

LUCYNA GRĘBECKA

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

MIGRACJA KOMÓREK TKANKOWYCH CZYNNIKI OGRANICZAJĄCE I POBUDZAJĄCE

Pierwsze opisy ruchu ameboidalnego, pochodzące jeszcze z ubiegłego wieku, oparte były na obserwacjach dużych, swobodnie żyjących ameb, takich jak *Chaos chaos*, *Amoeba proteus*. Obecnie większość danych dotyczących tego ruchu, a przede wszystkim jego podstaw molekularnych pochodzi z badań prowadzonych nad ruchliwymi komórkami tkankowymi. Fakt ten staje się zrozumiały, gdy uświadomimy sobie, że są to między innymi:

- 1) istotne w morfogenezie i rozwoju embrionalnym komórki zarodka,
 - 2) odpowiedzialne za swoiste i nieswoiste reakcje odpornościowe organizmu
- takie komórki jak: limfocyty, granulocyty czy makrofagi,
- 3) biorące udział w gojeniu ran fibroblasty i komórki epitelialne,
 - 4) inwazyjne i metastatyczne komórki nowotworowe,

a także wiele innych komórek wędrujących w obrębie organizmu stale, bądź tylko w pewnych okresach swego cyklu życiowego, jak erytrocyty lub komórki nerwowe. Czy jednak ruch swobodnie żyjących ameb i migrujących w organizmie komórek tkankowych jest tym samym? Przy założeniu, że jest to sposób przemieszczania się drogą kolejnych deformacji ciała, odpowiedź będzie brzmiała — tak. Oba bowiem rodzaje komórek migrują wytwarzając nibynóżki — przejściowe struktury lokomotoryczne różnych kształtów, od wydłużonych filopodiów poczynając, a na szeroko rozlanych lammelipodiach kończąc. Uściślając definicję ruchu ameboidalnego możemy też powiedzieć, że komórka poruszająca się w ten sposób musi spełniać trzy warunki: 1 — przylegać do podłoża, 2 — być spolaryzowana i 3 — wytwarzać siłę motoryczną. Do zapewnienia efektywnej lokomocji konieczne są także odpowiednie ilościowe stosunki pomiędzy tymi parametrami. Od nich zależy czy komórka porusza się szybko i w określonym kierunku, czy też chaotycznie ślizga się po podłożu — lub przeciwnie, zbyt silnie z nim związana nie może poruszyć się z miejsca.

Okazało się, że obie grupy ruchliwych komórek — tkankowe i swobodnie żyjące spełniają trzy wymienione warunki. Stwierdzono jednak także, że mogą je realizować przy pomocy różnych mechanizmów molekularnych. Na przykład, polaryzacja jest w komórce podtrzymywana bądź przez układ mikrotubuli, w przypadku komórek tkankowych, bądź z pomocą jądra, co prawdopodobnie występuje u swobodnie żyjących *Amoeba proteus*. Musimy sobie jednak zdać

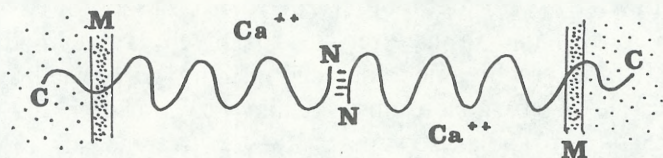
sprawę z tego, że podobnego rzędu różnice mogą wystąpić również w obrębie tej samej grupy komórek.

Wędrówka komórek w organizmie jest zjawiskiem złożonym. Kontrolują ją zarówno czynniki uruchamiające i zatrzymujące komórkę, jak i czynniki sterujące odpowiedzialne za wyznaczanie kierunku migracji. Ruchliwość komórek tkankowych mogą ograniczać połączenia międzykomórkowe. Połączenia te zespalały komórki, stanowią więc przeszkodę w ich swobodnej, indywidualnej migracji.

POŁĄCZENIA MIĘDZYKOMÓRKOWE

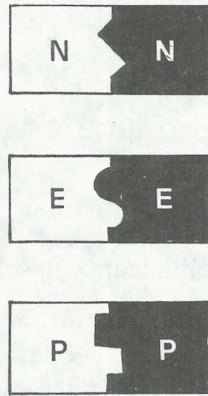
Najmniej skomplikowane połączenia międzykomórkowe polegają na tym, że łączą się ze sobą pojedyncze cząsteczki białek z powierzchni dwóch przylegających komórek. Cząsteczki takie noszą nazwę białek adhezji międzykomórkowej (Cell Adhesion Molecules, CAMs). Gdy cząsteczki wiążące sąsiednie komórki są takie same, wiązanie nosi nazwę homofilowego. Ten typ połączeń pojawia się bardzo wcześnie, np. w zarodku mysim już po pierwszym podziale, w stadium dwóch blastomerów (Fleming i Johnson 1988). Występuje tam uwomorulina, powszechnie identyfikowana z E-kadheryną. Grupa kadheryn należy do tych białek adhezji międzykomórkowej, których działanie związane jest z obecnością Ca^{2+} w środkowisku (Tingstrom i in. 1990).

E-kadheryna zbudowana jest z długiego łańcucha polipeptydowego przebijającego błonę komórki. Fragment zewnętrzny tego łańcucha składa się z 6 pętli; po usunięciu ze środowiska jonów wapniowych ulegają one zwinięciu, stając się wrażliwe na błonowe enzymy proteolityczne (rys. 1). Wtedy utworzone przez dwie cząsteczki E-kadheryny wiązanie homofilowe między sąsiadującymi komórkami (rys. 2) ulega rozerwaniu (Takeichi 1990).



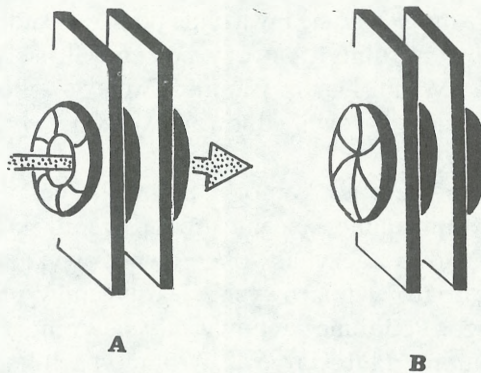
Rys. 1. Połączenie dwóch cząsteczek E-kadheryny. C i N — zakończenia cząsteczki, M — błona komórkowa, Ca^{2+} — jony wapnia w środowisku. Zakropkowano wnętrze komórki

W następnej kolejności pojawiają się połączenia złożone, składające się z większej liczby cząsteczek. Należą do nich m.in. połączenia szczelinowe (gap junction); są to miejsca w których pomiędzy sąsiadującymi komórkami zachodzi wymiana metabolitów i jonów. Połączenia szczelinowe zbudowane są z kanałów (koneksonów), z których każdy utworzony jest z sześciu integralnych białek błonowych — koneksyn. Koneksyny mają bezpośredni wpływ na funk-



Rys. 2. Schemat połączeń homofilowych: N-, E- i P-kadheryny

jonowanie połączeń szczelinowych. Zewnątrzkomórkowe i błonowe domeny białek z rodziny koneksyn są homologiczne. Różnice strukturalne między nimi obserwuje się w regionach cytoplazmatycznych. Średnica koneksonu wynosi 1,5 nm; przez te połączenia mogą więc przechodzić cząsteczki do 1500 daltonów — cukry, aminokwasy, nukleotydy i witaminy, ale już nie takie makrocząsteczki jak białka, cukry złożone czy kwasy nukleinowe. Zależnie od stanu komórki, kanały mogą być otwarte, lub przez spiralny obrót koneksyn mogą ulec zamknięciu (rys. 3).



Rys. 3. Schemat połączenia szczelinowego. A — konekson otwarty, B — konekson zamknięty

W kolejnych stadiach rozwoju zarodka pojawiają się następne złożone połączenia międzykomórkowe, jak połączenia zamykające (tight junction) i desmosomy. Nie zostaną one tu jednak dokładnie omówione, ponieważ nie wiążą się bezpośrednio z tematyką tego artykułu.

Przypuszczenie, że połączenia międzykomórkowe ograniczają migrację związanych nimi komórek wydaje się całkowicie uzasadnione. Można to jednak

udowodnić pokazując, że rozerwanie tych połączeń zapoczątkowuje migrację.

CZYNNIKI UMOŻLIWIAJĄCE MIGRACJĘ KOMÓREK

ZANIK POŁĄCZEŃ MIĘDZYKOMÓRKOWYCH

Zanik białek adhezji międzykomórkowej (CAMs)

Zjawisko zaniku połączeń międzykomórkowych, w związku z migracją komórek, było badane m.in. przez J.P. Thierry'ego (1984), który zajmował się wędrówkami komórek w zarodkach. Okazało się, że L-CAM i N-CAM (białka adhezji międzykomórkowej, występujące w komórkach grzebienia nerwowego zarodków kurzych) zanikały, gdy komórki te rozpoczynały migrację. Kiedy komórki zatrzymywały się i skupiały, stwierdzono w nich ponowne pojawienie się białek odpowiedzialnych za adhezję międzykomórkową.

W rozwijającym się zarodku myszy indukcja przejścia ruchliwych komórek mezenchymalnych w zwarty układ epitelialny towarzyszyła powstawaniu kanałów nefridialnych. Około 12 godzin po indukcji komórki zaczynały przylegać do siebie, a na ich powierzchni pojawiała się uwomorulina (Vestweber i in. 1985).

Dowody istnienia zależności pomiędzy ruchliwością a indywidualizacją komórek zawiera również praca Behrens i in. (1989) pokazująca, że prawidłowe komórki nabłonkowe mogą stać się inwazyjne po utracie adhezji międzykomórkowej zależnej od uwomoruliny. Autorzy posługiwali się w doświadczeniach komórkami MDCK (Madin-Darby Canine Kidney — komórki pochodzące z psiej nerki) rosnącymi w hodowli jednowarstwowo i wykazującymi wszystkie cechy epitelium *in vivo*.

Te ściśle do siebie przylegające komórki, pod wpływem przeciwciał skierowanych przeciwko uwomorulinie, ulegały rozproszeniu i przybierały kształt migrujących fibroblastów. Zaczynały one również wykazywać własności inwazyjne, przenikając do trójwymiarowych żeli kolagenowych oraz w głąb tkanki serca zarodka kurzego. Podobnie zachowywały się komórki MDCK transformowane wirusem Maloneya lub Harveya. W obu typach komórek następowała utrata uwomoruliny, wywołana bądź tylko przeciwciałem, bądź tylko transformacją wirusową. Czynnikiem decydującym o inwazyjności komórek wydaje się więc w tym przypadku zanik białka adhezji międzykomórkowej.

Badania Mareela i in. (1990) potwierdzają przypuszczenie o udziale białek adhezyjnych w inwazyjności. W roku 1990, na zjeździe w Antwerpii poświęconym ruchom komórkowym, Mareel przedstawił hipotezę, która mówi, że inwazyjność komórki wynika z równowagi pomiędzy ekspresją dwóch rodzajów genów: genów i^+ — kodujących białka odpowiedzialne za ujawnienie się

inwazyjnego fenotypu I^+ , oraz genów i^- odpowiedzialnych za nieinwazyjny fenotyp I^- , przy czym pojawienie się fenotypu I^- jest zjawiskiem oddzielnym, a nie prostym brakiem ekspresji genów i^+ w komórce. Według Mareela produktami genów i^+ i i^- mogą być między innymi białka wpływające na ruchliwość komórek. Przy tym założeniu E-kadheryna, powodująca ograniczenie ruchliwości byłaby produktem genu z grupy i^- , a białka stymulujące ruchliwość, jak motogenne cytokiny, byłyby kodowane przez geny i^+ . Mareel powoływał się na szereg doświadczeń potwierdzających słuszność jego hipotezy, przynajmniej w tej jej części, która dotyczy manipulacji białkami ograniczającymi ruchliwość komórki — jak E-kadheryna. I tak stwierdzono, że przeciwciała przeciw E-kadherynie dodane do hodowli indukują pojawienie się inwazyjnego fenotypu w nieinwazyjnych uprzednio komórkach MDCK. Co więcej, wprowadzenie do komórek nie mających E-kadheryny sekwencji DNA kodującej to białko prowadziło do pojawienia się go na błonie powierzchniowej komórek i powstanie populacji nieinwazyjnej. Doświadczenia odwrotne, wprowadzenie do komórek, w których E-kadheryna występuje, odwróconej sekwencji DNA kodującej to białko, wygaszało ekspresję E-kadheryny, a komórki zaczynały migrować.

Doświadczenia te pokazują, że istnieje *in vitro* możliwość manipulowania inwazyjnością fenotypu przez genetyczne manipulacje ekspresją E-kadheryny w komórce (Vleminckx 1991). Okazało się, że podobne wyniki można otrzymać *in vivo*. Homogenne pod względem występowania E-kadheryny populacje komórek wprowadzano iniekcyjnie do myszy pozbawionej grasicy. Tworzył się guz, dający przerzuty do węzłów chłonnych i płuc. Pojawieniu się inwazyjności towarzyszyło pojawienie się komórek bez E-kadheryny, mimo, że wszystkie wszczepione uprzednio komórki miały tę glikoproteinę. Co więcej, pobrane z organizmu heterogenne populacje komórek metastatycznych, po kilku pasażach w hodowli stawały się znowu homogenne i każda komórka zawierała E-kadherynę. Prawdopodobnie więc inwazyjność może być wynikiem przejściowego tylko zaniku ekspresji genu kodującego w komórce E-kadherynę.

Przytoczone wyniki znalazły potwierdzenie w badaniach klinicznych pacjentów ze złośliwym nowotworem jelita grubego, u których stwierdzono w przerzutach obecność komórek pozbawionych E-kadheryny.

ZANIK POŁĄCZEŃ SZCZELINOWYCH

Jedną z podstawowych różnic pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi jest to, że te ostatnie same kontrolują wiele swoich czynności życiowych. Zmniejsza się więc ich potrzeba kontaktu z innymi komórkami, które między innymi przekazują informacje regulujące różne procesy komórkowe. Można więc uważać, że połączenia szczelinowe, pełniące właśnie takie funkcje „transportowe”, są w komórkach nowotworowych zbędne. Okazało się jednak, że w niektórych nowotworach łagodnych pochodzenia epitelialnego połączenia te wciąż występują. Dopiero uzłośliwienie nowotworu wiąże się z ich utratą.

Nicolson (1988) badał występowanie połączeń szczelinowych w serii sklonowanych komórek adenocarcinoma o różnych zdolnościach tworzenia przerzutów do płuc i węzłów limfatycznych. Stosował w takich przypadkach powszechnie używaną metodę „dye-transfer”, w której rozchodzący się pomiędzy komórkami barwnik (lucifer yellow) wskazywał na obecność w nich połączeń szczelinowych. Nicolson stwierdził, że połączenia szczelinowe występowały w niemetastazujących komórkach adenocarcinoma, ale brak ich było wśród komórek o dużym stopniu ułożliwienia.

Podobne wyniki znajdujemy w pracy Vanhamme i in. (1989). Autorzy transformowali komórki nabłonkowe onkogenem H-ras 1, powodując całkowitą utratę, lub przynajmniej znaczne zmniejszenie liczby połączeń szczelinowych. Otrzymany wynik wiązano ze zmianami w fosforylacji białek budujących te połączenia.

Interpretacja ta znalazła potwierdzenie w pracy Musil i in. (1990) badających komórki sarcoma S180, które nie mają połączeń szczelinowych, chociaż znajduje się w nich koneksyna — związek z grupy białek budujących te połączenia. Dopiero wprowadzenie do komórki sekwencji DNA kodującej białko adhezji międzykomórkowej (L-CAM) spowodowało pojawienie się połączeń szczelinowych. Obecność L-CAM umożliwiła fosforylację koneksyny 43, która przechodząc w formę $43 P_2$ utworzyła połączenie. Autorzy przypuszczają więc, że nie mutacja w genie koneksyny, lecz brak adhezji międzykomórkowej jest odpowiedzialny za fenotyp komórek S 180. Wynika to również z ich poprzednich doświadczeń (Musil i in. 1990) prowadzonych nad prawidłowymi komórkami soczewki oka zarodka kurzego. Tkanka ta ma niezwykle dużo połączeń szczelinowych oraz białka adhezji międzykomórkowej. Okazało się, że komórki soczewki syntetyzują koneksynę 43, która posttranslacyjnie ulega fosforylacji i dopiero wtedy uczestniczy w tworzeniu połączeń szczelinowych.

Bardzo podobne wyniki uzyskali Jongen i in. (1991), badając połączenia szczelinowe w komórkach epidermalnych. Stwierdzili oni, że zależność występowania połączeń szczelinowych w tych komórkach od poziomu jonów Ca^{2+} w środowisku wynika z bezpośredniego wpływu białka adhezji międzykomórkowej — E-kadheryny. Prawdopodobnie i tutaj jest to związane z posttranslacyjną fosforylacją koneksyny 43.

Wyniki tych ostatnich prac wydają się szczególnie ciekawe. Pokazują one co może wyniknąć z krótkotrwałego nawet wygaśnięcia ekspresji genu kodującego tylko jedną cząsteczkę w komórce. Komórka tracąca białko adhezji międzykomórkowej traci połączenia szczelinowe. W rezultacie zyskuje ona zdolności inwazyjne a równocześnie wyzwala się spod kontroli innych komórek. Tego typu zmiany stanowić mogą poważne zagrożenie dla organizmu.

CZYNNIKI STYMULUJĄCE MIGRACJĘ

CZNNIK ROZPRASZAJĄCY „SCATTER FACTOR” (SF)
PRODUKOWANY PRZEZ FIBROBLASTY

Efekt działania tego czynnika na komórki jest podobny do efektu działania czynników powodujących zanik białek adhezji międzykomórkowej. Czynniki rozpraszający zostały odkryte i opisane przez *Stokera* i in. (1985). Zauważyli oni, że środowisko modyfikowane przez hodowane w nim fibroblasty, dodane do hodowli komórek nabłonkowych powodowało ich rozproszenie. W testowanych koloniach obserwowano wzmożenie aktywności ruchowej powierzchni przylegających do siebie komórek i stopniowe ich odsuwanie się, aż do całkowitego rozejścia. Dalsze badania prowadzone w tym kierunku pozwoliły na ustalenie, że działający czynnik jest białkiem, które produkują i wydzielają niektóre fibroblasty, a wrażliwe na nie są komórki nabłonkowe (*Stoker* 1987) i endotelialne (*Rosen* 1990). Jest to więc czynnik działający parakrynnie.

W roku 1989 czynnik rozpraszający został oczyszczony, a jego masa określona na 62 kD (*Gherardi* i in. 1989). Dokonano porównania wpływu na komórki nabłonkowe (MDCK) tego czynnika oraz przeciwciała przeciw uwomorulinie. Do odseparowania komórek wystarczył czynnik rozpraszający o stężeniu 2–3 pmoli podczas gdy stężenie przeciwciała konieczne do uzyskania tego samego efektu było 10 000 razy większe. Ta duża biologiczna aktywność czynnika rozpraszającego wskazuje na obecność w epitelialnych komórkach receptorów powierzchniowych o bardzo wysokim powinowactwie do tego czynnika. Okazało się również, że heparyna (w stężeniu 5 mg/ml) blokowała aktywność czynnika rozpraszającego, co pozwala przypuszczać, że może on być modulowany *in vivo* przez niektóre składniki pozakomórkowej macierzy (ECM). Odkrycie to nabiera znaczenia w świetle faktu, że wszystkie migrujące komórki organizmu przechodzą przez pozakomórkową macierz.

W roku 1989 *Stoker* podjął próby zbadania wpływu czynnika rozpraszającego na ruchliwość komórek epitelialnych i fibroblastów. Chodziło o stwierdzenie, czy czynnik ten tylko rozprasza komórki, czy też stymuluje lokomocję pojedynczych komórek, a także sprawdzenie, czy nie wywiera on rzeczywście żadnego wpływu na wydzielające go fibroblasty.

Testowane komórki (fibroblasty, keratynocyty, komórki MDCK) umieszczano w komorach Boydena. Komórki przechodziły przez otwory o średnicy 8 μm . Liczono komórki przechodzące w warunkach kontrolnych (środowisko hodowli po obu stronach otworu) i doświadczalnych, po podaniu badanego czynnika z jednej tylko strony.

Czynnik rozpraszający (pochodzący z fibroblastów MRC 5) powodował, w zależności od użytego stężenia, 5–15-krotny wzrost liczby przechodzących komórek. Przedostawały się również fragmenty bezjądrowe. Wzmocniona migracja komórek nabłonkowych w kierunku czynnika rozpraszającego udowodniła, że jest on nie tylko czynnikiem separującym komórki, ale także stymuluje ich lokomocję (*Stoker* i *Gherardi* 1991).

Fibroblasty wykazywały znikomą wrażliwość na czynnik rozpraszający. Maksymalne zwiększenie ich aktywności lokomotorycznej wynosiło 1,4 wartości migracji spontanicznej, podczas gdy PDGF (czynnik wzrostowy wydzielany przez płytki krwi) zwiększał liczbę migrujących fibroblastów aż siedmiokrotnie w porównaniu z kontrolą.

Fibroblasty produkujące czynnik rozpraszający są bardzo ruchliwe. Dopuszcza się więc możliwość, że reagują one na produkowany przez siebie „scatter factor”. Słaba odpowiedź fibroblastów na ten czynnik wprowadzony do środowiska tłumaczy się tym, że część powierzchniowych receptorów komórek jest permanentnie związana produkowanym przez nie czynnikiem rozpraszającym.

W przypadku tych fibroblastów, które — chociaż ruchliwe — nie wydzielają czynnika rozpraszającego, *Stoker* (1989) postuluje występowanie pętli autokrynej. Syntetyzowany przez komórkę „scatter factor” stymulowałby komórki nie opuszczając jej.

CZYNNIK ROZPRASZAJĄCY PRODUKOWANY PRZEZ NIERÓŻNICUJĄCE SIĘ KERATYNOCYTY (KOMÓRKI NDK)

Nieróżnicujące się keratynocyty, choć pochodzenia epitelialnego, zarówno kształtem jak zachowaniem przypominają ruchliwe, swobodnie migrujące fibroblasty (*Adams i Watt* 1988). Stanowią więc niezwykle ciekawy model do badań nad czynnikiem rozpraszającym — zwykle produkowanym przez fibroblasty, a działającym na epitelium. *Adams i in.* (1991) wykorzystali środowisko modyfikowane przez te keratynocyty do testowania kolonii komórek nabłonkowych MDCK. Okazało się, że pod jego wpływem komórki tych kolonii ulegały rozproszeniu, chociaż środowisko modyfikowane przez prawidłowe keratynocyty nie wywoływało takiego efektu. W badaniach biochemicznych wykazano, że nieróżnicujące się keratynocyty produkowały białko, którego biologiczna aktywność oraz charakterystyka immunologiczna były takie same jak czynnika rozpraszającego produkowanego przez fibroblasty.

Badano również wpływ na nieróżnicujące się keratynocyty i nabłonkowe komórki MDCK polyanionowego detergentu — suraminy. Częsteczki tego związku blokują wiązania czynników wzrostowych do błony komórkowej (*Hosang* 1985; *Coffey* 1987). Suramina podana do środowiska, w którym rosły komórki MDCK nie wywoływała efektu. Ujawniał się on dopiero przy jednoczesnej obecności suraminy i czynnika rozpraszającego. Okazało się, że suramina blokowała działanie tego czynnika, podobnie jak w przypadku czynników wzrostowych.

Następnie poddano działaniu tego detergentu nieróżnicujące się keratynocyty. Inkubowanie w obecności suraminy powodowało skupianie się tych komórek. Przepłukane i pozostawione w normalnym środowisku hodowli, nieróżnicujące się keratynocyty powracały do swego właściwego stanu, tzn. roz-

proszone swobodnie migrowały. Wynika, z tego, że produkowany przez nieróżnicujące się keratynocyty czynnik rozpraszający jest czynnikiem autokrynnym dla tych komórek i parakrynnym dla typowych nabłonkowych komórek MDCK. Rozprasza on oraz pobudza do migracji produkujące go komórki.

W związku z tymi wynikami interesujące wydawało się poddanie działaniu suraminy fibroblastów produkujących czynnik rozpraszający. W przeciwieństwie do ruchliwych, ale pochodzenia epitelialnego nieróżnicujących się keratynocytów, fibroblasty (S t o k e r, dane nie publikowane) nie wykazywały wrażliwości na suraminę.

Suramina powoduje w komórkach ndk również pewne zmiany w cytoskiecie aktynowym — pojawiają się dodatkowe, krótkie włókna naprężeniowe w pobliżu kontaktów międzykomórkowych. Badano również rozmieszczenie białek wzajemnej adhezji międzykomórkowej w nieróżnicujących się keratynocytach znajdujących się pod wpływem suraminy. Mimo że suramina wywoływała skupianie się tych komórek, nie powodowała u nich podniesienia bardzo niskiego poziomu E- i P-kadheryny. Obserwuje się natomiast wyraźny wpływ tego detergentu na integryny. W nietkniętych komórkach ndk, integryna $\alpha_2\beta_1$ jest skoncentrowana w regionie fałowań błony, zaś $\alpha_3\beta_1$ na powierzchni licznych w tych komórkach mikrowilli. Suramina powoduje częściowe przemieszczenie tych integryn do regionów kontaktów międzykomórkowych. Takie rozmieszczenie integryn zawierających podjednostkę β_1 jest typowe dla normalnych keratynocytów.

CZYNNIK STYMULUJĄCY MIGRACJĘ — MIGRATION STIMULATING FACTOR (MSF)

Badania przeprowadzone przez S c h o r r i współpracowników (1988a i b) na fibroblastach pochodzących z płodów ludzkich oraz z osobników dorosłych (zdrowych i z nowotworem piersi) wykazały, że istnieje podobieństwo w sposobie migracji fibroblastów pochodzenia płodowego i pobieranych od chorych pacjentów. Hodowane w bardzo gęstych kulturach penetrują one żełe kolagenowe dużo szybciej i łatwiej niż fibroblasty pochodzące ze zdrowych, dorosłych osobników. Ze środowiska, w którym hodowano te ruchliwe fibroblasty, wyizolowano białko o masie rzędu 50-60 kD, które okazało się czynnikiem odpowiedzialnym za zwiększenie aktywności omawianych komórek. Nazwano je czynnikiem stymulującym migrację (MSF). Czynnik ten, odwrotnie niż czynnik rozpraszający (SF), działa przede wszystkim autokrynnie. Stwierdzono jednak, że środowisko modyfikowane przez produkujące ten czynnik fibroblasty może stymulować, w pewnych ściśle określonych warunkach, również fibroblasty pochodzące z osobników zdrowych i dorosłych. Dzieje się tak wtedy, gdy te ostatnie tworzą bardzo gęste kultury.

AUTOKRYNNY CZYNNIK RUCHLIWOŚCI — AUTOCRINE MOTILITY FACTOR (AMF)

Wiadomo, że komórki nowotworowe wymykające się spod kontroli organizmu same kontrolują większość własnych czynności życiowych. Nieograniczony rozrost tych komórek wynika między innymi z autokrynnego oddziaływania czynników wzrostu (growth factors). Czynniki wzrostowe należą do cytokin mitogennych, cytokiny mogą jednak wpływać stymulująco również na inne procesy zachodzące w komórce.

Stwierdzono, że inwazje i przerzuty nowotworów nie są prostą konsekwencją rozrostu kolonii zmienionych komórek, ale zjawiskiem odrębnym i złożonym z wielu etapów. Na preparatach tkanki zaatakowanej przez nowotwór widać często pojedyncze komórki lub ich niewielkie grupy wybiegające poza główną masę kolonii. Uważa się, że populacje komórek nowotworowych są heterogenne. Pewne komórki odznaczają się ruchliwością i migrują, podczas gdy inne ograniczają się tylko do wzmoczonej proliferacji, pozostając na miejscu.

Biochemiczne mechanizmy regulujące inwazyjność komórek nowotworowych są przedmiotem wielu badań. Stwierdzono, że jednym z czynników stymulujących migrację takich komórek może być białko o masie około 55 kD, odkryte w roku 1985, a opisane w roku 1986 przez znanego badacza komórek nowotworowych — Lance Liott'ę i jego współpracowników. Wyszli oni z założenia, że podobnie jak istnieją autokrynnne czynniki wzrostowe, przy pomocy których komórka nowotworowa sama pobudza się do podziału, mogą istnieć również autokrynnne czynniki pobudzające ją do lokomocji. Autorzy ci zbadali wysoko metastatyczny klon (A 2058) komórek czerniaka (melanoma) jednego z najbardziej złośliwych nowotworów ludzkich. Badane komórki umieszczali w środowisku o ściśle określonym składzie chemicznym i po 18 godzinnej inkubacji sprawdzali działanie tego środowiska na komórki A2058. Stwierdzili, że w kierunku modyfikowanego środowiska migrowało 5-10 razy więcej komórek niż w kierunku środowiska kontrolnego. Następnym krokiem była izolacja i charakterystyka białka wydzielanego do hodowli przez komórki czerniaka, a będącego autokrynnym stymulatorem ruchliwości tych komórek. Dalsze badania można więc było prowadzić przy użyciu określonych stężeń AMF. Maksymalną efektywność osiągnięto przy stężeniu AMF 10 nmoli. Wykazano, że czynnik ten działa zarówno chemotaktycznie jak i chemokinetycznie, ale tylko na komórki melanoma. Granulocyty obojętnochłonne, które są komórkami ruchliwymi nie reagowały zupełnie na AMF, chociaż inhibitory ich lokomocji takie jak toksyna koklusu hamowały chemotaksję komórek melanoma.

Autorzy stwierdzili również, że komórki czerniaka wykazują wyraźniejszą reakcję chemokinetyczną niż chemotaktyczną na AMF. Wydaje się, że może to mieć znaczenie w procesie inwazyjnym *in vivo*. Wytworzone lokalnie wysokie stężenie AMF powoduje prawdopodobnie bezładną migrację komórek. W trakcie tego zachodzi selekcja komórek najbardziej agresywnych — tych które okazały się najbardziej wrażliwe na autokrynnny czynnik ruchliwości. Komórki te

wyruszają następnie, forsując błonę podstawną, przez pozakomórkową macierz oraz naczynia krwionośne i limfatyczne ku innym regionom organizmu, gdzie tworzą nowe kolonie.

Liotta i współpracownicy stwierdzili, że AMF produkowany jest także przez inne komórki carcinoma. Guirguis i inni (1987) uzupełnili te badania szczegółową analizą morfologii ruchu komórek nowotworowych stymulowanych AMF. Podając AMF w stężeniu 1 nM wywoływali bezładne formowanie nibynózek, co poprzedzało przemieszczanie się komórek. Nibynóżki wysuwane były również przez fragmenty bezjądrowe komórek. Podanie przeciwciał przeciw AMF hamowało zarówno tworzenie pseudopodiów, jak i lokomocję testowanych komórek. Dodatkowo, w indukowanych za pomocą AMF pseudopodiach autorzy obserwowali wyraźną sieć włókienek aktynowych. Stwierdzili też na powierzchni wysuwanych nibynózek 20-krotne zwiększenie receptorów lamininowych i innych integryn. Zwiększenie liczby tych receptorów wskazuje na przystosowanie badanych komórek nowotworowych do przemieszczania się przez błonę podstawną i pozakomórkową macierz. Obecność mikrofilamentów aktynowych w pseudopodiach lokomotorycznych wskazuje natomiast na tożsamość molekularnych podstaw ruchu komórek nowotworowych i innych, w tym również swobodnie żyjących komórek ameboidalnych.

TISSUE CELL MIGRATION — SOME FACTORS LIMITING AND STIMULATING MOTILITY

Summary

Amoeboid movement, the directed locomotion associated with the cell shape changes, occurs as well in free-living amoebae as in motile tissue cells. There are several factors limiting or stimulating this type of movement.

Among factors restricting motility of the tissue cells the intercellular connections are of the primary importance. Alterations of cell-cell and cell-substratum interactions take place during embryogenesis and tumorigenesis. That is particularly evident in tumorigenesis of the epithelial tissue, where the malignant cells loose their adhesion to the original neighbours. Among the molecular mechanisms underlying such alterations, changes in cell-cell interactions mediated by the cadherin family of molecules have received increasing interest in the last few years. A recent study on E-cadherin expression in several carcinomas and H-ras-transformed MDCK cells indicates, that acquisition of the invasiveness by these cells is often associated with the loss of E-cadherin expression. Similar interrelations were shown for the gap junctions.

Stoker with co-workers discovered in 1985 a specific factor produced by some fibroblasts. This paracrine Scatter Factor (SF) is capable of inducing the disruption and scattering of epithelial colonies and increasing the motility of individual epithelial or endothelial cells. An autocrine Motility Stimulating Factor (MSF) was described by Scorr et al. in 1988. It is produced by foetal fibroblasts and fibroblasts from patients with the breast cancer, and can also stimulate the migration of normal fibroblasts from high-density cultures. Liotta et al (1983, 1986) have shown that several highly metastatic cell lines produce and respond chemotactically to an Autocrine Motility Factor (AMF). This chemotactic factor has also been isolated by other workers from mouse and rat hepatoma lines, a rat mammary adenocarcinoma metastatic clone and human leukemia cells.

LITERATURA

- Adams J. C., Watt F. M. — *An unusual strain of human keratinocytes which do not stratify or undergo terminal differentiation in culture*. J. Cell. Biol. 107: 1927-1938, 1988.
- Adams J. C., Furlong R. A., Watt F. M. — *Production of scatter factor by ndk, a strain of epithelial cells, and inhibition of scatter factor activity by suramin*. J. Cell Sci. 98: 385-394, 1991.
- Behrens J., Mareel M. M., Van Roy F. M., Birchmeier W. — *Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of ovomorulin-mediated cell-cell adhesion*. J. Cell Biol. 108: 2435-2447, 1989.
- Coffey R. J. Jr., Leof L. B., Shipley G. D., Moses H. L. — *Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells*. J. Cell. Physiol. 132: 143-148, 1987.
- Fleming T. P., Johnson M. H. — *From egg to epithelium*. Ann. Rev. Cell Biol. 4: 459-485, 1988.
- Gherardi E., Gray, Stoker M., Perryman M., Furlong R. — *Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5844-5848, 1989.
- Guirguis R., Margulies I., Taraboletti G., Schiffmann E., Liotta L. — *Cytokine-induced pseudopodial protrusion is coupled to tumour cell migration*. Nature 329: 261-263, 1987.
- Hosang M. — *Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity*. J. Cell. Biochem. 29: 265-273, 1985.
- Jongen W. M. F., Fitzgerald D. J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T. J., Gros D., Takeichi M., Yamasaki H. — *Regulation of connexin 43 — mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin*. J. Cell Biol. 114: 545-555, 1991.
- Liotta L. A., Mandler R., Murano G., Katz D. A., Gordon R. K., Chiang P. K., Schiffmann E. — *Tumor cell autocrine motility factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3302-3306, 1986.
- Mareel M. — *Cell-cell adhesion molecules in tumor invasion*. Eur. J. Cell Biol. 53 (Suppl. 31): 46, 1990.
- Musil L. S., Beyer E. C., Goodenough D. A. — *Expression of the gap junction protein connexin 43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation*. J. Membr. Biol. 116: 163-175, 1990.
- Musil L. S., Cunningham B. A., Edelman G. M., Goodenough D. A. — *Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines*. J. Cell Biol. 111: 2077-2088, 1990.
- Nicolson G. L., Dulski K. M., Trosko J. E. — *Loss of intercellular junctional communication correlates with metastatic potential in mammary adenocarcinoma cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 473-476, 1988.
- Rosen E. M., Meromsky L., Setter E., Vinter D. W., Goldberg I. D. — *Quantitation of cytokine-stimulated migration of endothelium and epithelium by a new assay using microcarrier beads*. Exp. Cell Res. 186: 22-31, 1990.
- Schor S. L., Schor A. M., Grey A. M., Rushton G. — *Foetal and cancer patient fibroblasts produce an autocrine migration-stimulating factor not made by normal adult cells*. J. Cell Sci. 90: 391-399, 1988.
- Schor S. L., Schor A. M., Rushton G. — *Fibroblasts from cancer patients display a mixture of both foetal and adult-like phenotypic characteristics*. J. Cell Sci. 90: 401-407, 1988.
- Stoker M. — *Effects of scatter factor on motility of epithelial cells and fibroblasts*. J. Cell Physiol. 139: 565-569, 1989.
- Stoker M., Perryman M. — *An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts*. J. Cell Sci. 77: 209-233, 1985.
- Stoker M., Gherardi E., Perryman M., Gray J. — *Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility*. Nature, Lond. 327: 239-242, 1987.

- Stoker M., Gherardi E. — *Regulation of cell movement: the motogenic cytokines*. Biochim. Biophys. Acta 1072: 81–102, 1991.
- Takeichi M. — *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Ann. Rev. Biochem. 59: 237–252, 1990.
- Thierry J. P. — *Mechanism of cell migration in the vertebrate embryo*. Cell. Differ. 15: 1–15, 1984.
- Tingstrom A., Blikstad I., Aurivillius M., Obrink B. — *C-CAM (Cell-CAM 105) is an adhesive cell surface glycoprotein with homophilic binding properties*. J. Cell Sci. 96: 17–25, 1990.
- Vanhamme L., Rolin S., Spirer C. — *Inhibition of gap-junctional intercellular communication between epithelial cells transformed by the activated H-ras-1 oncogene*. Exp. Cell Res. 180: 297–301, 1989.
- Vestweber D., Kemler R., Ekblom P. — *Cell-adhesion molecule uvomorulin during kidney development*. Dev. Biol. 112: 213–221, 1985.
- Vleminck K., Vakaet L. Jr., Mareel M. M., Fiers W., Van Roy F. — *Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role*. Cell 66: 107–119, 1991.