

Received: 17.11.2016
Accepted: 18.12.2017
Published: 17.05.2018

Struktury protruzyjne i retrakcyjne formujące się podczas migracji komórki

Protrusive and retractive structures formed during cell migration

Aleksandra Kuzan, Olga Michel

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Streszczenie

Migracja komórkowa jest ważna dla wielu procesów fizjologicznych, jest również przyczyną przerzutowania nowotworów oraz innych zjawisk patologicznych. W związku z różnorodnością strukturalną i funkcjonalną komórek obserwuje się różnorodne struktury formowane przy błonie komórkowej, które mogą rozpocząć bądź utrzymać ruch komórki. W artykule opisano 12 takich struktur: lamellipodium, lamellum, filopodium, mikrowypustki, bleby, lobopodium, invadopodium, podosomy, pofałdowania grzbietowe i obwodowe, pseudopodium oraz uropodium. Omówiono cechy charakterystyczne dla danej struktury, mechanizm powstawania i występowanie. Głównym białkiem strukturalnym prawie wszystkich wymienionych struktur jest aktyna, jej polimeryzacja wypycha błonę komórkową w stronę kierunku ruchu. Wykształcenie konkretnej protruzji zależy od tego jakie białka wiążące aktynę regulują proces asocjacji G aktyny do filamentów, np. Arp2/3 warunkuje powstawanie rozgałęzionych filamentów, dzięki czemu powstają płaskie szerokie lamellipodia, a fascyna umożliwia tworzenie długich wiązek, dzięki czemu powstają filopodia. Istnieje jednak niezależny od aktyny, ameboidalny sposób poruszania się komórek, w którym główną rolę odgrywa miozyna, a na powierzchni komórki pojawiają się pęcherzykowate struktury nazywane blebami. Część struktur jest związana z aktywnością proteolityczną, szczególnie invadopodia i podosomy, dzięki czemu komórki mogą degradować białka macierzy zewnątrzkomórkowej i przedostawać się w głąb tkanek. Struktury te nie tylko pozwalają na wysunięcie ciała komórki do przodu, aby umożliwić migrację, ale mogą również odgrywać pewną rolę w percepcji środowiska, służyć jako mechanosensory, wchodzić w interakcje z innymi komórkami. Kontrola powstawania struktur protruzyjnych ma duże znaczenie w onkologii, immunologii i medycynie sercowo-naczyniowej.

Słowa kluczowe:

migracja • lamellipodium • lamellum • filopodium • mikrowypustki • bleby • lobopodium • invadopodium • podosomy • pofałdowania grzbietowe • pofałdowania obwodowe • pseudopodium • uropodium • białka wiążące aktynę

Summary

Cell migration is essential to many physiological processes; however, it is also a cause of cancer metastasis formation and other pathological phenomena. Due to structural and functional variety of cells, a variety of structures formed by the cell membrane, which are designed to initiate or maintain cell movement, are observed. The work describes 12 such structures: lamellipodium, lamellum, filopodium, microspikes, blebs, lobopodium, invadopodium, podosomes, dorsal and peripheral ruffles, pseudopodium and uropodium. We described a characteristics of the structure, mechanism of its formation and occurrence. The key structural protein of almost all of these structures is actin, its polymerization pushes the cell membrane in the direction of movement. Formation of a specific protrusion depends on the actin binding proteins which

Keywords:	regulate the process of G actin association to the filaments. For example, Arp2/3 determines the formation of branched filaments, which results in the formation of wide, flat lamellipodium, and fascin enables the formation of long bundles, which results in filopodia formation. On the other hand, there is also an actin-independent way of movement, called amoeboid, in which myosin plays a central role and on the cell surface appear vesicular structures called blebs. Some structures are associated with proteolytic activity, particularly invadopodia and podosomes, through which the cells can degrade extracellular matrix and penetrate deeper into the tissues. These structures not only allow the extension of the cell body to enable migration, but they can also be involved in the environment perception, serve as mechanosensors and interact with other cells. The control of the formation of protrusive structures is of great importance in oncology, immunology and cardiovascular medicine.
Keywords:	migration • lamellipodium • lamellum • filopodium • microspikes • blebs • lobopodium • invadopodium • podosomes • dorsal ruffles • peripheral ruffles • pseudopodium • uropodium • actin binding proteins
GICID	01.3001.0012.0536
DOI:	10.5604/01.3001.0012.0536
Word count:	7349
Tables:	2
Figures:	3
References:	83

Adres autorki: dr Aleksandra Kuzan, Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław; e-mail: aleksandra.kuzan@gmail.com

Wykaz skrótów: **ABP** – białka wiążące się z aktyną (actin binding proteins), **ADF** – czynnik depolimeryzujący aktynę (actin depolymerizing factor), **ADF/kofilina** – rodzina białek wiążących aktynę, zawierająca białka kofilinę-1, kofilinę-2 oraz ADF, **AFAP110** – 1 białko zasocjowane z filamentami aktyny o masie 110 kD, znane również jako AFAP1 (actin filament-associated protein 1), **Arp2/3** – białko spokrewnione z aktyną 2/3 (actin related protein 2/3), **cAMP** – cykliczny AMP, **CDR** – koliste pofałdowania grzbietowe (circular dorsal ruffles), **ECM** – macierz pozakomórkowa (extracellular matrix), **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor), **ERM** – spokrewnione białka: ezryna, radyksyna i moezyna umocowujące mikrofilamenty do błony plazmatycznej, np. w mikrokosmkach (ezrin, radixin, moesin), **FAK** – kinaza ogniskowo-adhezyjna (focal adhesion kinase), **FHOD1** – 1 białko zawierające domenę FH1/FH2 (FH1/FH2 domain-containing protein 1), **Gab1** – białko oddziaływające z receptorem insulinowym (GRB2-associated binder 1), **GDI** – białko hamujące spontaniczną dysocjację GDP oraz uwalniające z błony białko G (guanine nucleotide dissociation inhibitor), **GEF** – białko wymieniające nukleotydy guanylowe w centrum aktywnym białka G (guanine nucleotide exchange factor), **HGF** – hepatocytowy czynnik wzrostu (hepatocyte growth factor), **ICAM-1, -2, -3** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej -1, -2, -3 (intercellular adhesion molecule), **IRS** – białko fosforylowane przez kinazę tyrozynową receptora insuliny (insulin receptor substrate), **JNK** – kinaza N-końcowego odcinka c-Jun (c-Jun N-terminal kinase), **mAbp1** – ssące białko wiążące aktynę 1, substrat kinazy Src (mammalian actin-binding protein 1), **mDia** – białko efektorowe małych białek G rodziny Rho (mammalian homologue of Drosophila diaphanous), **MMP** – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases), **MT1-MMP** – transmembranowa metaloproteinaza 1, inaczej zwana MMP 14, **MTOC** – centrum organizacji mikrotubul (microtubule organizing center), **NCK** – białko adaptorowe oddziałujące z białkami IRS, **PDGF** – czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (platelet-derived growth factor), **PGCs** – komórki rozrodcze ryby Danio (zebrafish primordial germ cells), **PI(3, 4)P2** – difosforan-3, 4-fosfatydyloinozytolu, **PI3K** – kinaza-3-fosfatydyloinozytolu (phosphatidyl-3-inositol kinase), **PIP2** – fosfatydyloinozytolo- 4, 5-bisfosforan, **PIP3** – fosfatydyloinozytolo-3, 4, 5-trifosforan, **PRs** – obwodowe pofałdowania błonowe (peripheral ruffles), **Rac** – małe białko G z rodziny Rho, **Cdc42** – białka z rodziny Rho hydrolizujące GTP, **Ras** – małe białko G kodowane przez protoonkogen ras będący homologiem wirusowego onkogenu zidentyfikowanego w wirusie mięsaka myszy (rat sarcoma), **Rho** – białko należące do rodziny małych białek G (Ras homologous), **ROCK** – kinaza zależna od Rho (Rho kinase), **RSV** – wirus mięsaka Rousa (Rous sarcoma virus), **SCAR/WAVE** – białka należące do rodziny białek WASP (WASP family verprolin homologous protein), **Src** – białkowa kinaza tyrozynowa, **Tapp1** – białko zawierające tandemowo domeny homologiczne do plekstryny 1 (tandem

PH (pleckstrin homology)-domain-containing protein-1), **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor β), **Tks5/Tks4** – substrat kinazy tyrozynowej z czterema/pięcioma domenami SH3, **VASP** – fosfoproteina stymulująca wazodylację (vasodilator-stimulated phosphoprotein), **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego (vascular endothelial growth factor), **WASP** – białko syndromu Wiskott-Aldrich (Wiskott-Aldrich syndrome protein), **WAVE** – białko homologiczne do werproliny (verprolin-homologous protein), **WIP** – białko oddziałujące z WASP (WASP-interacting protein).

WSTĘP

Migracja komórkowa jest głównym mechanizmem w wielu fizjologicznych procesach, takich jak morfogeneza, angiogeneza, gojenie ran, działanie systemu odpornościowego, a także w niektórych patologicznych procesach, np. ekspansja nowotworu czy rozrost blaszek miażdżycowych. Każdy rodzaj komórek ma inną charakterystykę, inną sztywność błony, morfologię, nieco inną konstrukcję cytoszkieletu. To wymusza inny sposób poruszania się. Typ migracji jest determinowany również przez skład macierzy zewnątrzkomórkowej, przez którą migrują. Niektóre komórki poruszają się dzięki pęcherzykowatym wypustkom, inne dzięki palczastym bądź wachlarzowatym protruzjom. Niektóre komórki mogą się poruszać pojedynczo, inne w grupach. W artykule skupiono się na ruchu indywidualnej komórki. Wyróżnia się trzy typy migracji pojedynczych komórek:

- ameboidalny,
- mezenchymalny i
- lobopodialny.

Syntetycznie rodzaje migracji przedstawiono w tab.1; każdemu rodzajowi przypisuje się charakterystyczne struktury protruzyjne, które są podstawą różnicowania tych typów. Dla ruchu ameboidalnego są to pęcherzykowate struktury zwane blebami, dla mezenchymalnego lamellipodia i filopodia, a dla ostatniego typu lobopodia. Wyróżnia się również mikrowypustki, fałdy grzbietowe i obwodowe, inwadopodia, podosomy oraz pseudopodia. Niektóre z tych struktur są wykształcane typowo przez komórki hodowane tylko w sztucznych dwuwymiarowych warunkach (2D), podczas gdy te same komórki mogą migrować w zupełnie inny sposób w warunkach *in vivo* oraz hodowlach przestrzennych (3D). Dodatkową komplikacją dla badaczy jest to, że na jednej komórce może się pojawiać jednocześnie kilka struktur, np. lamellipodia, filopodia i bleby [17]. Dość prosta w porównaniu do struktur protruzyjnych wydaje się struktura retrakcyjna, gdyż do niej zalicza się jedynie uropodium.

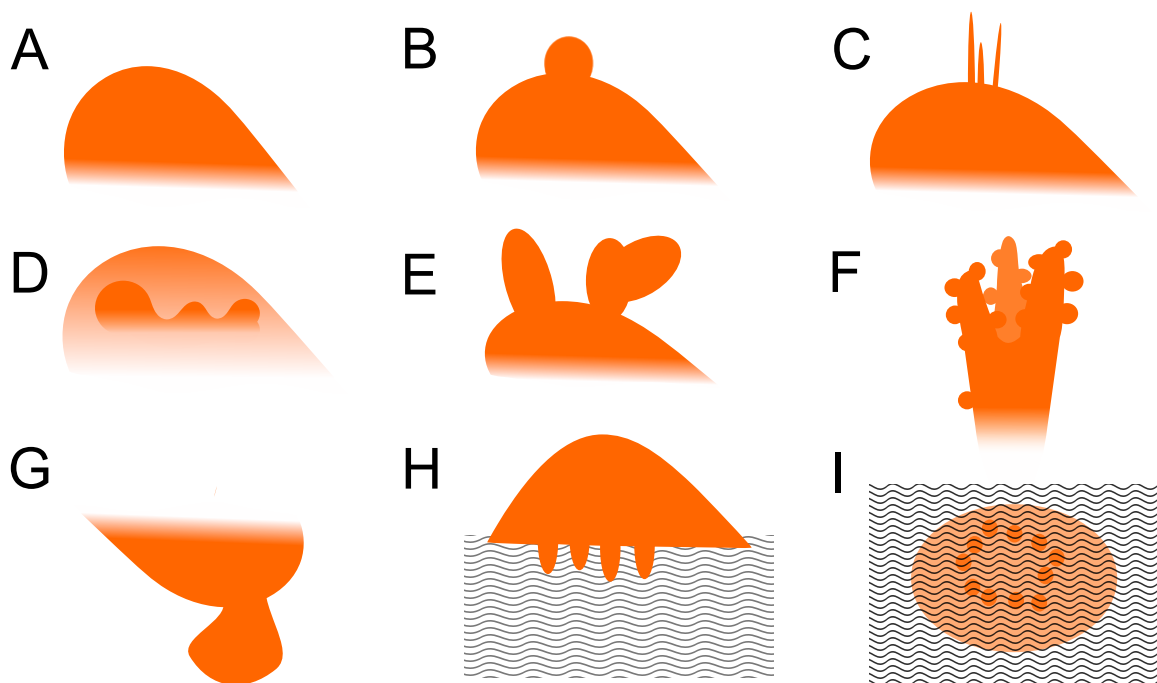
Prace nad opisem biochemii i biomechaniki tych struktur trwają już prawie 40 lat. Niestety w związku z brakiem jednoznacznych definicji w literaturze przedmiotu, czy też przez problemy metodologiczne i pojawiające się artefakty, pojawiają się dość duże problemy w nomenklaturze (lobopodia nazywa się czasem wymiennie blebami, podobnie filopodia mikrowypustkami, a lamel-

lipodia pofałdowaniami grzbietowymi, natomiast pseudopodia to w niektórych pracach ogólne określenie wszystkich struktur protruzyjnych). Motywacją do podjęcia niniejszej pracy było usystematyzowanie obecnego stanu wiedzy na temat tych struktur. Warto zaznaczyć, że poznanie mechanizmów rządzących powstawaniem struktur umożliwiających migrację ma ogromne znaczenie kliniczne, może pomóc w opracowaniu strategii terapeutycznych i diagnostycznych w przypadku nowotworów, infekcji i wielu innych chorób.

LAMELLIPODIUM

Lamellipodium jest strukturą charakterystyczną dla komórek poruszających się ruchem mezenchymalnym (takich jak fibroblasty czy keratynocyty), ale pojawia się również w komórkach kulistych, dla których bardziej typowym jest ruch ameboidalny, np. w leukocytach [52, 61]. Występuje typowo w hodowlach komórkowych 2D, ale obserwuje się ją również w wolno poruszających się komórkach hodowanych w warunkach 3D. Występuje na froncie zarówno pojedynczej komórki, jak i na czole komórek poruszających się ruchem kolektywnym [54]. Strukturę po raz pierwszy opisał Abercrombie ponad 40 lat temu jako cienką, obłonioną warstwę cytoplazmy umiejscowioną na frontalnej części migrującej komórki [1]. Grubość typowego lamellipodium wynosi około 200 nm, a szerokość waha się w granicach 1-5 μm [63]. Stężenie aktyny w tym obszarze jest stosunkowo wysokie, około 450 μM F aktyny i około 95 μM G aktyny [42]. Jest to region komórki, w którym szczególnie intensywnie zachodzi polimeryzacja aktyny [63], a powstające filamenty tworzą gęstą sieć będącą stosunkowo sztywnym szkieletem umożliwiającym komórce migrację. Niezabezpieczone dodatnie końce znajdują się w lamellipodium tylko na przestrzeni 0,1-0,2 mikrometra od krawędzi wiodącej komórki, podczas gdy wolne ujemne końce (zabezpieczone lub nie) są dopiero za obszarem 1 mikrometra od krawędzi wiodącej [61]. Schematycznie strukturę przedstawiono na ryc. 1, panel A; zdjęcie komórki z zaznaczonym lamellipodium na ryc. 2.

Szczegółowe badania wykazały, że oprócz aktyny lamellipodium budują różne białka, w zależności od odległości od błony komórkowej. W przypowierzchniowej warstwie znajdują się głównie: Arp 2/3 (białko spokrewnione z aktyną 2/3, actin related protein 2/3), filamina, Irs53 (substrat receptora insuliny, insulin receptor tyrosine kinase substrate), profilina, profilaktyna, GEF (białko



Ryc. 1. Schemat struktur protruzyjnych i retrakcyjnych: lamellipodium (A), blebs (B), filopodium (C), pofałdowanie grzbietowe (D), pseudopodium (E), lobopodium (F), uropodium (G), invadosom (podosom bądź invadopodium, H), rozeta podosomów (I); A-G: widok z góry, H: widok z boku, I: widok z dołu; liniami falowanymi zaznaczono macierz zewnątrzkomórkową

wymieniające nukleotydy guanylowe w centrum aktywnym białka G, guanine nucleotide exchange factor), ADF/kofilina (rodzina białek wiążących aktynę, zawierająca białka kofilinę-1, -2 oraz ADF – czynnik depolimeryzujący aktynę), Scar/WAVE (białka należące do rodziny białek WASP, WASP family verprolin homologous protein), Cdc42/Rac (białka z rodziny Rho hydrolizujące GTP). Natomiast w podpowierzchniowej warstwie głównymi białkami są: filamina, miozyna I, fascyna, ADF kofilina, Abp1p, Arp 2/3, α -aktinina, kortaktyna, miozyna X [7, 61]. Funkcje niektórych z tych białek syntetycznie uwzględniono w tab. 2.

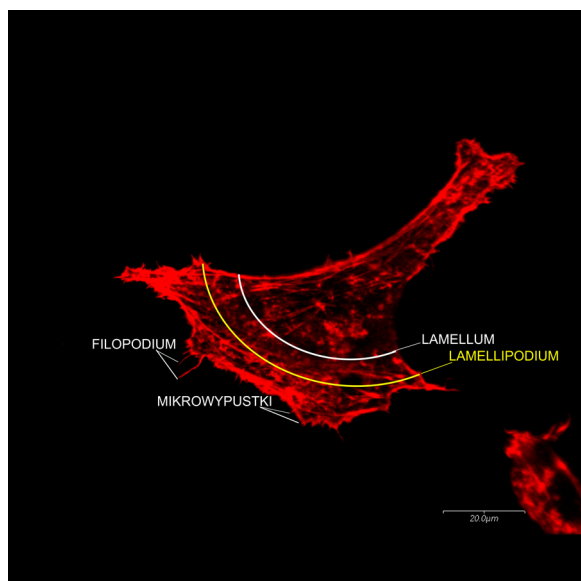
Model inicjowania tego rodzaju protruzji jest bardzo złożony, a jego mechanizm, jest wyjaśniany przez kilka teorii, np. model sieci dendrytycznej [7]. We wszystkich główną rolę odgrywa Arp2/3, kompleks białek odpowiadających za rozgałęzianie filamentów pod kątem 70° , co determinuje tworzenie sieci. Jest to również ABP (białko wiążące aktynę, actin binding protein), które zabezpiecza ujemne końce i zabezpiecza sieć aktynową w lamellipodium przed depolimeryzacją. Kompleks składa się z siedmiu podjednostek, przy czym Arp 2 i 3 charakteryzują się znaczną homologią w sekwencji i strukturze do G-aktyny, a inne podjednostki (ARPC1–5) mają charakterystyczną, unikalną strukturę [39]. Arp2/3 jest aktywowane przez białka z rodziny WASP, z których najbardziej znanym jest WASP (białko syndromu Wiskott-Aldrich, Wiskott-Aldrich syndrome protein) i SCAR/WAVE, które mają wiele izoform u ssaków. Częstkami sygnałnymi do formowania lamellipodium jest Rac, które należy do Rho GTPaz [27]. Najpro-

ściej ogólny przebieg procesu tworzenia lamellipodiów można przedstawić w następujący sposób:

- Rac aktywuje Scar/WAVE i/lub dostarcza je do błony,
- C koniec Scar/WAVE oddziałuje z G aktyną i Arp 2/3 zlokalizowanym na innym filamentcie,
- zmiana konformacji białek,
- powstaje odgałęzienie filamentu pod kątem 70° ,
- dodatni koniec wydłużanego filamentu jest utrzymywany przy błonie przez VASP, zykсынę i inne białka,
- podczas elongacji Arp2/3 oddysocjowuje od Scar/WAVE, ale zostaje zasocjowany na skrzyżowaniu filamentów, gdzie zabezpiecza filament przed depolimeryzacją od ujemnego końca,
- dodatni koniec po jakimś czasie zostaje zazapieczkowany, podczas gdy inne, nowo rodzące się filamente utrzymują protruzję,
- oddysocjowanie Arp2/3 dalej od krawędzi wiodącej pozwala na depolimeryzację od ujemnego końca, co jest ułatwiane też przez ADF/kofilinę [69].

LAMELLUM

Jest to obszar za lamellipodium leżący 3-15 μm od krawędzi wiodącej komórki (zaznaczono na ryc. 2), zbudowany z długich, nierozgałęzionych filamentów aktynowych o średnicy 100-300 nm, przy czym proces polimeryzacji i depolimeryzacji zachodzi prawie 10 razy wolniej niż w obszarze lamellipodium [51,77]. Wolniejszy jest też przepływ cytoplazmy, jej prędkość w zależności od typu komórki i jej stanu wynosi 0,05-2,5 mm/



Ryc. 2. Komórka linii BE, wybarwienie szkieletu aktynowego falloidyną, z zaznaczeniem lamellipodium, lamellum, filopodium i mikrowypustek

min, podczas gdy w lamellipodium 0,5-7 mm/min [3]. W lamellum miozyna II oddziałuje z filamentami, co powoduje skurcz ciała komórki i retrakcję części dystalnej komórki [12]. Dodatkowym elementem odróżniającym lamellum od lamellipodium jest brak aktywnych Arp2/3 i ADF/kofiliny [63]. Istotną rolę odgrywa białko wimentyna, która kontroluje szerokość lamellum, jej brak zwiększa szerokość struktury [29]. Filamenty stabilizuje tropomiozyna [66]. W lamellum, przynajmniej w niektórych komórkach są tworzone podosomy [60].

FILOPODIUM

Filopodium jest charakterystyczną, palczastą wypustką tworzoną przez wiązkę 15-20 filamentów aktynowych. Struktura ma średnicę 0,1-0,2 μm , a jej długość wynosi od kilku do nawet kilkudziesięciu μm [21,34,51]. Schematycznie strukturę przedstawiono na ryc. 1, panel C; zdjęcie komórki z zaznaczonym lamellipodium przedstawiono na ryc. 2. Filopodium jest typową strukturą protrudującą, komórka wytwarza je w kierunku ruchu.

Uważa się nawet, że może odgrywać pewną rolę w percepcji środowiska [19,34].

Pierwotnie uważano, że protruzja wyrasta z lamellipodium, dowiedziono jednak, że filopodium może się pojawiać niezależnie od tej struktury [53,71].

W tworzenie filopodium jest zaangażowane, oprócz aktyny, wiele innych białek, z których każde spełnia swoistą funkcję. Uważa się, że głównym białkiem odpowiadającym za formowanie długich filamentów aktyny budujących filopodia jest fascyna, ma też odpowiadać za ich stabilizację [40]. Działanie fascyny opiera się na regulacji stopnia skręcenia filamentu, przez co reguluje możliwość przyłączania się do aktyny innych białek, takich jak kofilina czy miozyna [68].

Za nukleację filamentów w filopodium odpowiadają m.in. forminy - białka rekrutujące monomery aktyny do tworzenia filamentu. Te same białka, z udziałem VASP i pokrewnych, tj. Mena i Evl (Ena/VASP proteins) są odpowiedzialne za elongację tych wypustek [6, 21]. Ena/VASP zabezpiecza dodatnie końce filamentów przed zaczepkowaniem, a także wspiera dostarczanie monomerów do rosnącego końca filopodium [53]. Forminy również odpowiadają za tworzenie się nierozgałęzionych filamentów. Jedno z tych białek - mDia (białko efektorowe małych białek G rodziny Rho, mammalian homologue of *Drosophila* diaphanous) uznano za główny czynnik umożliwiający polimeryzację aktyny w filopodiach. Oddysocjowanie aktyny od filamentów „pod” filopodium zapewnia kofilina - białko wiążące aktynę, które odpowiada za depolimeryzację aktyny. Degraduje filamenty, w ten sposób generując przy krawędzi wiodącej nowe, niezaczepkowane filamenty [21,27]. Innym ważnym białkiem, warunkującym możliwość ruchu pionowego filopodiów jest miozyna X [79]. Arp 2/3, charakterystyczne dla lamellipodium występuje również w filopodium [30].

Filopodia mogą być formowane w dwojaki sposób: z rozgałęzionych filamentów dzięki działaniu białek „pakujących”, takich jak fascyna lub są bezpośrednio tworzone z nierozgałęzionych filamentów dzięki białkom (np. forminy) [27]. Najprostszy model inicjowania filopodium zakłada następujące kroki:

Tabela 1. Porównanie głównych typów ruchu komórkowego: mezenchymalnego, ameboidalnego i lobopodialnego

	Ruch mezenchymalny	Ruch ameboidalny	Ruch lobopodialny
Główne białka	Arp2/3 i SCAR/WAVE, pod kontrolą Rac	miozyna II, Rho, ROCK, ezryna	aktyna, miozyna II, ROCK i RhoA
Typ protruzji	płaskie	pęcherzykowe	cylindryczne z pęcherzykami
Zależność od metaloproteinaz w warunkach 3D	tak	nie	nie
Strukturalna rola filamentów aktynowych	tak	nie	nie
Ilość energii potrzebna do wytworzenia protruzji	duża	mała	duża

Tabela 2. Wybrane białka wiążące aktynę zaangażowane w proces migracji

ABP	Funkcja	Występowanie w strukturach	Zmiana ekspresji w ludzkich nowotworach
Arp2/3	rozgałęzianie filamentów, czepczykuje ujemne końce i zabezpiecza sieć aktynową w lamellipodium przed depolimeryzacją	lamellipodium, inwadopodium, podosomy, pofałdowania grzbietowe i obwodowe, pseudopodium	+ płuc, piersi, - jelita grubego
Ena/VASP	polimeryzacja aktyny na ujemnych końcach	filopodium/lamellipodium	+ piersi
Cdc42	aktywuje LIMK i N-WASP	filopodium, lobopodium	+ piersi
Rac1	aktywuje LIMK i WAVE	lamellipodium, lobopodium	+ piersi, prostaty
WAVE1,2,3	nukleacja filamentów, tworzenie zaczątków polimeryzacji	lamellipodium, pofałdowania grzbietowe i obwodowe	+ płuc, piersi, jelita grubego
Kofilina	tnie filanty, generuje ujemne końce, czepczykuje, depolimeryzuje	lamellipodium, inwadopodium	+ nerek, kolczystokomórkowy skóry, jajnika, piersi
N-WASP	podwyższa aktywność Arp2/3	lamellipodium, inwadopodium, podosomy	- piersi
Fascyna	tworzenie wiązek F- aktyny	filopodium, inwadopodium	+ jelita grubego, kolczystokomórkowy skóry, piersi
Rho A, C	aktywacja ROCK1,2 i niektórych DRF	włókna naprężeniowe, korowa część komórki, lobopodium, uropodium	+ wiele rodzajów
ROCK 1,2	fosforylacja MLC, MYPTI, CPI-17, LIMK	włókna naprężeniowe, korowa część komórki, lobopodium, uropodium	+ stercza
Tropomiozyna	stabilizacja filamentów	włókna naprężeniowe, lamellum	- piersi, neuroblastoma, + trzustki, kolczystokomórkowy skóry
Filamina	umożliwianie przestrzennego ułożenia filamentów pod dużymi kątami	lamellipodium	+ stercza, piersi, płuc, jelita grubego, czerniak, neuroblastoma
Ezryna	łączy filanty aktynowe z białkami błony, reguluje adhezję	bleby, uropodia	+ piersi, jajnika, płuc, mózgu
Formina	nukleacja i wydłużanie istniejących filamentów, ochrona przed białkami czepczującymi	bleby, pseudopodium	+ jelita grubego, żołądka, pęcherza

Oznaczenia dla kolumny o zmianie ekspresji w ludzkich nowotworach: „+”- podwyższona ekspresja, „-”- obniżona ekspresja.

- PIP2 (fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan) uwalnia Cdc42 (białko z rodziny Rho hydrolizujące GTP) z kompleksu inhibitorowego z GDI (białko hamujące spontaniczną dysocjację GDP oraz uwalniające z błony białko G (guanine nucleotide dissociation inhibitor),
- Cdc42 asocjuje do błony,
- Cdc42 i PIP2 wiąże do N końca N-WASP,
- eksponowany C koniec N-WASP wiąże Arp2/3 i G aktynę, zmieniając konformacyjnie Arp2/3 i następuje nukleacja nowego filamentu,
- wydłużanie filamentu, Arp2/3 oddysocjowuje od N-WASP, ale pozostaje przyczepiony do ujemnego końca filamentu,
- rosnący dodatni koniec powoduje wysuwanie się protruzji filopodium; przy wydłużającym się końcu jest utrzymywany VASP, zasocjowany do błony, prawdopodobnie przez zysynę i inne białka [69],
- forminy ochraniają dodatni koniec filamentu przed zaczepkowaniem i promują wydłużanie filamentu bez rozgałęziania [52].

Uważa się, że filopodia spełniają liczne, różnorodne funkcje, w zależności od typu komórki. W komórkach nowotworowych szczególne znaczenie ma to, że regulują zdolność do poruszania się *in vitro*, mają też tendencję do metastazy *in vivo*, co przekłada się na inwazyjność nowotworu [4,14]. Dzięki występowaniu na ich koniuszkach bądź wzdłuż struktury integrzyn i/lub kadheryn odpowiadają również za adhezję i interakcje między komórkami. W innych typach komórek, szczególnie w makrofagach bardzo ważną funkcją jest percepcja środowiska. Komórki te mogą nawet wysuwać filopodia w roli macek, które przyciągają cząstki w stronę ciała komórki. Również w neuronach spełniają funkcje sensoryczne, pozwalając na analizę otoczenia komórki [19].

WYNICOWANIE BŁONY PODOBNE DO FILOPODIUM I MIKROWYPUSTKI

Przy opisie struktur migracyjnych warto również wspomnieć o podobnych strukturach - wynicowaniu błony

podobnym do filopodium (filopodium-like membrane evagination). Różni się od filopodium przede wszystkim tym, że nie są tworzone przez wiązki filamentów, najwyżej przez pojedyncze cząstki F aktyny. Ich kształt wynika z równoległego ułożenia cząstek IRSp53 [21]. Istotnym białkiem, który buduje te struktury to fascyna-1, ABP, która tworzy ściśle upakowane wiązki aktyny [2].

Mikrowypustki (microspikes lub ribs) są to najmniejsze wyróżnialne wypustki na powierzchni błony komórkowej. Ich cechą charakterystyczną jest to, że są zakotwiczone w lamellipodium, tzn. F aktyna, która je buduje sięga głęboko w lamellipodium. Jest to cecha wyróżniająca tę strukturę od filopodium, gdyż ten ostatni nie jest zakotwiczony w lamellipodium, a tylko na nim bierze swój początek. Uważa się, że mikrowypustki mogą się jednak przekształcać w filopodium i na odwrót [21]. Mikrowypustki zaznaczono na ryc. 2.

BLEBY

Bleby są strukturami pęcherzykowatymi, podobnymi do tych, które powstają w komórce ulegającej apoptozie. Ich schemat przedstawiono na ryc. 1, panel B, a zdjęcie komórki wykształcającej bleb zamieszczono na ryc. 3. Bleb to protruzja generowana przez aktomiozynową korę, bez udziału filamentów aktynowych [62]. Powstawanie tych struktur jest fizjologicznym procesem towarzyszącym poruszaniu się komórek czy cytokinezie. Co istotne, do wytworzenia blebu potrzeba mniej energii niż do powstawania lamellipodium [16].

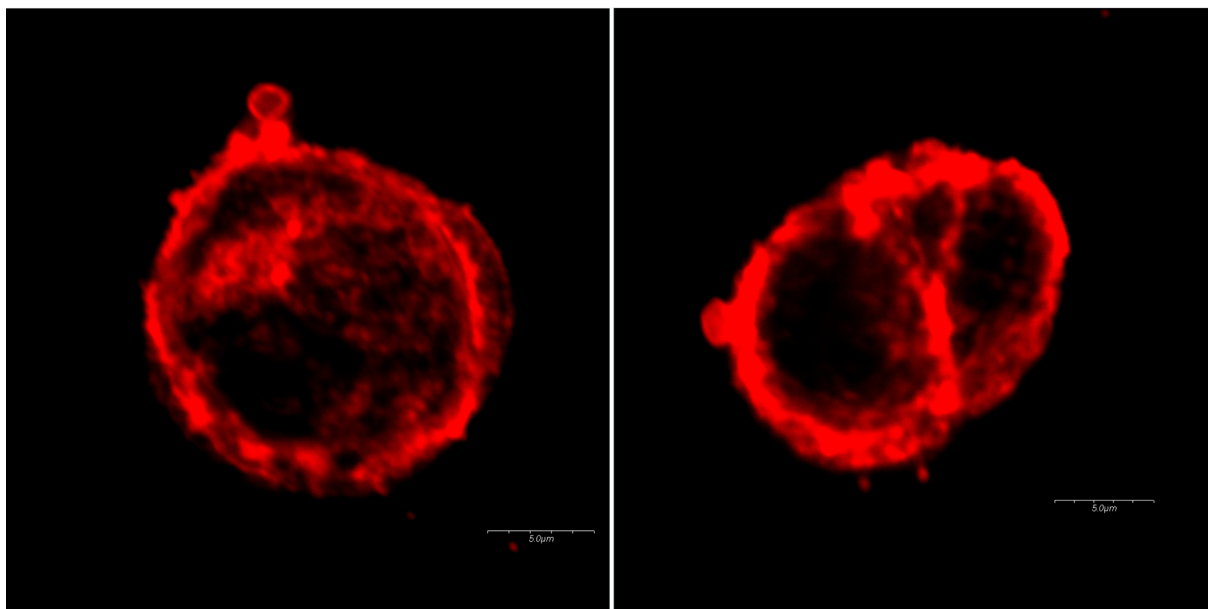
Blebing charakteryzuje komórki o niskiej adherentności, zaokrąglone lub elipsoidalne, bez włókien naprężę-

niowych [62]. Pojawianie się blebów przypisuje się do środowisk przestrzennych (3D), szczególnie w komórkach nowotworowych, embrionalnych i macierzystych, niemniej jednak zaobserwowano pojawianie się takich struktur również w ramach poruszania się komórki na płaskim podłożu (środowisko 2D), np. u *Dictyostelium discoideum* i *Entamoeba histolytica*. Niektóre komórki, np. pierwotne komórki rozrodcze ryby *Danio* (PGCs, zebrafish primordial germ cells) poruszają się wyłącznie za pośrednictwem blebów [46,82].

Regulacja kierunkowości ruchu ameboidalnego jest niewyjaśniona, ale uważa się, że umiejscowienie blebów jest ściśle związane z gradientem chemoatraktanta [62]. Jednak niektóre komórki, np. komórki czerniaka A375, tworzą bleby na całej powierzchni, więc nie są zdolne do ruchu kierunkowego [37]. Mechanizm powstawania blebu zakłada [37,51,53]:

- odrywanie błony komórkowej od sieci białek podbłonowych jako efekt działania aktomiozyny,
- powstaje ciśnienie hydrostatyczne wewnątrz komórki,
- odkształcenia sfałdowań błony powstałych podczas skurczów i skracania sieci aktynowo-miozynowej,
- napływ lipidów do podstawy pęcherzyka,
- fuzja pęcherzyków aparatu Golgiego z błoną komórkową,
- ezryna łączy cytoszkielet aktynowy z błoną i innymi białkami łączącymi aktynę z błoną,
- inne białka wiążące aktynę np. z rodziny ERM zostają zgromadzone w blebie, tam przy błonie z aktyną i ABP tworzą nową korę aktynową.

Powrót błony do stanu pierwotnego, czyli retrakcja blebu trwa około 2 min i zachodzi po tym jak aktyna



Ryc. 3. Przykład komórek wykształcających bleby, komórki linii LS174T, wybarwienie szkieletu aktynowego falloidyną

polimeryzuje na powierzchni przybłonowej pęcherzyka za pośrednictwem białek, tj. forminy mDia lub FHOD1 (1 białko zawierające domenę FH1/FH2, FH1/FH2 domain-containing protein 1) oraz Rac1 (białko z rodziny Rho hydrolizujące GTP) [16,53]. W komórkach poruszających się retrakcja nie musi zachodzić, po wysunięciu blebu ciało komórki może się przesunąć w kierunku ruchu wskutek skurczu tylnej części komórki [16].

To, że bleby nie są związane z elongacją filamentów tłumaczy to, że leki blokujące migrację *in vitro* (przez blokowanie tworzenia lamellipodium czy filopodium) nie działają *in vivo* (gdy komórki poruszają się w sposób ameboidalny, przez wytwarzanie blebów) [81].

Wiadomo, że komórki nowotworowe mogą przekształcać typ migracji z ameboidalnego do mezenchymalnego, co wiąże się ze zmianą morfologii i aktywności wielu białek [48]. Komórki nowotworowe poruszające się w sposób ameboidalny są szczególnie niebezpieczne ze względu na to, że migrują znacznie szybciej niż komórki poruszające się w sposób mezenchymalny. Co więcej, wiele komórek może się przestawiać na typ ameboidalny pod wpływem takich czynników jak ograniczenie przestrzeni i zmniejszona adhezja [36] czy zwiększona kurczliwość miozyny [55].

LOBOPODIA

Lobopodia to niewielkie uwypuklenia spowodowane ciśnieniem wewnątrzkomórkowym występujące u ameby o podtypie *Lobosa* [50]. Struktury te zostały jednak zaobserwowane również w fibroblastach, gdy te migrują w specyficznych warunkach [16]. Lobopodia fibroblastów są dużymi, cylindrycznymi, tępo zakończonymi protruzjami z bocznymi małymi blebami (ryc. 1, panel F). Wskutek indukowanej migracji wytwarzają się z blebów (przez ich wydłużenie) i w odróżnieniu od filopodiów i lamellipodiów powstają i funkcjonują niezależnie [25].

Mechanizm ruchu zakłada, że komórki z pomocą kurczliwej aktomiozyny poruszają się w trójwymiarowej macierzy zewnątrzkomórkowej. Stwierdzono, że aktyna i miozyna przez oddziaływanie mogą kontrolować ciśnienie wewnątrz migrującej komórki, ich skurcz powoduje wzrost ciśnienia i powstawanie pęcherzyków lobopodialnych. Bleby są tu strukturami działającymi na zasadzie kończyn, które „przepychają się” przez włókna macierzy zewnątrzkomórkowej [49]. Porównując z innymi strukturami, lobopodia fibroblastów charakteryzują się niskim poziomem białek wiążących aktynę oraz niewielką ilością korowej F-aktyny [5]. Lobopodialny, lamellipodialny oraz ameboidalny ruch można rozróżnić opierając się na dwóch istotnych cechach: aktywności miozyny II, ROCK (kinaza zależna od Rho) i RhoA oraz stopnia adhezji komórki do macierzy. Według Petrie i wsp. lobopodium wykształca się gdy aktywność RhoA jest duża, macierz zewnątrzkomórkowa ma liniową elastyczność, a sygnalizacja za pośrednictwem Rac1, Cdc42 i PIP3 jest

niespolaryzowana. Wraz ze spadkiem aktywności RhoA, ROCK i miozyny II oraz gdy elastyczność macierzy staje się nieliniowa, komórka zaczyna zatracać lobopodia i poruszać się typowym ruchem mezenchymalnym, za pomocą lamellipodiów [50].

INWADOSOMY (PODOSOMY I INWADOPODIA)

Inwadosomy to struktury bogate w aktynę, wytwarzane na „brzuszej” powierzchni komórki, kontaktującej się z macierzą, mogące ją degradować i penetrować. Kształtem są zbliżone do filopodiów, jednak znacznie różnią się od nich właściwościami, budową i występowaniem w innej części komórek. Głównymi białkami budującymi invadosomy, poza aktyną, są kortaktyna, N-WASP, białka adaptorowe Tks4 i Tks5 (substrat kinazy tyrozynowej z czterema/pięcioma domenami SH3, Tks5 wcześniej znana jako Fish) oraz transmembranowa metaloproteinaza MT1-MMP (membrane-type metalloproteinase 1; inaczej zwana MMP-14) [45]. MT1-MMP ma tu podstawowe znaczenia dla inwazji ze względu na różnorodność substratów jakie trawi. Są to m.in. prometaloproteinazy (np. pro-MMP-2, MMP-13), kolagen typu I, II, III, żelatyna, fibronektyna, fibryna, lamininy 1 i 5, witronektyna i inne [26]. Funkcją invadosomów jest przede wszystkim umożliwianie wytworzenia drogi komórce przez ECM (macierz pozakomórkową, extracellular matrix), regulują również przyczepność komórki, a także służą jako mechanosensory podczas przeciskania się przez białka macierzy [45].

Rozróżnia się ogólnie dwa rodzaje takich mikrodomen: podosomy i invadopodia (ryc. 1, panel H). Uproszczone rozróżnienie między tymi strukturami polega na tym, że struktury zagłębiające się w ECM u komórek nowotworowych to invadopodia, a w komórkach zdrowych to podosomy [45]. Na czym polega pokrewieństwo podosomów i invadopodów pod względem strukturalnym i czynnościowym nie jest wyjaśnione [70]. Niektórzy są zdania, że są to struktury identyczne, inni spodziewają się różnic i wykazują je doświadczalnie. Wykazano m.in., że invadopodia głębiej penetrują ECM i są dłużej stabilne niż podosomy. Można przeczytać również całkiem inne rozróżnienie strukturalne, jakoby podosomy rozciągały się w górę od brzusznej powierzchni komórki do cytoplazmy, podczas gdy invadopodia miałyby odwrotny „kierunek”, rozciągałyby się „pod” komórką, zagłębiając się w ECM [57].

Podosomy i rozety podosomów

Termin powstał w 1985 r., kiedy zaobserwowano rozetowo rozmieszczone punkty przyczepu komórki do macierzy zawierające winkulinę i α -aktyninę w fibroblastach transfekowanych RSV (wirusem mięsaka Rousa, Rous sarcoma virus) [45,72]. Badania nad strukturą i funkcją trwały dość intensywnie, ale dopiero w 2010 r. udało się po raz pierwszy opisać powstawanie podosomów w 3D, wykazując, że struktury te zagłębiają się w ECM według podobnego mechanizmu jak invadopodia

dia. Kontrola ich powstawania i funkcje *in vivo* nie są jeszcze dokładnie zbadane [45]. Wytwarzane są m.in. przez trombocyty, osteoklasty, miocyty naczyń krwionośnych, aktywowane komórki śródbłonna naczyniowego (zarówno tętnic, żył jak i naczyń włosowatych), makrofagi i komórki dendrytyczne [44,45,57,70], przy czym podosomy właściwie nie pojawiają się w nieaktywowanych komórkach nabłonka naczyniowego, ale po stymulacji VEGF (czynn timer wzrostu śródbłonna naczyniowego, vascular endothelial growth factor) czy TGF- β (transformujący czynnik wzrostu β , transforming growth factor β) liczba komórek wytwarzających podosomy wzrasta nawet do 40% [57].

Podosomy są obłonionymi aktynowymi rurkowatymi strukturami otoczonymi 250-500 nm pierścieniem zbudowanym z winkuliny i taliny, występujące najczęściej za krawędzią wiążącą komórki [70]. Mają szerokość 0,5-2 μm i długość nie mniejszą niż 2 μm [45,57]. Pierścień białek adhezyjnych i proteolitycznych, otaczających wiązkę F-aktyny, jest zorientowany prostopadłe do substratu i błony komórkowej. W rdzeniu oprócz aktyny znajdują się również białka odpowiadające za organizację aktyny, takie jak N-WASP, VASP, Arp2/3 i kortaktyna [58].

W niektórych komórkach występują klastry podosomów, struktury wielkości 4-10 mikrometrów, najczęściej pierścieniowo ułożone, zwane rozetami podosomów (podosome rosettes) [57] (ryc. 1, panel I). Pojedyncze podosomy w klastrze w sposób ciągły rosną i kurczą się. Sąsiednie podosomy są połączone siecią aktynowo-miozynową, w sposób który wydaje się skoordynowany, co powoduje powstawanie zjawiska falopodobnego [44].

Liczba zarówno pojedynczych podosomów, jak i rozet złożonych z podosomów wyraźnie wzrasta po stymulacji czynnikami, takimi jak VEGF, TGF- β czy estry forbolu, choć uważa się, że czynn timer i mechanizmy prowadzące do powstawania pojedynczych podosomów muszą się różnić od tych wywołujących powstawanie rozet [57]. Odkryto, że białka, takie jak mAbp1 (ssacze białko wiążące aktynę-1, substrat kinazy Src, mammalian actin-binding protein 1), JNK (kinaza N-końcowego odcinka c-Jun, c-Jun N-terminal kinase) i FAK (kinaza ogniskowo-adhezyjna, focal adhesion kinase), integryna $\alpha 6 \beta 1$ są zaangażowane w tworzenie rozet, a nie w pojedyncze struktury [57].

Podosomy czy też rozety podosomów są konieczne do przekroczenia błony podstawnej oraz śródbłonna naczyniowego [44]. Wykazano, że rozety podosomów formowane w śródbłonku naczyniowym są krytycznymi regulatorami angiogenezy. Komórki śródbłonna stymulowane VEGF nadekspresjonują integrynę $\alpha 6 \beta 1$. Natomiast wiązanie tej integryny z lamininą błony podstawnej blokuje powstawanie rozet i angiogenezę [57]. Zaburzenia w formowaniu podosomów powodują nieprawidłowości w rozwoju zarodkowym, u dojrzałych osobników w chorobach dotyczących układu odpornościowego i/

lub sercowo-naczyniowego (stymulacja miażdżycy przez migrację miocytów z medii do intymy) [45].

Inwadopodia

Termin invadopodia zaproponował Chen pod koniec lat 80 ub. wieku [15], nazwa jest zarezerwowana dla komórek nowotworowych. Mają kształt palczasty, ich szerokość wynosi 0,5-2 μm , a długość 2 μm lub więcej, często są umiejscowione, w przeciwieństwie do podosomów, pod jądrem komórkowym [45]. Wykazano ich obecność m.in. w nowotworze gruczołu sutkowego, stercza, jelita grubego, płuc i w czerniaku [78]. W warunkach 2D ich obecność koreluje ze stopniem inwazyjności. Jednak hodowane w warunkach 3D oraz *in vivo* są niezbędne również do wzrostu komórek [45].

Zablokowanie głównych białek budujących bądź regulatorów tworzenia invadopodiów, tj. Tks5, Tks4, kortaktyna blokowało przerzutowanie w kilku modelach raka u myszy, co sprawia, że czynn timer blokujące te białka są potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu chorych z nowotworami, a konkretnie w hamowaniu przerzutowania [78]. Uproszczony mechanizm powstawania invadopodium przedstawia się następująco:

Komórki po stymulacji czynnikami, takimi jak EGF (czynn timer wzrostu naskórka, epidermal growth factor), PDGF (czynn timer wzrostu pochodzący z płytek krwi, platelet-derived growth factor) czy TGF- β wytwarzają przyczep ogniskowy (focal adhesion) z białkami ECM za pośrednictwem integryn, Src (białkowa kinaza tyrozynowa) i FAK. Następnie zachodzi:

- Uwolnienie Src i wiązanie się go z Tks5, przyłączanie do regionów komórki zawierających PI(3, 4)P2 (difosforan-3, 4-fosfatydyloinozytolu).
- Rekrutacja i aktywacja białek regulujących polimeryzację, m.in. Arp2/3 i WIP (białko oddziałujące z WASP, WASP-interacting protein).
- Fosforylacja białek budujących invadopodia, m.in. kortaktyny, Tks5, fascyny, AFAP110 (białko zasocjowane z filamentami aktyny-1 o masie 110 kD, znane również jako AFAP1, actin filament-associated protein 1).
- Sekrecja MMP, głównie MMP-2 i MMP-9 przez invadopodium, prezentacja transmembranowej metaloproteinazy MT1-MMP na końcu struktury [45].

POFAŁDOWANIA BŁONOWE: GRZBIETOWE I OBWODOWE

Rozróżnia się dwie podstawowe struktury przypominające fałdy: grzbietowe oraz obwodowe/periferyjne. Określa się je jako struktury, które są zdolne do pionowego, równoległego do substratu rozciągania się od powierzchni grzbietowej lub obrzeża komórki. Fałdy grzbietowe znajdują się poza krawędzią wiodącą komórki, przeważnie bezpośrednio za lamellum. Najczęściej mają kolisty kształt, nazywa się je wtedy kolistymi pofałdowaniami grzbietowymi (CDR, circular dorsal ruffles) bądź też makropinosomami; mają długość

>0,2-10 μm i występują na różnych typach komórek, m.in. na makrofagach. Obwodowe pofałdowania (PRs, peripheral ruffles) natomiast znajdują się w obszarze lamellipodium i są typowo wachlarzowate [35,67]. Struktury te przedstawiono schematycznie na ryc. 1 (panel D).

PRs są stosunkowo trwałe, tworzone po około 1 min od stymulacji, a proces formowania, rozbudowy i przebudowywania trwa dopóki czynnik stymulujący jest obecny w otoczeniu. CDR są natomiast bardziej dynamiczne, ale przejściowe, pojawiają się tylko na 30-45 min po stymulacji, po tym czasie, nawet jeśli czynnik wzrostu jest w otoczeniu, komórka nie wytwarza kolistych pofałdowań grzbietowych. Uważa się, że funkcją CDR jest nie tylko inicjowanie ruchu komórek, ale również makropinocytosis, degradacja ECM, polaryzacja komórki oraz internalizacja receptorów kinaz tyrozynowych [10,47,67].

Pofałdowania błonowe są związane z mezenchymalnym typem migracji. Podczas migracji kierunkowej w warunkach 2D tworzy się wyłącznie fałda obwodowa, natomiast w warunkach 3D formują się obie te struktury. Podstawowymi białkami są białka WAVE (białko homologiczne do verproliny, verprolin-homologous protein) 1, niezbędne do wytwarzania fałdy grzbietowej i WAVE 2, niezbędne w formowaniu fałdy obwodowej [67]. Fałda grzbietowa uczestniczy w degradacji macierzy w migracji przez białka ECM za pośrednictwem metaloproteinaz. Złuszczacz metaloproteinaz-2 (MMP-2) jest aktywna w tym obszarze, oddziałuje z WAVE-1 na brzegach pofałdowania grzbietowego, co umożliwia penetrację tkanki [24,67].

Koliste pofałdowania grzbietowe są formowane w obecności dużych stężeń czynników wzrostu, takich jak naskórkowy czynnik wzrostu, hepatocytowy czynnik wzrostu (HGF, hepatocyte growth factor), płytkopochodny czynnik wzrostu [33,83]. Występujące w pofałdowaniach kinazy tyrozynowe wiążą ligand, następuje szybka internalizacja powstałego kompleksu, a zawartość ulega lizosomalnej degradacji. Prawdopodobnie ten mechanizm ma chronić komórkę przed nadmierną stymulacją czynnikami wzrostu. Argumentem za tą teorią jest to, że tworzenie CDR jest upośledzone w niektórych komórkach nowotworowych [33].

Formowanie pofałdowań błonowych jest zjawiskiem niezwykle skomplikowanym, w którym bierze udział duża ilość białek oraz innych czynników. Nie wyjaśniono jeszcze jaka jest organizacja cytoszkieletu aktynowego w tych strukturach ani jak powstają. W zdarzeniu tym biorą udział główne regulatory: Rac1, Gab1 (białko oddziaływające z receptorem insulinowym), NCK (białko adaptorowe oddziaływające z białkami IRS), PI3K (kinaza-3-fosfatydyloinozytolu, phosphatidylinositol-3-kinase), kompleksy składające się z wielu białek m.in. Arp 2/3, WAVE1. Odkryto także kilka nowych, regulujących powstawanie CDR: PI3K, mAbp1 czy Tapp1 (białko zawierające tandemowo domeny homologiczne do plekstryny-1, tandem PH (pleckstrin homology)-domain-containing protein-1) [24].

Zeng i wsp. badali rolę pofałdowań brzegowych w ruchliwości komórkowej za pomocą fibroblastów NIH 3T3 wysiewanych na substracie poliakrylamidowym. Wykazali, iż powstawanie CDR zwiększa trwałość kierunkowej migracji komórek, jednak nie wpływa na szybkość ich poruszania [83].

PSEUDOPODIA

Mimo że termin „pseudopodia” (pseudopod) jest często stosowany do ogółu struktur migracyjnych komórek, w tym artykule. Termin ten określa okresowo występujące struktury formowane w czasie ekspansji czoła komórki (ryc. 1, panel E). Pseudopodia stanowią wypełniane aktyną protruzje, charakterystyczne dla komórek szybko poruszających się, takich jak śluzowce *Dictyostelium discoideum* czy ludzkie neutrofile [59], a ich ruchliwość jest wynikiem polimeryzacji aktyny i sieciowania filamentów. Odgrywają znaczącą rolę w poruszaniu się komórek, nadając im prędkość, kierunek oraz trajektorię [75]. Pseudopodia powstają *de novo* prostopadle do powierzchni komórki bądź są wynikiem ich podziału. W takim wypadku wykształcają się pod kątem 55° w stosunku do istniejących już pseudopodiów. Najnowsze doniesienia wskazują, że pseudopodia mogą powstawać z przekształcania blebów, jak również bleby mogą być uwalniane z bocznych części pseudopodiów [73]. Potwierdza to założenie, że między różnymi strukturami protruzyjnymi zachodzi współpraca na różnych poziomach organizacji. Charakterystyczną cechą pseudopodiów jest samoorganizacja – poza inicjacją, rearanżację kształtu tych struktur zachodzą niezależnie od sygnałów zewnętrznych [8].

Główną rolę w regulacji dynamiki aktyny w pseudopodiach odgrywa powstawanie *de novo* oraz elongacja filamentów aktynowych. W procesie tym uczestniczy kilka kompleksów białkowych, spośród których najlepiej poznano kontrolowany przez białka z rodziny WASP/WAVE kompleks Arp2/3 oraz forminy [65]. Często wykorzystywanym modelem tworzenia pseudopodiów jest migracja komórek *Dictyostelium* w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowy chemoatraktant – cykliczny AMP (cAMP). Gradient cAMP może w różny sposób wpływać na formowanie pseudopodiów, w zależności od ich inicjacji. Jeśli dochodzi do podziału pseudopodiów gradient cAMP może powodować przesunięcie maksymalnie o 50% w stronę gradientu. W kontraście, kierunek pseudopodiów powstających *de novo* może ulec zmianie nawet w 100% pod wpływem gradientu cAMP [76]. Zaproponowano już kilka mechanizmów odpowiadających za chemotaksję. Cechą wspólną wszystkich ścieżek sygnałowych jest główna rola białek Ras C i Ras G. Jednym z proponowanych mechanizmów odpowiadających za formowanie pseudopodiów jest szlak PIP₃-niezależny [31]:

- Chemoatraktant cAMP wysyła sygnały za pośrednictwem pokrewnego białka heterotrimerycznego G i C.
- Lokalnie aktywowane białko pośrednie G spotyka w cytosolu kompleks białkowy TorC2 (kompleks celu rapamycyny, target of rapamycin complex 2).

- Aktywowany TorC2 przed powrotem do cytosolu fosforyluje kinazy białkowe PKBR1 i PKBA.
- W skład PKB wchodzi m.in. talina powiązana z formowaniem cytoszkieletu.

Jednak miozyna klasy I również może odgrywać istotną rolę w procesie polimeryzacji aktyny wywołanej chemoatraktantem. Wykazano, że PIP_3 wiąże się z domeną TH1 podzbiorów klasy miozyny I i przyciąga je do błony komórkowej, co wskazuje na istnienie mechanizmu przekazywania sygnału z PIP_3 do szkieletu aktynowego za pomocą miozyny I [13]. Niejednoznaczne dane świadczą o skomplikowaniu procesów odpowiadających za ruchliwość komórek oraz o potrzebie dalszego zgłębiania mechanizmów powstawania protruzji komórkowych, takich jak pseudopodia.

Warto nadmienić, że w związku z problemami w określeniu rodzaju struktur, które obserwują naukowcy *in vivo* stworzono termin „inwazyjne pseudopodia”, które mają mieć cechy tych wielu struktur, szczególnie filopodiów, lamellipodiów i invadosomów [38].

UROPODIA

O ile ekspansja frontalnej części komórki wymaga organizacji struktur cytoszkieletu *de novo*, o tyle zmiany zachodzące w ramach adhezji strefy tylnej dotyczą zorganizowanych wcześniej struktur cytoszkieletu aktynowego i są oparte przede wszystkim na aktywacji miozyny [32]. Uropod jest strukturą przypominającą ogon komórki (ryc.1, panel G), w obrębie której są skupione swoiste organelle, białka cytoszkieletu oraz receptory adhezyjne i sygnałowe [56]. Jest charakterystyczny dla komórek migrujących pod wpływem chemoatraktantów, takich jak śluzowce *Dictyostelium discoideum*, *Entamoeba histolytica*, ale również komórek układu immunologicznego: limfocytów B i T, monocytów, komórek NK, granulocytów czy komórek dendrytycznych. Struktura formuje się w ciągu jednej minuty od chwili stymulacji (w tym samym czasie na wiodącej krawędzi komórki uwydatniają się pseudopodia) [9]. Poza najistotniejszą rolę związaną z adhezją i ruchliwością, uropod może pełnić również inne funkcje, takie jak komunikacja między komórkami [74] czy udział w procesie apoptozy [20]. W skład aktywnych organelli uropodu wchodzi retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego oraz mitochondria [43]. Te ostatnie są transportowane do uropodu wzdłuż mikrotubul w czasie migracji leukocyta w procesie wymagającym udziału białka sygnałowego G_i oraz rozszczepienia mitochondriów [11].

Istotnym komponentem szkieletu uropodu jest tworzone z centrosomów centrum organizacji mikrotubul (MTOC, microtubule organizing center), które pełni istotną funkcję w organizacji szkieletu mikrotubulowego i nadawaniu kształtu komórkom. Mikrotubule bezpośrednio umiejscowione w okolicy centrum są stabilizowane przede wszystkim za pomocą acetylacji, co może świadczyć o roli, jaką odgrywa ten zestaw mikrotu-

bul w transporcie pęcherzykowym z udziałem dyneiny bądź w dostarczaniu mechanicznego wsparcia dla uropodu [23]. Zaburzenia w formowaniu mikrotubul nie wpływają jednak negatywnie na formowanie uropodu. Prawdopodobnie wynika to z aktywacji łańcucha lekkiego miozyny i w jego następstwie skurczu pierścienia aktomiozyny i przzerwania sieci powiązanych z mikrotubulami filamentów pośrednich wimentyny [23]. Dochodzi do protruzji błony komórkowej. Brown i wsp. dowiedli, że filamenty pośrednie wimentyny odgrywają znaczącą rolę w ochronie migrujących limfocytów T przed deformacją, a załamanie siatki wimentynowej pod wpływem indukowanej chemokinami polaryzacji limfocytów jest przykładem najbardziej gwałtownej reorganizacji filamentów na dużą skalę [9]. Wydaje się, że zarówno mikrotubule, jak i filamenty pośrednie wimentyny mają znaczący udział w utrzymaniu struktury uropodu, do tej pory jednak nie udowodniono jednoznacznie czy są one niezbędne do formacji tej struktury migracyjnej.

W obrębie uropodu są skoncentrowane również cząsteczki adhezyjne, takie jak ICAM-1, -2, -3 (cząsteczka adhezji międzykomórkowej -1, -2, -3, intercellular adhesion molecule) i leukosialina oraz białka wiążące aktynę z rodziny ezryna/radyksyna/moezyna (ERM) [41]. Prawdopodobnie interakcja między białkami ERM a cytosolowymi receptorami uropodu jest częścią mechanizmu prowadzącego do jego polaryzacji.

Aktywacja białek ERM jest procesem dwuetapowym i wymaga:

- Wiązania do PIP_2 .
- Fosforylacji reszt treoniny/seryny na C-końcu z udziałem kinazy ROCK [22].

Białka ERM mogą dostarczać informację zwrotną do białek RhoA za pomocą interakcji z Rho-GDI [28].

PODSUMOWANIE

W większości komórek migrujących, wiodąca krawędź komórki, wysuwana w kierunku ruchu, jest wyposażona w delikatne struktury protruzyjne zbudowane z gęsto usieciowanej aktyny. Lamellipodia kurczą się pod wpływem wstecznego przepływu aktyny. W ich obrębie lub poza nim mogą być formowane filopodia, pełniące funkcje rozpoznawcze.

Komórki mające zdolność przekraczania bariery gęstej macierzy zewnątrzkomórkowej wytwarzają invadopodia albo podobne im struktury, umożliwiające jej czasową penetrację [18]. Ruchliwość tylnej części komórki jest możliwa przede wszystkim dzięki obecności włókien aktynowych sprzężonych z miozyną. Zdolność migracyjna może być również wypadkową oddziaływania ciśnienia hydrostatycznego i korowej aktyny, kiedy formowane są pęcherzyki membranowe (bleby) [12].

Wprawdzie w ostatniej dekadzie nastąpił znaczny postęp w stopniu scharakteryzowania struktur protruzyjnych komórek, niektóre mechanizmy sterujące ich formowaniem pozostają niezidentyfikowane. Dokładne poznanie mechanizmów sterujących ruchem komórki w reakcji na różne bodźce wydaje się podstawowe dla zrozumienia wielu procesów biologicznych oraz chorobotwórczych.

Stow i Condon uważają, że dogłębne poznanie natury, biomechaniki i budowy molekularnej krawędzi wiodącej komórek, szczególnie komórek układu odpornościowego, może mieć ogromne znaczenia dla immunologii, może pomóc zaprojektować nowe szczepionki i leki przeciw patogenom oddziałującym ze strukturami budującymi protruzje, a także wspomóc diagnostykę chorób infekcyjnych [64].

Jak już sygnalizowano, kontrola migracji komórek ma również duże znaczenie w postępowaniu w chorobach sercowo-naczyniowych. Wiadomo, że jednym z elementów patomechanizmu miażdżycy jest zmiana fenotypu komórek mięśni gładkich środkowej warstwy tętnicy z kurczliwego na syntetyzujący, następnie ich migracja do warstwy wewnętrznej, proliferacja, pochłanianie lipidów i przekształcanie się w komórki piankowate, a to powiększa blaszki miażdżycowe. Wzmocniona migracja jest bardzo niekorzystna, a więc zahamowanie jej przez blokowanie powstawania podosomów byłoby pożądane [45].

Podobnie badania nad strukturami protruzyjnymi nowotworów mogą mieć zasadnicze znaczenie dla zrozumienia problemu ich inwazyjności. Mogą pomóc w hamowaniu przerzutowania oraz zwiększyć skuteczność zwalczania różnego rodzaju nowotworów. Dzisiejszy stan wiedzy pozwala na zidentyfikowanie głównych białek regulujących zdolności migracyjne komórki nowotworowej. Dla komórek wykształcających lamellipodia jest to kompleks Arp2/3 i Scar/WAVE, dla tych gdzie występuje przewaga filopodiów fascyna i Mena/VASP.

Dla tych, w których obserwuje się invadopodia będzie to N-WASP, dynamina, Tks5, MT1-MMP. Natomiast głównymi regulatorami powstawania blebsów są aktomiozyna i ezryna, a lobopodiów RhoA, Rac1, Cdc42 i PIP3 (pseudopodia i pofałdowania grzbietowe wydają się nie mieć znaczenia w przerzutowaniu). Nadekspresja lub obniżona ekspresja tych białek jest związana z występowaniem niektórych rodzajów nowotworów (zob. tab. 2). Znane są leki hamujące niektóre z tych białek, problem polega jednak na różnorodności mechanizmów i sposobów poruszania się komórek, które wymykają się spod celowanej w jedno białko kontroli. Poza tym, często terapie działające *in vitro* cechują się małą skutecznością *in vivo*. Przykładem mogą być komórki, w których blokuje się powstawanie lamellipodiów i filopodiów w hodowli komórkowej, zachodzi wtedy skuteczne hamowanie migracji, jednak w organizmie poruszają się one w sposób ameboidalny, co sprzyja rozwojowi choroby [81]. Pewne nadzieje pokłada się w inhibitorach metaloproteinaz, które są głównym czynnikiem pozwalającym na inwazję za pośrednictwem invadosomów, a wyniki badań na myszach bezgranicznych są dość obiecujące [80]. Niemniej jednak oczywistym jest, że dużo pracy należy jeszcze włożyć w poznanie patomechanizmów powstawania przerzutów. Stąd wyraźna potrzeba w analizowaniu zależności, jakie panują między białkami organizującymi cytoszkielecik, szczególnie w modelach badawczych jak najbardziej zbliżonych do organizmu człowieka tak, aby poznać dokładnie mechanizmy pozwalające stworzyć komórce struktury protruzyjne, a następnie, w sposób celowany, zahamować ten proces.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy dr hab. Dorocie Nowak za umożliwienie A. Kuzan wykonania pracy magisterskiej w Zakładzie Patologii Komórki Uniwersytetu Wrocławskiego, z której pochodzą zdjęcia mikroskopowe.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abercrombie M.: The Croonian lecture, 1978 – the crawling movement of metazoan cells. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1980; 207: 129-147
- [2] Adams J.C.: Fascin-1 as a biomarker and prospective therapeutic target in colorectal cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2015; 15: 41-48
- [3] Alexandrova A.Y., Arnold K., Schaub S., Vasiliev J.M., Meister J.J., Bershadsky A.D., Verkhovsky A.B.: Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: Formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One*, 2008; 3: e3234
- [4] Arjonen A., Kaukonen R., Ivaska J.: Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh. Migr.*, 2011; 5: 421-430
- [5] Bard J.B., Hay E.D.: The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movement *in situ* and *in vitro*. *J. Cell Biol.*, 1975; 67: 400-418
- [6] Bear J.E., Gertler F.B.: Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J. Cell Sci.*, 2009; 122: 1947-1953
- [7] Bisi S., Disanza A., Malinverno C., Frittoli E., Palamidessi A., Scita G.: Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2013; 25: 565-573
- [8] Bosgraaf L., Van Haastert P.J.: The ordered extension of pseudopodia by amoeboid cells in the absence of external cues. *PLoS One*, 2009; 4: e5253
- [9] Brown M.J., Hallam J.A., Colucci-Guyon E., Shaw S.: Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J. Immunol.*, 2001; 166: 6640-6646
- [10] Buccione R., Orth J.D., McNiven M.A.: Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004; 5: 647-657
- [11] Campello S., Lacalle R.A., Bettella M., Manes S., Scorrano L., Viola A.: Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 2879-2886
- [12] Charras G., Paluch E.: Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 730-736
- [13] Chen C.L., Wang Y., Sesaki H., Iijima M.: Myosin I links PIP₃ signaling to remodeling of the actin cytoskeleton in chemotaxis. *Sci. Signal.*, 2012; 5: ra10

- [14] Chen L., Yang S., Jakoncic J., Zhang J.J., Huang X.Y.: Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature*, 2010; 464: 1062-1066
- [15] Chen W.T.: Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.*, 1989; 251: 167-185
- [16] de Lucas B., Bernal A., Pérez L.M., San Martín N., Gálvez B.G.: Membrane blebbing is required for mesenchymal precursor migration. *PLoS One*, 2016; 11: e0150004
- [17] Diz-Munoz A., Krieg M., Bergert M., Ibarlucea-Benitez I., Muller D.J., Paluch E., Heisenberg C.P.: Control of directed cell migration *in vivo* by membrane-to-cortex attachment *PLoS Biol.*, 2010; 8: e1000544
- [18] Dupré L., Houmadi R., Tang C., Rey-Barroso J.: T-lymphocyte migration: An action movie starring the actin and associated actors. *Front. Immunol.*, 2015; 6: 586
- [19] Eilken H.M., Adams R.H.: Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 617-625
- [20] Fais S., Malorni W.: Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *J. Leukoc. Biol.*, 2003; 73: 556-563
- [21] Faix J., Breitsprecher D., Stradal T.E., Rottner K.: Filopodia: Complex models for simple rods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 1656-1664
- [22] Gómez-Moutón C., Manes S.: Establishment and maintenance of cell polarity during leukocyte chemotaxis. *Cell Adh. Migr.*, 2007; 1: 69-76
- [23] Hind L.E., Vincent W.J., Huttenlocher A.: Leading from the back: The role of the uropod in neutrophil polarization and migration. *Dev. Cell*, 2016; 38: 161-169
- [24] Hoon J.L., Wong W.K., Koh C.G.: Functions and regulation of circular dorsal ruffles. *Mol. Cell. Biol.*, 2012; 32: 4246-4257
- [25] Hülsmann N., Grębecki A.: Induction of lobopodia and lamellipodia in a filopodial organism (*Vampyrella lateritia*). *Eur. J. Protistol.*, 1995; 31: 182-189
- [26] Iizuka S., Gould C.M., Buschman M.D., Begona D., Abdullah C., Courtneidge S.: Tks adaptor proteins and invadopodia formation in the growth and metastasis of melanoma. *Cancer Res.*, 2014; 74 (Suppl. 19): 3155
- [27] Insall R.H., Machesky L.M.: Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks. *Dev. Cell*, 2009; 17: 310-322
- [28] Ivetic A., Ridley A.J.: Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leukocytes. *Immunology*, 2004; 112: 165-176
- [29] Jiu Y., Lehtimäki J., Tojkander S., Cheng F., Jlääinoja H., Liu X., Varjosalo M., Eriksson J.E., Lappalainen P.: Bidirectional interplay between vimentin intermediate filaments and contractile actin stress fibers. *Cell Rep.*, 2015; 11: 1511-1518
- [30] Johnston S.A., Bramble J.P., Yeung C.L., Mendes P.M., Machesky L.M.: Arp2/3 complex activity in filopodia of spreading cells. *BMC Cell Biol.*, 2008; 9: 65
- [31] Kamimura Y., Xiong Y., Iglesias P.A., Hoeller O., Bolourani P., Devreotes P.N.: PIP₃-independent activation of TorC2 and PKB at the cell's leading edge mediates chemotaxis. *Curr. Biol.*, 2008; 18: 1034-1043
- [32] Kłopocka W., Barańska J.: Rola białek z rodziny Rho w kontroli migracji komórek pełzających. *Postępy Biochem.*, 2005; 51: 36-43
- [33] Konopska B., Gołąb K., Gburek J.: Endocytoza niezależna od klatryny – rola w patomechanizmie chorób i aspekty farmaceutyczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 763-776
- [34] Lambrechts A., Van Troys M., Ampe C.: The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004; 36: 1890-1909
- [35] Lim J.P., Gosavi P., Minter J.D., Ross E.M., Gleeson P.A.: Sorting nexin 5 selectively regulates dorsal-ruffle-mediated macropinocytosis in primary macrophages. *J. Cell Sci.*, 2015; 128: 4407-4419
- [36] Liu Y.J., Le Berre M., Lautenschlaeger F., Maiuri P., Callan-Jones A., Heuzé M., Takaki T., Voituriez R., Piel M.: Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell*, 2015; 160: 659-672
- [37] Lorentzen A., Bamber J., Sadok A., Elson-Schwab I., Marshall C.J.: An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 1256-1267
- [38] Machesky L.M.: Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. *FEBS Lett.*, 2008; 582: 2102-2111
- [39] Machesky L.M., Gould K.L.: The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999; 11: 117-121
- [40] Machesky L.M., Li A.: Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun. Integr. Biol.*, 2010; 3: 263-270
- [41] Manes S., Lacalle R.A., Gómez-Moutón C., del Real G., Mira E., Martínez-A.C.: Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Semin. Immunol.*, 2001; 13: 147-157
- [42] Mannherz H.G., Mach M., Nowak D., Malicka-Błaszczkiewicz M., Mazur A.: Lamellipodial and amoeboid cell locomotion: The role of actin-cycling and bleb formation. *Biophys. Rev. Lett.*, 2007; 2: 5-22
- [43] McFarland W.: Microspikes on the lymphocyte uropod. *Science*, 1969; 163: 818-820
- [44] Meddens M.B., Pandzic E., Slotman J.A., Guillet D., Joosten B., Mennens S., Paardekooper L.M., Houtsmuller A.B., van den Dries K., Wiseman P.W., Cambi A.: Actomyosin-dependent dynamic spatial patterns of cytoskeletal components drive mesoscale podosome organization. *Nat. Commun.*, 2016; 7: 13127
- [45] Murphy D.A., Courtneidge S.A.: The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011; 12: 413-426
- [46] Paluch E.K., Raz E.: The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2013; 25: 582-590
- [47] Payne L.J., Eves R.L., Jia L., Mak A.S.: p53 down regulates PDGF-induced formation of circular dorsal ruffles in rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One*, 2014; 9: e108257
- [48] Petrie R.J., Gavarra N., Chadwick R.S., Yamada K.M.: Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J. Cell Biol.*, 2012; 197: 439-455
- [49] Petrie R.J., Koo H., Yamada K.M.: Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix. *Science*, 2014; 345: 1062-1065
- [50] Petrie R.J., Yamada K.M.: At the leading edge of three-dimensional cell migration. *J. Cell Sci.*, 2012; 125: 5917-5926
- [51] Popow-Woźniak A., Nowak D., Malicka-Błaszczkiewicz M.: Sposoby migracji komórek nowotworowych. *Postępy Biochem.*, 2009; 55: 113-120
- [52] Renkawitz J., Sixt M.: Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *EMBO Rep.*, 2010; 11: 744-750
- [53] Ridley A.J.: Life at the leading edge. *Cell*, 2011; 145: 1012-1022
- [54] Ridley A.J.: Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2015; 36: 103-112
- [55] Ruprecht V., Wieser S., Callan-Jones A., Smutny M., Morita H., Sako K., Barone V., Ritsch-Marte M., Sixt M., Voituriez R., Heisenberg C.P.: Cortical contractility triggers a stochastic switch to fast amoeboid cell motility. *Cell*, 2015; 160: 673-685
- [56] Sánchez-Madrid F., Serrador J.M.: Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009; 10: 353-359
- [57] Seano G., Daubon T., Génot E., Primo L.: Podosomes as novel players in endothelial biology. *Eur. J. Cell Biol.*, 2014; 93: 405-412

- [58] Seano G., Primo L.: Podosomes and invadopodia: tools to breach vascular basement membrane. *Cell Cycle*, 2015; 14: 1370-1374
- [59] Shi C., Huang C.H., Devreotes P.N., Iglesias P.A.: Interaction of motility, directional sensing, and polarity modules recreates the behaviors of chemotaxing cells. *PLoS Comput. Biol.*, 2013; 9: e1003122
- [60] Siddiqui T., Lively S., Ferreira R., Wong R., Schlichter L.C.: Expression and contributions of TRPM7 and KCa2.3/SK3 channels to the increased migration and invasion of microglia in anti-inflammatory activation states. *PLoS One*, 2014; 9: e106087
- [61] Small J.V., Stradal T., Vignat E., Rottner K.: The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.*, 2002; 12: 112-120
- [62] Sroka J., Krecioch I., Zimolag E., Lasota S., Rak M., Kedracka-Krok S., Borowicz P., Gajek M., Madeja Z.: Lamellipodia and membrane blebs drive efficient electrotactic migration of rat Walker carcinoma cells WC 256. *PLoS One*, 2016; 11: e0149133
- [63] Stępień A., Grzanka A., Szpechciński A.: Struktury cytoszkieletu aktynowego formowane przy krawędzi wiodącej komórki podczas pierwszego etapu migracji. *Post. Biol. Kom.*, 2006; 33: 381-392
- [64] Stow J.L., Condon N.D.: The cell surface environment for pathogen recognition and entry. *Clin. Transl. Immunology*, 2016; 5: e71
- [65] Stradal T.E., Scita G.: Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2006; 18: 4-10
- [66] Stuhmann B., Huber F., Käs J.: Robust organizational principles of protrusive biopolymer networks in migrating living cells. *PLoS One*, 2011; 6: e14471
- [67] Suetsugu S., Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T.: Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev. Cell*, 2003; 5: 595-609
- [68] Svitkina T.M.: Ultrastructure of protrusive actin filament arrays. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2013; 25: 574-581
- [69] Svitkina T.M., Borisy G.G.: Progress in protrusion: the tell-tale scar. *Trends Biochem. Sci.*, 1999; 24: 432-436
- [70] Sztacho M., Segeletz S., Sanchez-Fernandez M.A., Czupalla C., Niehage C., Hoflack B.: BAR proteins PSTPIP1/2 regulate podosome dynamics and the resorption activity of osteoclasts. *PLoS One*, 2016; 11: e0164829
- [71] Takenawa T., Suetsugu S.: The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 37-48
- [72] Tarone G., Cirillo D., Giancotti F.G., Comoglio P.M., Marchisio P.C.: Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.*, 1985; 159: 141-157
- [73] Tyson R.A., Zatulovskiy E., Kay R.R., Bretschneider T.: How blebs and pseudopods cooperate during chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 11703-11708
- [74] Valignat M.P., Nègre P., Cadra S., Lellouch A.C., Gallet F., Hénon S., Theodoly O.: Lymphocytes can self-steer passively with wind vane uropods. *Nat. Commun.*, 2014; 5: 5213
- [75] Van Haastert P.J.: Chemotaxis: insights from the extending pseudopod. *J. Cell Sci.*, 2010; 123: 3031-3037
- [76] Van Haastert P.J.: A stochastic model for chemotaxis based on the ordered extension of pseudopods. *Biophys. J.*, 2010; 99: 3345-3354
- [77] Vignjevic D., Montagnac G.: Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin. Cancer Biol.*, 2008; 18: 12-22
- [78] Wang Z., Liang X., Cai M., Du G.: Analysis of invadopodia formation in breast cancer cells. *Methods Mol. Biol.*, 2016; 1406: 203-210
- [79] Watanabe T.M., Tokuo H., Gonda K., Higuchi H., Ikebe M.: Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 19605-19614
- [80] Wiśniewski M.S., Wiśniewski M.: Mechanizmy przerzutowania i molekularne marker progresji nowotworów złośliwych. I. Rak jelita grubego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 453-470
- [81] Wolf K., Friedl P.: Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br. J. Dermatol.*, 2006; 154 (Suppl. 1): 11-15
- [82] Woolley T.E., Gaffney E.A., Goriely A.: Membrane shrinkage and cortex remodelling are predicted to work in harmony to retract blebs. *R. Soc. Open Sci.*, 2015; 2: 150184
- [83] Zeng Y., LeDuc P., Koh C.G., Chiam K.H.: Circular dorsal ruffles increase directional persistence of cell migration by actin diffusion from ruffles to lamellipodia. *Biophys. J.*, 2015; 108 (Suppl. 1): 458a

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.