Для промывок использовали Wash-буфер (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA). При проведении коиммунопреципитации клеточные лизаты инкубировали 20 мин с антителами, затем добавляли Protein-G агарозу («Invitrogen», «Thermo Fisher Scientific», США) на 2,5 ч. Вестерн-блоттинг проводили стандартным способом с помощью ячейки Bio-RAD («Bio-RAD Laboratories», США): вертикальный электрофорез в 10%-ном ПААГ, затем перенос на мембрану Hybond™-C или Hybond™-P («Amersham», Великобритания).

Флуоресцентная микроскопия, анализ флуоресцентных изображений. Для флуоресцентного окрашивания клетки фиксировали 3,7%-ным параформальдегидом с последующей пермеабиллизацией 0,25% (w/v) Triton X-100 или 1%-ным параформальдегидом с дофиксацией метанолом. Для флуоресцентной микроскопии использовали микроскоп Nikon Eclipse Ti с объективом Plan Fluor 40×/1.30 oil DIC H/N2 («Nikon») и сканирующий лазерный конфокальный микроскоп Leica SP5 («Leica», Германия) с объективом PL APO HCX 63×/1.40-0.60 oil («Leica»). Для отслеживания конкретных фенотипов и поведения клеток непосредственно перед фиксацией проводили DIC-видеомикроскопию на меченых стеклах, которые затем окрашивали для со-

поставления сюжетов. С помощью программы ImageJ проводили измерения интенсивности флуоресценции (ИФ) Snail1 в ядрах, используя параметр Mean Grey Value (MGV) для ядра и околоядерной зоны (фона). Далее вычисляли ИФ по формуле:

$$\text{ИФ} = (\text{MGV}_{\text{ядра}} - \text{MGV}_{\text{фона}}) / \text{MGV}_{\text{фона}}$$

Диаграммы строили в программе GraphPad Prism 6 («GraphPad Software», США).

Статистическая обработка данных. При статистической обработке использовали *t*-критерий Стьюдента и *h*-критерий Краскела–Уоллиса (для объединенных выборок). Данные представляли как средние значения ± ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы было изучение миграционной активности опухолевых клеток, вступивших в ЭМП при активации Snail1, анализ цитоскелетных структур, определяющих изменения клеточной морфологии при прохождении ЭМП. В работе была использована культура клеток линии рака молочной железы MCF-7, стабильно экспрессирующей tetOff-регулируемую конструкцию *SNAIL1* (MCF-7-SNAI1) [28]. При наличии в культуральной среде тетрациклина клетки MCF-7-SNAI1 сохраняли фенотип, близкий к фенотипу родительской линии MCF-7, образуя островки плотно сцепленных клеток. В редкой культуре одиночные клетки MCF-7-SNAI1 имели два варианта фенотипа: дискоидные распластанные клетки с невысокой ламеллярной активностью по всему периметру (M0) и неполяризованные клетки, образующие дискретные протрузии (M1). Клетки обоих фенотипов не меняли местоположение (рис. 1).

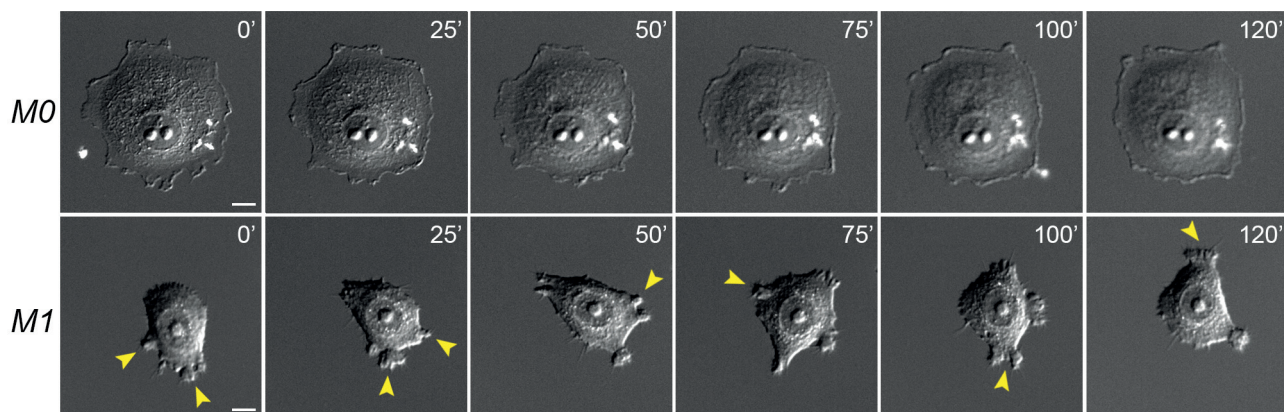


Рис. 1. Клетки MCF-7-SNAI1 в присутствии тетрациклина (tet+, контроль), варианты фенотипов. Флажками указаны протрузии. DIC-видеомикроскопия. Шкала – 10 мкм

При отмывке от тетрациклина клетки MCF-7-SNAI1 уже через 4 ч начинали экспрессировать Snail1, а к 24 ч его содержание в клетках (при определении Вестерн-блоттингом) выходило на плато (рис. 2). Уровень экспрессии Snail1, анализируемый по интенсивности флуоресценции ядер на препаратах, окрашенных специфическими антителами к Snail1, мог различаться значительно, в некоторых клетках MCF-7-SNAI1 в среде без тетрациклина Snail1 не определялся совсем. По данным Vetter et al. [30], получивших линию MCF-7-SNAI1, уровень экспрессии мРНК E-кадгерина при активации Snail1 снижался в 3–4 раза, однако на уровне белка исследования не проводились. Вместе с тем при анализе содержания E-кадгерина в клетках MCF-7-SNAI1 с использованием Вестерн-блоттинга мы не обнаружили снижения уровня его экспрессии при активации Snail1 (рис. 2, з). При анализе клеточных лизатов с помощью коиммунопреципитации было обнаружено, что на протяжении 96 ч после начала отмывки от тетрациклина в клетках сохранялись белковые комплексы межклеточной адгезии, включающие E-кадгерин, α -катенин и β -катенин. Сохранение высокого уровня экспрессии эпителиальных генов, в частности E-кадгерина, и включение его в состав АК в клетках MCF-7, трансфицированных трансгеном *SNAI1 6SA*, продукт которого

более стабилен по сравнению со *SNAI1*, также было показано недавно в работе Wee et al. [31]. Ранее при изучении панели из более чем 60 опухолевых линий было обнаружено, что содержание E-кадгерина в клетках не коррелирует с уровнем экспрессии SNAI1, в отличие от транскрипционных факторов Snail2, TCF8 и ZFH1B [32]. Экспрессия E-кадгерина в клетке может регулироваться на нескольких уровнях, включая метилирование промотора E-кадгерина, регуляцию на уровне транскрипции и трансляции, при этом микроРНК регулируют уровень экспрессии транскрипционных факторов ЭМП.

Вместе с тем Snail1, не влияя на уровень экспрессии E-кадгерина, приводил к появлению миграционной активности у клеток MCF-7-SNAI1: при активации Snail1 клетки утрачивали эпителиальный фенотип, выходили из островков и мигрировали по подложке, то есть входили в ЭМП (рис. 3, а). Как показало конфокально-микроскопическое исследование, радикальное изменение морфологии и приобретение клетками MCF-7-SNAI1 мезенхимального фенотипа при активации Snail1 было связано с реорганизацией актинового цитоскелета, полимеризацией актина на свободном крае, что определяло образование активных протрузий, а также с разрушением стабильных АК (рис. 3, б). В контрольной культуре

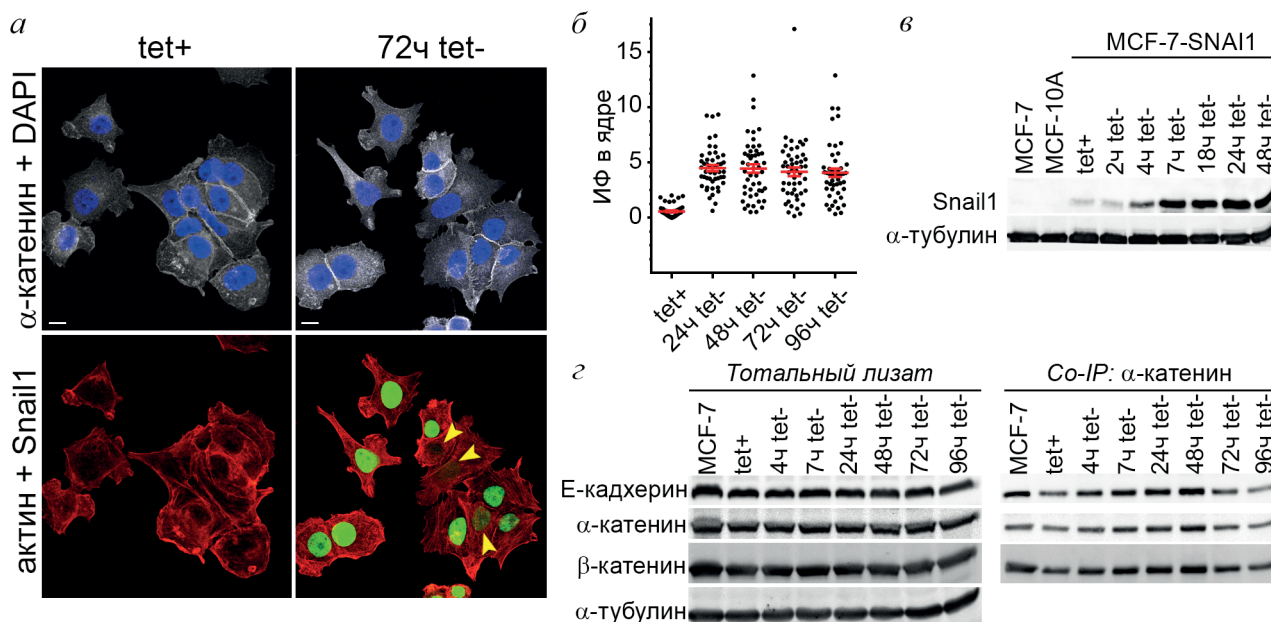


Рис. 2. Активация Snail1 в клетках MCF-7-SNAI1 при отмывке от тетрациклина. *а* – Snail1 (зеленый канал) в ядрах при отмывке клеток от тетрациклина. Иммунофлуоресцентное окрашивание. Флажки указывают на ядра с низкой экспрессией Snail1. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. *б* – Диаграмма интенсивности флуоресценции Snail1 в ядрах на разных сроках отмывки от тетрациклина. Среднее значение \pm ошибка среднего, $n = 55$. *в* – Вестерн-блоттинг лизатов клеток MCF-7, MCF-10A и MCF-7-SNAI1 на разных сроках отмывки от тетрациклина. *г* – Коиммунопреципитация белков межклеточных адгезионных контактов в клетках MCF-7 и MCF-7-SNAI1 на разных сроках отмывки от тетрациклина. α -Тубулин – маркер загрузки

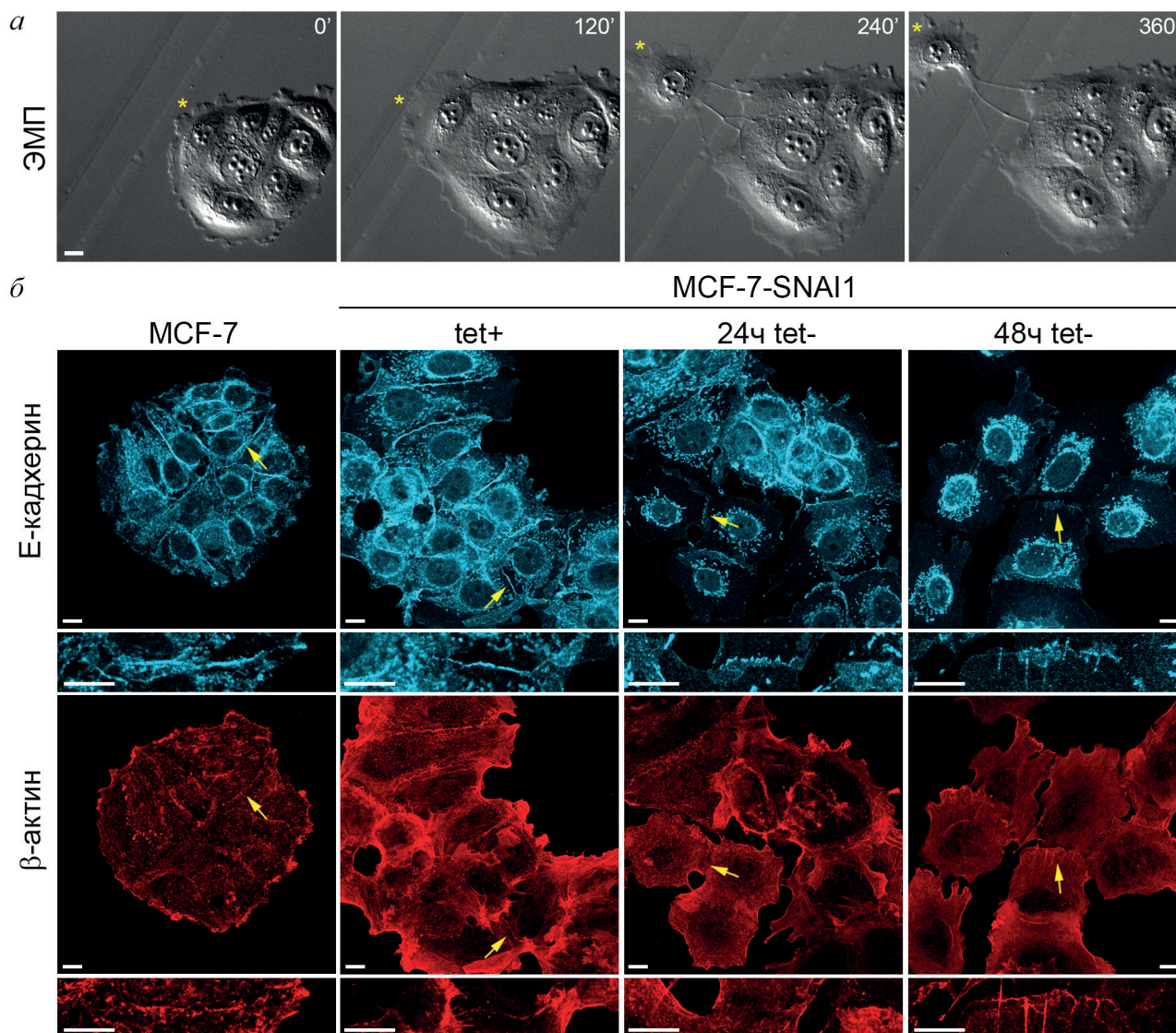


Рис. 3. ЭМП клеток MCF-7-SNAI1 при отмывке от тетрациклина. *a* – DIC-видеомикроскопия (начало съемки – 24 ч tet–). Выход клетки из островка (помечена звездочкой). Шкала – 10 мкм. *б* – Окрашивание на E-кадгерин и β -актин. Контрольные клетки MCF-7 и MCF-7-SNAI1 tet+, клетки MCF-7-SNAI1 tet– на разных сроках отмывки от тетрациклина. Стрелками отмечены межклеточные контакты, показанные ниже при большем увеличении. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм

контактирующие клетки MCF-7-SNAI1 так же, как и исходные клетки MCF-7, образовывали плотные островки, в апикальной части которых располагались узкие кольцевые актиновые пучки, ассоциированные со стабильными тангенциальными АК, образованными кадгерин-катениновыми комплексами. На свободных краях в некоторых клетках были видны краевые актиновые пучки. В клетках, вступивших в ЭМП при активации Snail1, происходила фрагментация или полное разрушение кольцевого актинового пучка, на межклеточных границах появлялись ламеллиподии. Вместе с тем клетки могли сохранять контакты друг с другом, однако тангенциальные АК в зонах межклеточных взаимодействий во многих случаях

замещались радиальными или точечными АК. Радиальные АК могли быть ассоциированы с прямыми актиновыми пучками. Как мы показали ранее [33, 34], радиальные и точечные контакты нестабильны. Клетки MCF-7-SNAI1 при активации Snail1, несмотря на сохранение экспрессии E-кадгерина, также утрачивали стабильную межклеточную адгезию, они отрывались от соседних клеток и мигрировали по субстрату.

Важным событием, определяющим ослабление межклеточной адгезии в ходе ЭМП, является фрагментация кольцевого актинового пучка, который отвечает за стабильность тангенциальных E-кадхериновых АК, характерных для эпителия [34]. Мы предложили гипотезу,

объясняющую закономерности превращения неподвижных эпителиоцитов в мигрирующие клетки, разрывающие связи с соседними клетками. Согласно этой гипотезе, разрушение кольцевого актинового пучка при активации ЭМП приводит к высвобождению мономерного актина. В свете имеющихся данных о существовании в клетке конкуренции между актиновыми системами за глобулярный актин [35], высвобождение G-актина из разрушающегося кольцевого актинового пучка на ранних этапах ЭМП может приводить к включению актина во вновь образующуюся сеть ламеллиподий, что стимулирует миграцию.

Полимеризация актиновой сети, определяющая образование ламеллиподий, лежит в основе мезенхимального типа миграции. Клетки, экспрессирующие Snail1, активно образовывали ламеллиподии на свободном крае (рис. 3, *a*). Хорошо известно, что малая ГТФаза Rac индуцирует WAVE2-зависимую полимеризацию актина и образование ламеллиподий [36]. Ранее было показано, что Rac1 активирует миграцию клеток рака поджелудочной железы, экспрессирующих экзогенный Snail1 [21]. Ключевую роль в формировании сети актиновых филаментов в составе ламеллиподий и мезенхимальной миграции играет комплекс Arp2/3 [37]. При конфокально-микроскопическом исследовании клеток MCF-7-SNAI1 с активным Snail1 мы обнаружили аккумуляцию белка ArpC2, входящего в комплекс Arp2/3, на внешнем крае формирующихся ламеллиподий (рис. 4, *a*). Как показало окрашивание на винкулин, в активно мигрирующих клетках ламеллиподии прикреплялись к подложке посредством многочисленных мелких фокальных адгезий (рис. 4, *a*), в отличие от крупных штриховых фокальных адгезий, типичных для контрольных клеток, хорошо прикрепленных к подлежащему субстрату. Клетки с активированным Snail1 также отличались от контрольных клеток внутриклеточным распределением актин-связывающих белков α -катенина и α -актинина-1. В контрольных клетках MCF-7-SNAI1 α -катенин входил в состав тангенциальных АК. α -Катенин играет важную роль в привлечении актина в зоны межклеточной адгезии и стабилизации АК [38]. В клетках MCF-7-SNAI1 с активным Snail1 α -катенин, наряду с участием в построении АК, перемещался на ведущий край активно мигрирующих клеток. В узкой зоне активной полимеризации актина также аккумуляровался другой актин-связывающий белок — α -актинин-1 (рис. 4). Таким образом, входение в ЭМП при активации Snail1 сопровождалось кардинальной реорганизацией актинового цитоскелета,

перераспределением α -катенина и α -актинина-1 на ведущий край клеток. Недавно было показано, что взаимодействие α -катенина с винкулином необходимо для распластывания фибробластов и механо-сенсинга подлежащего субстрата [39]. Ранее было показано, что α -актинин-1 участвует в сборке актина в инвадоподиях, и его нокдаун угнетает образование инвадоподий клетками рака молочной железы [40]. Мы предполагаем, что оба этих актин-связывающих белка могут быть вовлечены в активацию образования ламеллиподий при прохождении клетками ЭМП.

Мы также исследовали положение центра организации микротрубочек, ассоциированных с центросомой, в мигрирующих клетках. Для этого после 6 ч видеосъемки клеток 24 ч tet- на меченых стеклах проводили окрашивание на маркер центра организации микротрубочек — γ -тубулин. С помощью разметки на меченом стекле отыскивали отснятые с помощью DIC-микроскопии сюжеты и снимали их с помощью флуоресцентной микроскопии. Центр организации центросомальных микротрубочек был виден не во всех клетках, однако во многих мигрирующих клетках MCF-7-SNAI1 он выявлялся сзади ядра. Как недавно стало ясно, такое его положение определяется балансом сил, влияющих на сеть микротрубочек со стороны актина—миозина [41].

Культура клеток MCF-7-SNAI1, вошедших в ЭМП при активации Snail1, отличалась значительной гетерогенностью. Уже через 24 ч после начала отмывки от тетрациклина при видеомикроскопическом исследовании можно было видеть мигрирующие клетки с мезенхимальным фенотипом. Клетки различались существенно как по форме, так и по скорости миграции. Мы выделили пять вариантов мезенхимальных фенотипов (рис. 5 и 6, *a*): 1) клетки с фибробласто-подобным фенотипом, образующие широкие плоские ламеллиподии на ведущем крае и хвостовую часть, прикрепленную к подложке (M2); 2) быстро мигрирующие кератоцитоподобные клетки с активным ведущим краем, не имеющие хвостовой части (M2к); 3) медленно мигрирующие поляризованные клетки со складчатой ламеллой, в которую могло смещаться ядро, и хвостовой частью (M3); 4) быстро мигрирующие клетки, не имеющие хвостовой части, в ведущей ламелле которых располагалось ядро (M4); 5) клетки с промежуточным мезенхимально-амебоидным фенотипом, образующие как ламеллиподии, так и блябы (MА). Клетки могли также не проявлять направленной миграционной активности (M0 — малоподвижный фенотип и M1 — фенотип,

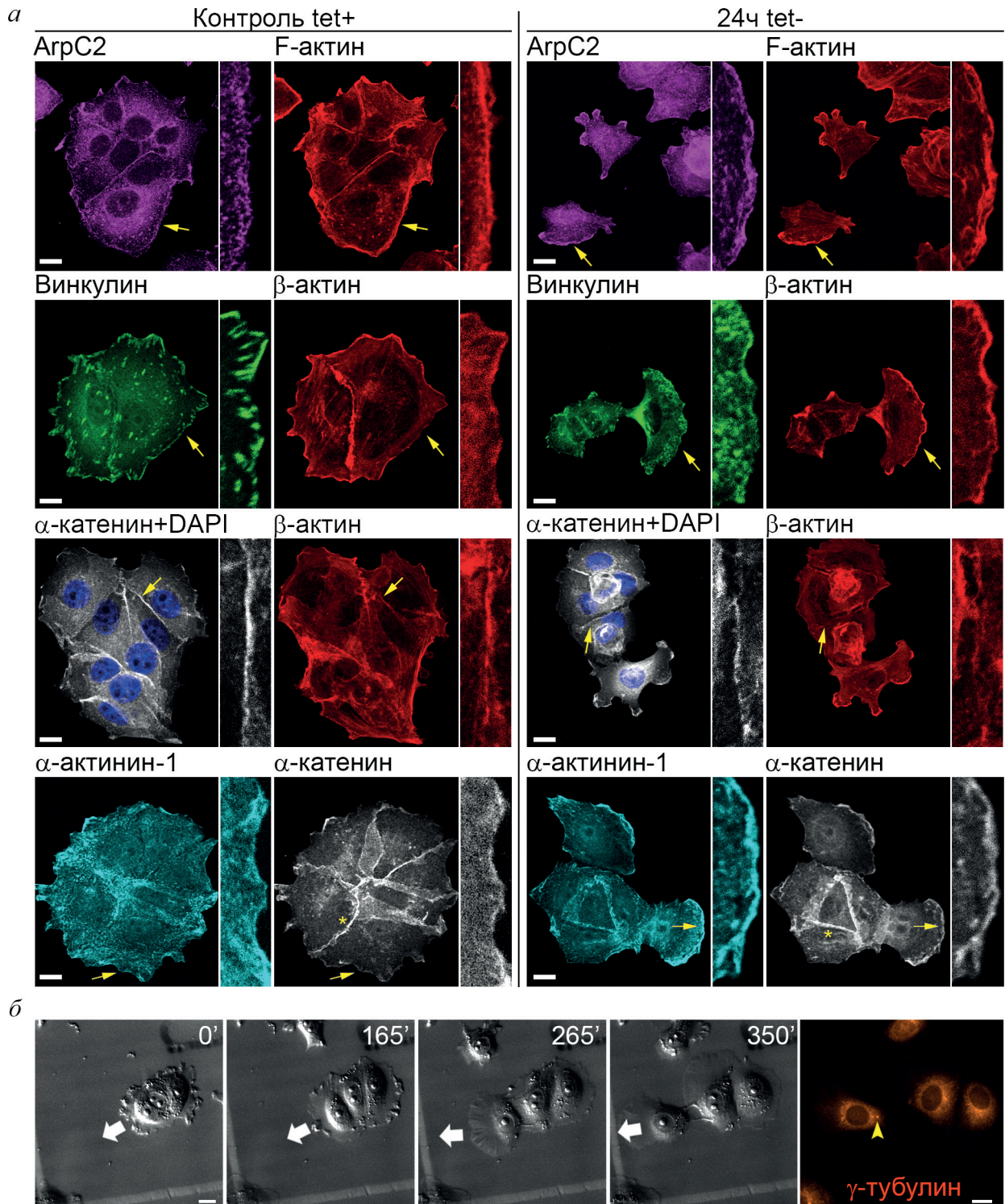


Рис. 4. Актиновый цитоскелет, межклеточные адгезионные контакты, актин-связывающие белки и центр организации микротрубочек в клетках MCF-7-SNAI1, проходящих ЭМП при индукции Snail1. *а* – Флуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия. Стрелки указывают на зоны врезок. Звездочками отмечены АК. *б* – Положение центра организации микротрубочек (флажок) в клетке, проходящей ЭМП. Слева – кадры видеосъемки. Стрелка показывает направление миграции клетки из островка. Справа – окрашивание на γ -тубулин. Шкала – 10 мкм

у которого протрузии образуются не направленно). Мезенхимальная миграция, сопровождающаяся перемещением ядра на ведущий край, описана нами впервые.

С помощью DIC-микроскопии на разных сроках отмывки от тетрациклина анализировали поведение клеток в культуре. Были определены скорость, пройденный путь и дистанция,

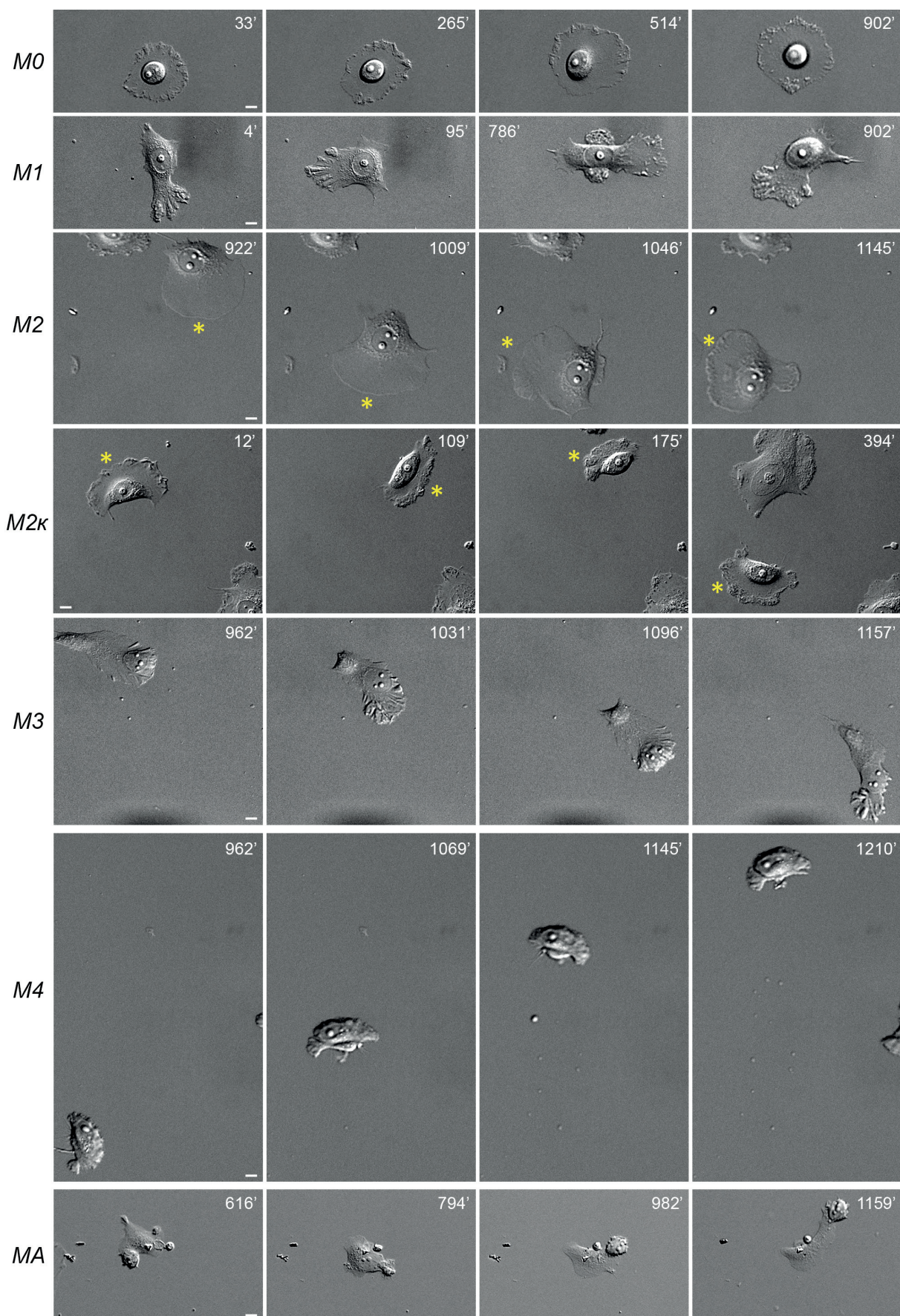
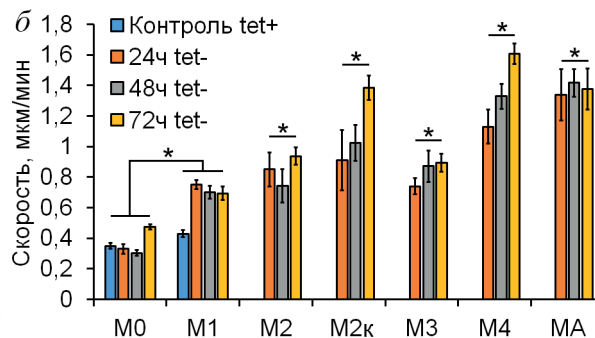


Рис. 5. Варианты фенотипов клеток MCF-7-SNAI1 при отмывке от тетрациклина (72 ч tet-). Звездочки маркируют клетку с определенным фенотипом, если в кадре больше одной клетки. DIC-видеомикроскопия. Шкала – 10 мкм

a Соотношение фенотипов, %

	M0	M1	M2	M2к	M3	M4	MA
Контроль tet+ (107)	36	64					
24ч tet- (147)	10	61	5	3	6	7	8
48ч tet- (135)	22	38	12	4	5	10	9
72ч tet- (207)	20	22	18	6	6	16	12



б

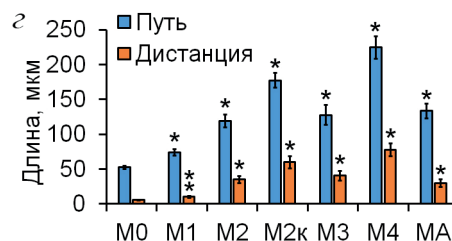
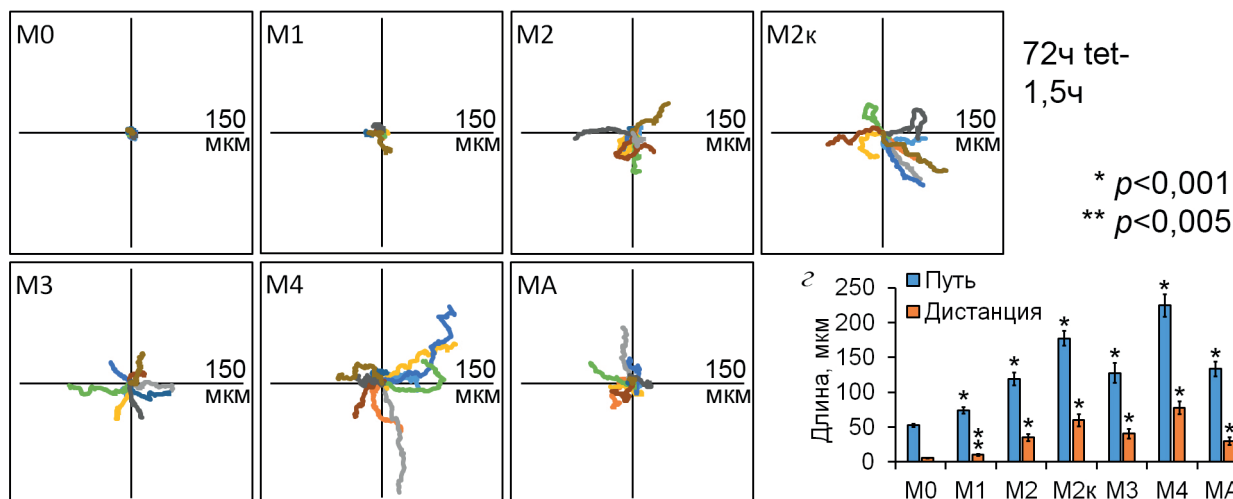


Рис. 6. Фенотипы клеток MCF-7-SNAI1. *a* – Встречаемость фенотипов в культуре на разных сроках отмывки от тетрациклина в процентах. *б* – Скорости миграции клеток различных фенотипов (h-критерий Краскела–Уоллиса, скорости клеток с определенным фенотипом относительно скоростей клеток M0 и M1). *в* – Траектории движения клеток различных фенотипов за 1,5 ч (72 ч tet–), $n = 10$. *г* – Средние значения пройденного за 1,5 ч пути и дистанции, на которую удалились клетки от начальной точки, для разных фенотипов (*t*-критерий Стьюдента относительно M0 и M1)

на которую переместились клетки, построены траектории движения 10 клеток каждого фенотипа за 1,5 ч видеонаблюдения (рис. 6, *в–г*). Наиболее быстро мигрирующими клетками были клетки с фенотипами M2к и M4 через 72 ч после начала отмывки от тетрациклина.

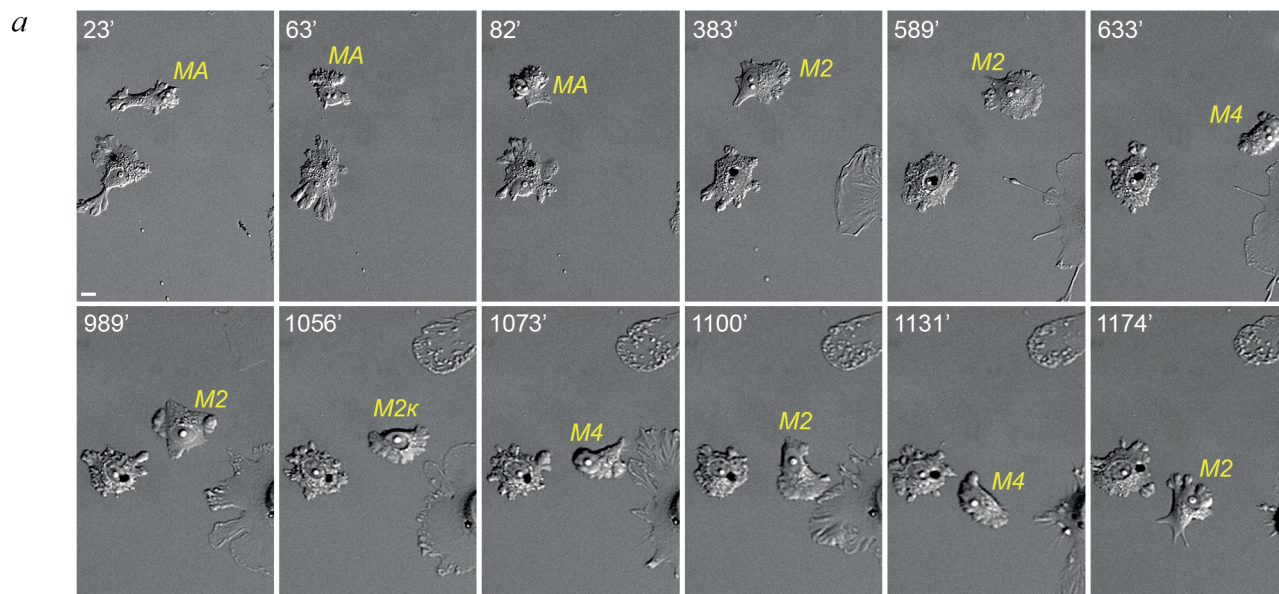
Важнейшей характеристикой опухолевых клеток MCF-7-SNAI1, вошедших в ЭМП при активации Snail1, была фенотипическая пластичность: клетки в течение нескольких минут могли менять свой фенотип, направление и скорость миграции (рис. 7).

Как видно из таблицы (рис. 7, *б*), в контроле (в присутствии тетрациклина) клетки имели только фенотипы M0 и M1, контрольные клетки значительно чаще переходили из M1 к более распластанному фенотипу M0. Через 24 ч после начала отмывки от тетрациклина и активации Snail1 можно было наблюдать несколько вариантов переходов. Самыми частыми были переходы M1 → M4 и M1 → M3. Далее (через 48–72 ч после начала отмывки от тетрациклина) наблюдалось еще большее разнообразие вариантов переходов. Самыми частыми вариантами переходов через 48 ч после начала отмывки от

тетрациклина были M1 → M4 и M1 → M0. В культуре клеток через 72 ч после начала отмывки от тетрациклина фенотип клеток становился более стабильным, значительная часть клеток могла в течение 1,5–2 ч поддерживать определенную морфологию, что не коррелировало с уровнем экспрессии Snail1. Молекулярные механизмы, приводящие к смене фенотипов, на данный момент не ясны и требуют дальнейшего изучения.

При большем увеличении мы исследовали характер образования протрузий клеток и с использованием плагина Multi Kymograph построили кимограммы, отражающие динамику протрузий на активном крае клеток и смещение активного края в результате миграции (рис. 8, *а*). Активный край клеток MCF-7-SNAI1 с мезенхимальным фенотипом был образован непрерывно формирующимися ламеллиподиями, во многих клетках более проксимальная часть ламеллы становилась объемной, образование таких вздутий связано, по-видимому, с дефектностью актинового кортекса в опухолевых клетках (рис. 8).

Были изучены особенности организации цитоскелетных структур в клетках MCF-7-SNAI1,

*b*

<i>tet</i> ⁻ , %		M0	M1	M2	M2к	M3	M4	MA
Контроль <i>tet</i> ⁺ (10 переходов)	M0		10					
	M1	90						
	M2							
	M2к							
	M3							
	M4							
	MA							
24ч <i>tet</i> ⁻ (53 перехода)	M0							
	M1	4		10	6	17	25	8
	M2	4	2				2	2
	M2к		2					
	M3		8					
	M4		4					
	MA		10					
48ч <i>tet</i> ⁻ (66 переходов)	M0							2
	M1	20		9	6	6	15	
	M2	5	6			2	2	
	M2к	3	3					
	M3		2	2				
	M4	2	3	2		2		2
	MA	3	5			2	2	
72ч <i>tet</i> ⁻ (99 переходов)	M0		9	4				
	M1	8		5		1	7	3
	M2	4	1		6	1	5	
	M2к		1	6			1	
	M3	1	1	2			2	1
	M4	1	7	5	1	3		3
	MA		5	3			2	

Рис. 7. Варианты переходов между различными фенотипами клеток MCF-7-SNAI1. *a* – DIC-видеомикроскопия клеток MCF-7-SNAI1 (72 ч *tet*⁻). Шкала – 10 мкм. *b* – Результаты анализа видео, 24-часовая съемка. Строки – исходные фенотипы, столбцы – конечные фенотипы. Значения указаны в процентах от общего числа переходов для каждой временной точки отмычки от тетрациклина

имеющих различный миграционный фенотип: проведено флуоресцентное окрашивание актина, миозина и промежуточных филаментов. Как известно, одним из основных белков, определяющих перестройки актинового цитоскелета, является миозин, контрактильная функция которого активируется при фосфорилировании легких цепей миозина [42]. Активный миозин можно детектировать специфическими антителами к фосфорилированным легким цепям миозина (p-MLC). В контрольной культуре MCF-7-SNAI1 в присутствии тетрациклина активный миозин в составе тонких акто-миозиновых пучков детектировался в цитоплазме (рис. 9).

Промежуточные филаменты в клетках MCF-7 представлены кератинами, нами были использованы антитела к кератину-8. Керати-

новые филаменты формировали сеть, заполняя всю цитоплазму и концентрируясь вокруг ядра (рис. 10, *a*). Известно, что промежуточные филаменты в клетках стабилизируют положение ядра и его форму [43].

В клетках с мезенхимальным фенотипом M2 на ведущем крае собиралась сеть актиновых микрофиламентов, сеть промежуточных филаментов в этой зоне была более разреженной, более плотная сеть промежуточных филаментов концентрировалась за ядром. Акто-миозиновые пучки, включающие фосфо-миозин, располагались вдоль боковых краев клетки. Такие пучки ограничивают псевдоподиальную активность и определяют подтягивание задней хвостовой части клетки во время движения. В клетках M2к, как и в кератоцитах, актин образовывал сеть микрофиламентов в ламеллиподиях на ведущем

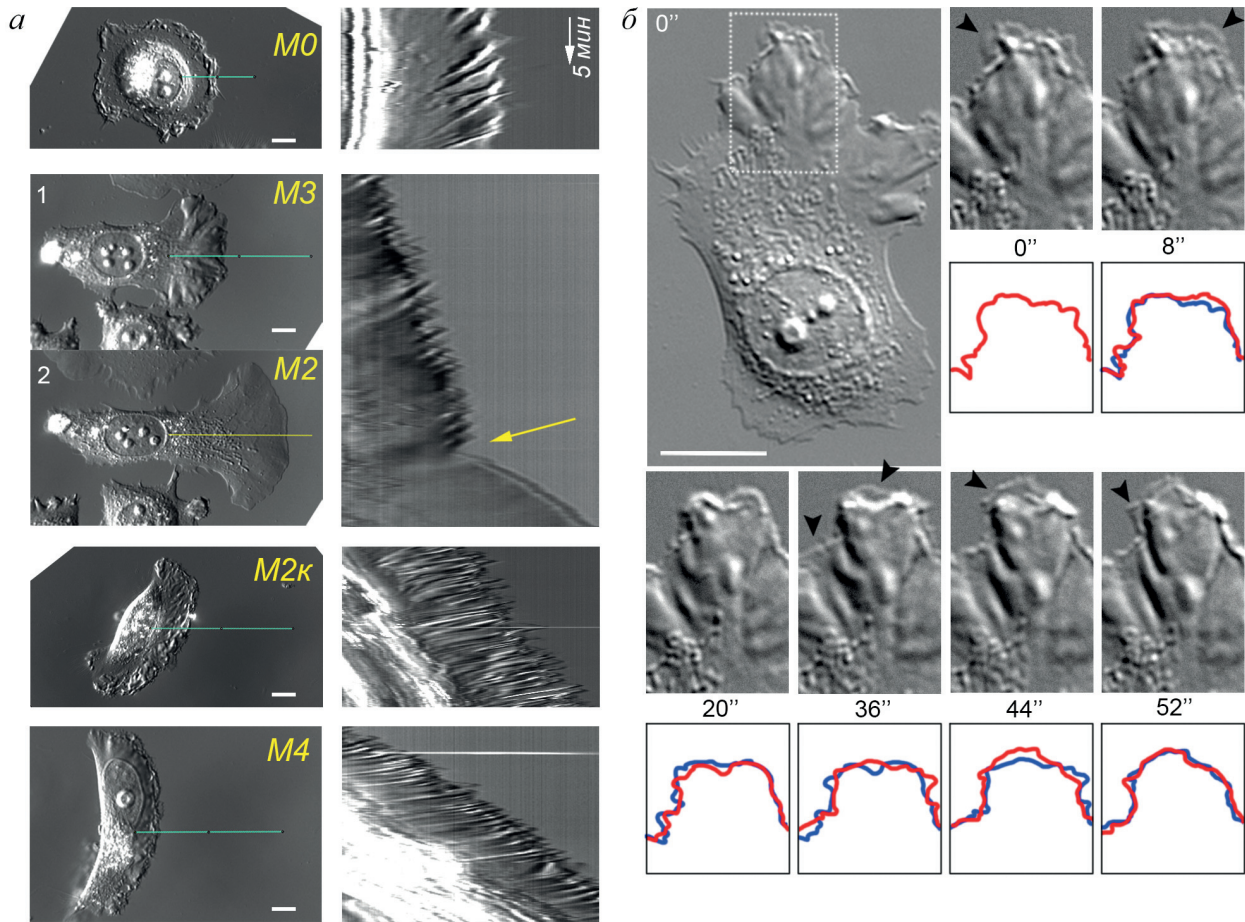


Рис. 8. Динамика активного края клеток MCF-7-SNAI1 (72 ч tet⁻). *a* – Кимограммы активного края. Слева – клетка в начальной точке построения кимограммы (голубая линия), или в конечной точке (желтая линия). Справа – соответствующая кимограмма. Цифрами 1 и 2 обозначены две временные точки одного сюжета, между которыми произошла смена типа выбрасываемой протрузии (желтая стрелка на кимограмме). Шкала – 10 мкм. Временная шкала (5 мин) соответствует длине белой стрелки. *б* – Образование протрузий на активном крае. DIC-видеомикроскопия, интервалы в секундах. Флажки указывают на вновь формирующиеся ламеллиподии. Кадры из видеомикроскопии продублированы контуром края клетки, где красная линия отражает текущий контур, а синяя линия дублирует контур из предыдущей показанной временной точки для сравнения

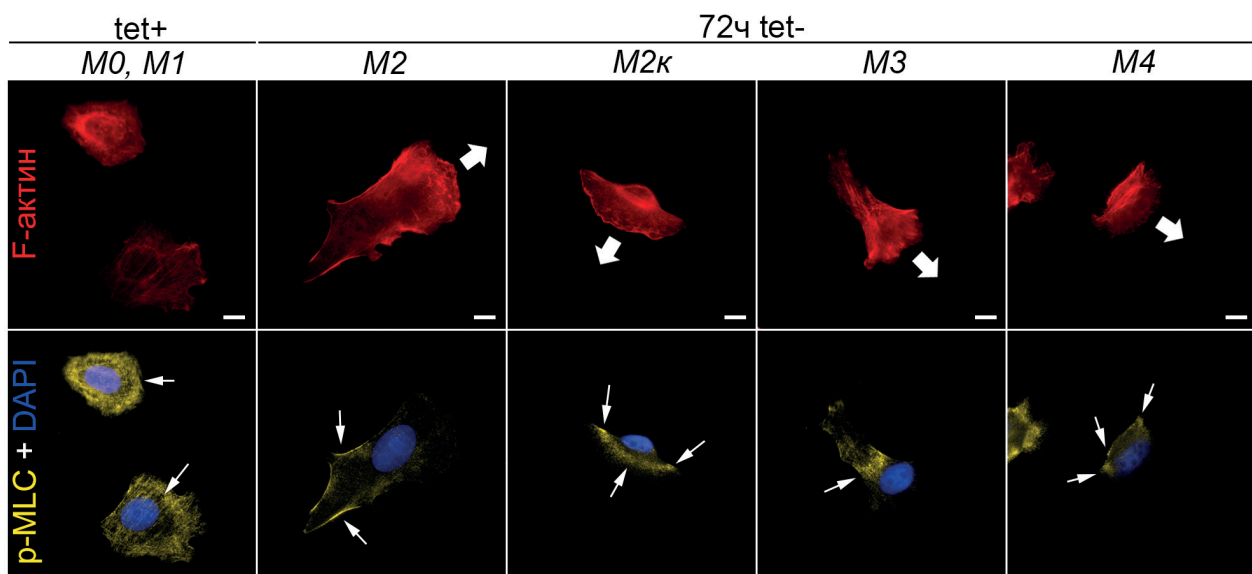


Рис. 9. Распределение актинового цитоскелета и фосфорилированных легких цепей миозина (p-MLC) в клетках MCF-7-SNAI1 разных фенотипов. Толстые стрелки показывают направление клеточной миграции. Тонкие стрелки указывают на локализацию p-MLC. Флуоресцентная микроскопия. Шкала – 10 мкм

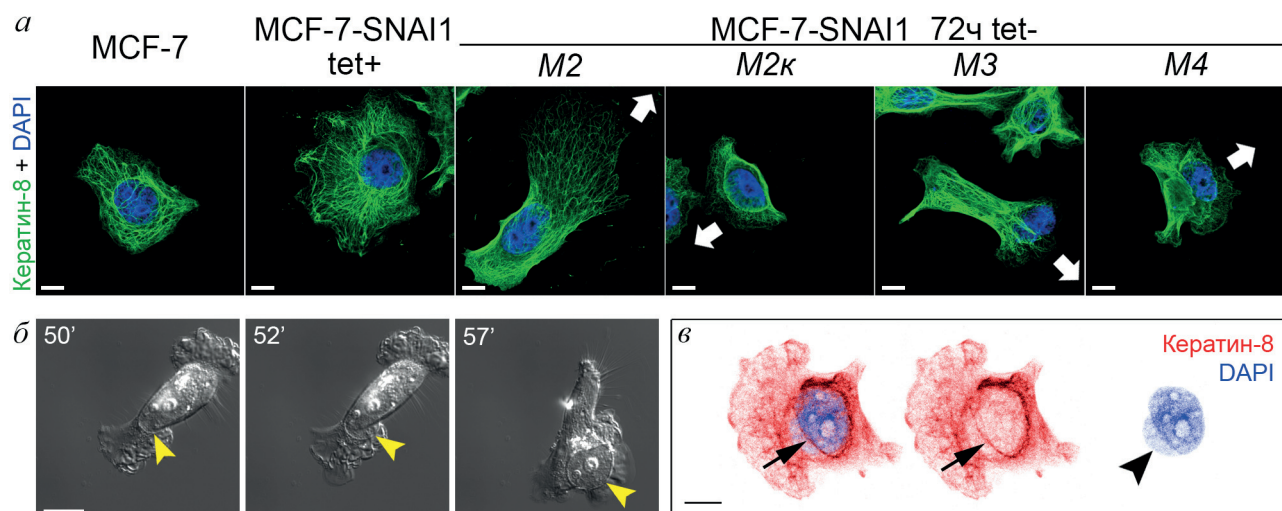


Рис. 10. Локализация ядра и промежуточных филаментов в клетках разных фенотипов. *a* – Распределение кератина-8 в клетках MCF-7 и MCF-7-SNAI1 разных фенотипов. Стрелки показывают направление клеточной миграции. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. *б* – Клетка MCF-7-SNAI1 (72 ч tet⁻) выталкивает ядро на край. DIC-видеомикроскопия. Шкала – 10 мкм. Флажки указывают на ядро. *в* – Клетка MCF-7-SNAI1 (24 ч tet⁻) с деформированным ядром, которое переходит в ламеллу (переход M1/M2 → M4). Стрелкой показаны промежуточные филаменты, концентрирующиеся вокруг ядра. Флажком показана деформированная часть ядра. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм

крае и арко-подобный, содержащий фосфомиозин, пучок, параллельный ведущему краю, над ядром концентрировались кератиновые промежуточные филаменты. Полимеризация актиновой сети и сокращение арко-подобных пучков определяют перемещение таких клеток. В клетках с M3-фенотипом актиновые микрофиламенты заполняли всю цитоплазму, а фосфорилированный миозин концентрировался за ядром. Можно предположить, что сокращение акто-миозиновых пучков в этой области обуславливало выталкивание ядра на клеточный край. Промежуточные филаменты при этом смещались в заднюю часть клетки. В клетках с фенотипом M4 акто-миозиновые пучки, ориентированные параллельно ведущему краю, располагались за ядром, их сокращение, по-видимому, и приводило к перемещению ядра на ведущий край. Мы предполагаем, что особенности миграции клеток MCF-7 с активированным SNAI1 определяются не только активной полимеризацией актина на ведущем крае, но также и выраженной контрактностью актина–миозина в области за клеточным ядром, что приводит к выталкиванию ядра на край клетки. При перемещении на ведущий край клетки ядро высвобождалось из сети промежуточных филаментов и часто при этом деформировалось (рис. 10, *б* и *в*).

Проведенные исследования показали, что направленная клеточная миграция при ЭМП, как результат активации Snail1, ассоциирована с разрушением стабильных тангенциальных АК, полимеризацией актиновой сети на

ведущем крае клеток, активацией контрактности актина–миозина, перераспределением белков актин-катенинового комплекса и актин-связывающих белков, перераспределением фокальных контактов и реорганизацией сети промежуточных филаментов. Миграционный фенотип опухолевых клеток чрезвычайно пластичен, реорганизации актинового цитоскелета лежат в основе такой пластичности.

Вклад авторов. Н.А. Глушанкова – концепция и руководство работой; Н.И. Литовка, И.Ю. Житняк – проведение экспериментов; И.Ю. Житняк – анализ результатов; Н.И. Литовка, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова – обсуждение результатов исследования; И.Ю. Житняк – подготовка рисунков; Н.А. Глушанкова, И.Ю. Житняк – написание текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00347).

Благодарности. Выражаем благодарность А. Готро (Политехническая школа, Франция) за клетки MCF-7-SNAI1, MCF-7-CTRL3, MCF-10A, А.М. Щербакову (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) за антитела к Snail1, И.Н. Бычкову за участие в экспериментах на начальной стадии выполнения проекта.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., and Thiery, J. P. P. (2016) EMT: 2016, *Cell*, **166**, 21-45, doi: 10.1016/J.CELL.2016.06.028.
2. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., and Weinberg, R. A. (2017) Emerging biological principles of metastasis, *Cell*, **168**, 670-691, doi: 10.1016/J.CELL.2016.11.037.
3. Dongre, A., and Weinberg, R. A. (2019) New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 69-84, doi: 10.1038/S41580-018-0080-4.
4. Nikolaou, S., and Machesky, L. M. (2020) The stressful tumour environment drives plasticity of cell migration programmes, contributing to metastasis, *J. Pathol.*, **250**, 612-623, doi: 10.1002/PATH.5395.
5. Joseph, J. P., Harishankar, M. K., Pillai, A. A., and Devi, A. (2018) Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC, *Oral Oncol.*, **80**, 23-32, doi: 10.1016/J.ORALONCOLOGY.2018.03.004.
6. Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 415-428, doi: 10.1038/NRC2131.
7. Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., and Brabletz, T. (2019) Non-redundant functions of EMT transcription factors, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 102-112, doi: 10.1038/S41556-018-0196-Y.
8. Thompson, E. W., and Nagaraj, S. H. (2018) Transition states that allow cancer to spread, *Nature*, **556**, 442-444, doi: 10.1038/D41586-018-04403-X.
9. Lu, W., and Kang, Y. (2019) Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis, *Dev. Cell*, **49**, 361-374, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2019.04.010.
10. Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and De Herreros, A. G. (2000) The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 84-89, doi: 10.1038/35000034.
11. Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., Del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000) The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 76-83, doi: 10.1038/35000025.
12. Kaufhold, S., and Bonavida, B. (2014) Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **33**, 62, doi: 10.1186/S13046-014-0062-0.
13. Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., and Zhou, B. (2014) The role of Snail in EMT and tumorigenesis, *Curr. Cancer Drug Targets*, **13**, 963-972, doi: 10.2174/15680096113136660102.
14. Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M. A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer, *Development*, **132**, 3151-3161, doi: 10.1242/DEV.01907.
15. Kume, K., Haraguchi, M., Hijioka, H., Ishida, T., Miyawaki, A., Nakamura, N., and Ozawa, M. (2013) The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 889-94, doi: 10.1016/J.BBRC.2012.12.060.
16. De Craene, B., Gilbert, B., Stove, C., Bruyneel, E., Van Roy, F., and Berx, G. (2005) The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program, *Cancer Res.*, **65**, 6237-6244, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3545.
17. Whiteman, E. L., Liu, C. J., Fearon, E. R., and Margolis, B. (2008) The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apical-basal polarity complexes, *Oncogene*, **27**, 3875-3879, doi: 10.1038/ONC.2008.9.
18. Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail, *J. Cell Sci.*, **116**, 1959-1967, doi: 10.1242/JCS.00389.
19. Vincent, T., Neve, E. P. A., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P. L., Crystal, R. G., de Herreros, A. G., Moustakas, A., Pettersson, R. F., and Fuxe, J. (2009) A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 943-950, doi: 10.1038/NCB1905.
20. Haraguchi, M., Okubo, T., Miyashita, Y., Miyamoto, Y., Hayashi, M., Crotti, T. N., McHugh, K. P., and Ozawa, M. (2008) Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23514-23523, doi: 10.1074/JBC.M801125200.
21. Shields, M. A., Krantz, S. B., Bentrem, D. J., Dangi-Garimella, S., and Munshi, H. G. (2012) Interplay between β 1-integrin and Rho signaling regulates differential scattering and motility of pancreatic cancer cells by snail and slug proteins, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6218-6229, doi: 10.1074/JBC.M111.308940.
22. Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H., and Nagayama, M. (2003) Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas, *Int. J. Oncol.*, **22**, 891-898, doi: 10.3892/IJO.22.4.891.
23. Li, C. F., Chen, J. Y., Ho, Y. H., Hsu, W. H., Wu, L. C., Lan, H. Y., Hsu, D. S. S., Tai, S. K., Chang, Y. C.,

- and Yang, M. H. (2019) Snail-induced claudin-11 prompts collective migration for tumour progression, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 251-262, doi: 10.1038/S41556-018-0268-Z.
24. Santamaria, P. G., Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2017) EMT: present and future in clinical oncology, *Mol. Oncol.*, **11**, 718-738, doi: 10.1002/1878-0261.12091.
25. Usami, Y., Satake, S., Nakayama, F., Matsumoto, M., Ohnuma, K., Komori, T., Semba, S., Ito, A., and Yokozaki, H. (2008) Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression, *J. Pathol.*, **215**, 330-339, doi: 10.1002/path.2365.
26. Henderson, V., Smith, B., Burton, L. J., Randle, D., Morris, M., and Otero-Marah, V. A. (2015) Snail promotes cell migration through PI3K/AKT-dependent Rac1 activation as well as PI3K/AKT-independent pathways during prostate cancer progression, *Cell Adhes. Migr.*, **9**, 255-264, doi: 10.1080/19336918.2015.1013383.
27. Beach, S., Tang, H., Park, S., Dhillon, A. S., Keller, E. T., Kolch, W., and Yeung, K. C. (2008) Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells, *Oncogene*, **27**, 2243, doi: 10.1038/SJ.ONC.1210860.
28. Yatskou, M., Novikov, E., Vetter, G., Muller, A., Barillot, E., Vallar, L., and Friederich, E. (2008) Advanced spot quality analysis in two-colour microarray experiments, *BMC Res. Notes*, **1**, 80, doi: 10.1186/1756-0500-1-80.
29. Guelstein, V. I., Tchypysheva, T. A., Ermilova, V. D., Litvinova, L. V., Troyanovsky, S. M., and Bannikov, G. A. (1988) Monoclonal antibody mapping of keratins 8 and 17 and of vimentin in normal human mammary gland, benign tumors, dysplasias and breast cancer, *Int. J. Cancer*, **42**, 147-153, doi: 10.1002/IJC.2910420202.
30. Vetter, G., Le Béhec, A., Muller, J., Muller, A., Moes, M., Yatskou, M., Al Tanoury, Z., Poch, O., Vallar, L., and Friederich, E. (2009) Time-resolved analysis of transcriptional events during SNAIL1-triggered epithelial to mesenchymal transition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 485-491, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.025.
31. Wee, K., Hedyeh-Zadeh, S., Duszyc, K., Verma, S., Nanavati, B. N., Khare, S., Varma, A., Daly, R. J., Yap, A. S., Davis, M. J., and Budnar, S. (2020) Snail induces epithelial cell extrusion by regulating RhoA contractile signalling and cell-matrix adhesion, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs235622, doi: 10.1242/jcs.235622.
32. Reinhold, W. C., Reimers, M. A., Lorenzi, P., Ho, J., Shankavaram, U. T., Ziegler, M. S., Bussey, K. J., Nishizuka, S., Ikediobi, O., Pommier, Y. G., and Weinstein, J. N. (2010) Multifactorial regulation of E-cadherin expression: an integrative study, *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 1-16, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0321.
33. Ayollo, D. V., Zhitnyak, I. Y., Vasiliev, J. M., and Gloushankova, N. A. (2009) Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplastic transformation change cell-cell interactions, *PLoS One*, **4**, e8027, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008027.
34. Zhitnyak, I. Y., Rubtsova, S. N., Litovka, N. I., and Gloushankova, N. A. (2020) Early events in actin cytoskeleton dynamics and E-cadherin-mediated cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, *Cells*, **9**, 578, doi: 10.3390/CELLS9030578.
35. Suarez, C., and Kovar, D. R. (2016) Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 799-810, doi: 10.1038/NRM.2016.106.
36. Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac, *EMBO J.*, **17**, 6932-6941, doi: 10.1093/EMBOJ/17.23.6932.
37. Campellone, K. G., and Welch, M. D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 237-251, doi: 10.1038/NRM2867.
38. Buckley, C. D., Tan, J., Anderson, K. L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W. I., Nelson, W. J., and Dunn, A. R. (2014) The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force, *Science*, **346**, 1254211, doi: 10.1126/SCIENCE.1254211.
39. Mukherjee, A., Melamed, S., Damouny-Khoury, H., Amer, M., Feld, L., Nadjar-Boger, E., Sheetz, M. P., and Wolfenson, H. (2022) α -Catenin links integrin adhesions to F-actin to regulate ECM mechanosensing and rigidity dependence, *J. Cell Biol.*, **221**, e202102121, doi: 10.1083/JCB.202102121.
40. Yamaguchi, H., Ito, Y., Miura, N., Nagamura, Y., Nakabo, A., Fukami, K., Honda, K., and Sakai, R. (2017) Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells, *Eur. J. Cell Biol.*, **96**, 685-694, doi: 10.1016/J.EJCB.2017.07.005.
41. Jimenez, A. J., Schaeffer, A., De Pascalis, C., Letort, G., Vianay, B., Bornens, M., Piel, M., Blanchoin, L., and Théry, M. (2021) Acto-myosin network geometry defines centrosome position, *Curr. Biol.*, **31**, 1206-1220.e5, doi: 10.1016/j.cub.2021.01.002.
42. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S., and Horwitz, A. R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 778, doi: 10.1038/NRM2786.
43. Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H., and Goldma, R. D. (2015) Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function, *J. Biol. Chem.*, **290**, 17145, doi: 10.1074/JBC.R115.640359.

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION OF BREAST CANCER CELLS ACTIVATED BY SNAIL1 TRANSCRIPTION FACTOR

N. I. Litovka[#], I. Y. Zhitnyak[#], and N. A. Gloushankova^{*}

*N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation,
115478 Moscow, Russia; e-mail: natglu@hotmail.com*

Cancer cells use the program of epithelial-mesenchymal transition for initiation of the invasion-metastasis cascade. Using confocal and video-microscopy, in breast cancer MCF-7 cells undergoing Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition reorganization of cytoskeleton was studied. We used the line of MCF-7 cells stably expressing tetOff *SNAIL1* construct (MCF-7-SNAI1 cells). After tetracycline washing and Snail1 activation MCF-7-SNAI1 cells underwent EMT and acquired a migratory phenotype retaining expression of E-cadherin. We identified five variants of the mesenchymal phenotype, differing in cell morphology and migration rate. Migrating cells had high degree of plasticity which allowed them to quickly change both the phenotype and the speed of movement. The changes of phenotype of MCF-7-SNAI1 cells are based on Arp2/3-mediated branched actin polymerization in lamellipodia, myosin-based contractility in the zone behind the nucleus, redistribution of adhesive proteins from cell-cell contacts to the leading edge and reorganization of intermediate keratin filaments.

Keywords: cancer cell, Snail1/SNAI1, epithelial-mesenchymal transition, cell migration, cancer cell plasticity, cell-cell adhesion, cytoskeleton, actin, myosin