

Кальдесмон изменяет структуру актина на лидирующем крае и подавляет миграцию клеток

Т. В. Кудряшова¹, П. Н. Руткевич², А. Я. Шевелев², Т. Н. Власик², А. В. Воротников¹

¹Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119192, Ломоносовский пр-т., д.31, корп.5

²Институт Экспериментальной Кардиологии, РКНПК, Москва, 121552, 3-я Черепковская ул, 15а.

Адресат для корреспонденции:

Воротников А.В.
тел./fax (495) 932-99-04
email a.vorotnikov@cardio.ru

Абстракт - Исследован эффект подавления экспрессии актин-связывающего белка кальдесмона на подвижность немышечных клеток. Более чем 5-кратное снижение содержания этого белка в клетках с помощью РНК-интерференции приводило к нарушению образования актиновых стресс-фибрилл и ускорению миграции клеток в зону повреждения монослоя. Стимуляция стационарных клеток сывороткой вызывала более чем 1,5-кратное накопление стресс-фибрилл только в контрольных клетках, но не в клетках, дефицитных по кальдесмону. Аналогично, накопление филаментов актина наблюдалось в активно мигрирующих клетках только дикого типа, но не в клетках с пониженным содержанием кальдесмона. Эти изменения происходили, в основном, на лидирующем крае мигрирующей клетки, где характерная для контрольных клеток четкая структура актиновых филаментов не выявлялась в отсутствие кальдесмона. Мы предполагаем, что кальдесмон тормозит миграцию клеток за счет стабилизации актина в филаментах и снижения динамики мономерного актина на лидирующем крае мигрирующей клетки.

Ключевые слова: кальдесмон, РНК-интерференция, клеточная миграция, актиновые филаменты, лидирующий край клетки

ВВЕДЕНИЕ

Направленная миграция клеток является ключевым событием при эмбриогенезе, хоуминге клеток-предшественников, росте сосудов и нервных волокон, воспалительных реакциях и репарации тканевых повреждений [1]. Направление миграции определяется градиентом хемоаттрактантов (факторов роста, цитокинов и других сигнальных молекул) рецепторы которых локализуются на лидирующем крае клетки, а также наличием свободного пространства, как в случае движения клеток в рану, или царапину, нанесенную в клеточном монослое.

Действие хемоаттрактантов реализуется внутри клетки через сходные механизмы активации клеточной подвижности, которые многообразны и пока до конца не известны. В целом, движение клетки представляет собой циклический процесс образования протрузий на переднем крае, их прикрепление к субстрату, «втекание» в них цитоплазмы, открепление и подтягивание хвостовой части за счет сокращения цитоскелета [2]. В настоящее время считается, что динамика переднего края клетки вносит основной вклад в скорость миграции. Сигнал от связывания хемоаттрактанта с рецептором передается каскадным путем к белкам, регулирующим полимеризацию актина на первичных адгезивных комплексах в ламеллиподии – узкой лидирующей полосе на краю листообразной ламеллы. Рост нитей актина внутри клетки сопровождается проталкиванием мембраны в противоположную сторону и образованием протрузий [3]. Пул мономерного актина восполняется в ламелле за счет деполимеризации свободных концов актиновых нитей под действием кофилина, обеспечивая необходимый «круговорот» актина [4, 5].

Протрузионная активность ламеллиподий зависит от количества фокальных адгезий, числа и доступности мономеров актина, а также скорости сборки-разборки актиновых нитей [6]. Все эти параметры регулируются актин-связывающими белками, активность которых находится под рецепторным контролем. Так, увеличение числа участков полимеризации и образующихся актиновых нитей достигается нуклеирующей активностью формин и ветвящей активностью белков Arp2/3 [7, 8]. Регуляция пула мономерного актина происходит за счет изменения деполимеризующей активности кофилина и блокирующей мономерный актин активности профилина [9].

Отдельную и разнородную группу составляют белки, опосредованно влияющие на полимеризацию, деполимеризацию и стабильность актиновых нитей [10]. Как правило, это кэпирующие или латерально взаимодействующие белки, которые изменяют скорость полимеризации, доступность для кофилина, а также объединяют нити актина в устойчивые к деполимеризации стресс-фибриллы или сети актиновых филаментов. К их числу относится кальдесмон – многофункциональный белок, взаимодействующий с актином, миозином и

тропомиозином, а также являющийся конечной мишенью нескольких рецептор-активируемых каскадов, регулирующих его активность [11]. Помимо того, что кальдесмон стабилизирует полимерный актин и меняет его механические свойства [12], он ингибирует АТФазу актомиозина и, таким образом, может тормозить подтягивание тела клетки в процессе движения.

Ряд данных указывает на то, что кальдесмон участвует в регуляции миграции клеток [13, 14], однако, детальные механизмы его действия остаются неясными. Обнаружено, что кальдесмон влияет на силу адгезии клеток [15], образование подосом [16], организацию кортикального цитоскелета [17] и стабильность актиновых микрофиламентов [18]. Он также регулирует активность других актин-связывающих белков, таких как гельзолин и тропомиозин [19], фасцин [20], Arp2/3 [21], что опосредованно влияет на динамику внутриклеточного актина. Вместе с тем, роль кальдесмона в регуляции скорости миграции к настоящему времени прямо не показана.

Внутриклеточная активность кальдесмона определяется его связыванием с актином, которое регулируется фосфорилированием [22, 23]. Мы и другие ранее обнаружили, что ускорение хемотаксиса требует активации MAP-киназ и фосфорилирования кальдесмона [24, 17], что подавляет его связывание с цитоскелетом [25]. Фосфорилирование также регулирует активность кальдесмона в подосомах [26], кортикальном цитоскелете [27] и стресс-фибриллах [14].

Поскольку эффекты фосфорилирования кальдесмона направлены на подавление его основной активности, мы предположили, что они могут быть функционально аналогичны уменьшению его количества в клетке. В связи с этим, в настоящей работе мы исследовали как снижение экспрессии кальдесмона в клетках влияет на их подвижность и состояние актинового цитоскелета в лидирующем крае мигрирующих клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подавление экспрессии кальдесмона в клетках HeLa 1469 методом РНК-интерференции

Линейные эпителиальные клетки человека HeLa 1469 культивировали при 37° С и 5% CO₂ в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Hyclone, США), 2 mM глутамин, 100 ед/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин.

Для получения популяций клеток HeLa 1469, со стабильно сниженной экспрессией кальдесмона, клетки трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими молекулярно-генетическую конструкцию pSIN-CopGFP-N1shRNA (SBI, California), кодирующую последовательность интерферирующей РНК (иРНК) к участку в последовательности гена кальдесмона (или гена люциферазы в случае контрольной конструкции) и последовательность гена зеленого флуоресцентного белка (GFP) под регуляцией единого промотора. Появление флуоресценции GFP в клетке после трансдукции свидетельствовало об экспрессии в данной клетке соответствующей иРНК. Эффективность трансдукции клеток оценивали цитофлуориметрическим методом по флуоресценции GFP.

Уровень экспрессии кальдесмона в исходных клетках, через 72 часа после их трансдукции и при каждом последующем пассировании определяли иммуноблоттингом с использованием специфических антител к кальдесмону, детектирующих все изоформы этого белка, с последующей количественной денситометрией. Все эксперименты были проведены независимо для двух популяций клеток HeLa 1469 дефицитных по кальдесмону, полученных в результате двух независимых трансдукций. Данные, полученные в параллельных экспериментах, носили сходный характер.

Электрофорез и иммуноблоттинг

Клетки выращивали до монослоя, затем удаляли среду, промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 5.2 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 150 mM NaCl и лизировали в 2-кратном буфере нанесения образцов для электрофореза по Лэммли [28] и кипятили в течение 5 минут. Концентрацию белка в образцах измеряли методом Шаффнера и Вайсмана с амидовым черным [29]. Белки разделяли электрофоретически в пластинах 10-12% полиакриламидного геля при 160 V в присутствии 0.1% лаурил сульфата натрия (Sigma, США) по методу Лэммли [28]. Эквивалентность нанесения количества образцов нормировали по содержанию глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД). После электрофореза проводили иммуноблоттинг по методу [30], используя PVDF мембраны с размером пор 0.45 мкм (Immobilon, США) для электропереноса. Для последующей детекции кальдесмона и ГАФД,

электроперенос осуществляли в буфере 0.025 М трис, 0.192 М глицин, рН 8.3, 20% этанол, 0.02% лаурил сульфат натрия, рН 8.3 в течение часа при силе тока 350 мА.

В работе использовали первичные поликлональные антитела кролика к кальдесмону, полученные и охарактеризованные ранее [31]. Первичные антитела мыши к ГАФД были любезно предоставлены Серебряной Д.В. (лаборатория иммунохимии биологического факультета МГУ). В работе использовали вторичные антитела против IgG мыши и IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, а также набор реагентов для проявления иммуноблотов методом усиленной хемилюминисценции фирмы Amersham (США). Количественный анализ осуществляли после компьютерного сканирования изображений с помощью программы Scion Image версии ImageJ (Scion Inc., США).

Стимуляция клеток и иммуоцитохимическое окрашивание актина

Контрольные клетки линии HeLa 1469 и клетки со сниженной экспрессией кальдесмона выращивали до 40-50% конфлюентного монослоя на покровных стеклах, депривировали в среде с 0.1% ЭТС в течение 4 часов, после чего в течение 30 минут инкубировали в среде с 30% ЭТС. Клетки промывали 1 раз фосфатно-солевым буфером (37°C) и фиксировали в течение 15 минут раствором 3.7% параформальдегида, 0.2% глютарового альдегида, 0.1% тритона X-100 в буфере для фиксации цитоскелетных белков (ЦБС), содержащим 10 мМ MES, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭГТА, 5 мМ сахарозу, 5 мМ MgCl₂, рН 6.1. Затем клетки промывали 2 раза буфером ЦБС и инкубировали 5 минут в растворе 0.5 мг/мл NaBH₄ на буфере ЦБС без сахарозы. Затем клетки снова промывали ФСБ и окрашивали TRITC-меченным фаллоидином на актин, по протоколу производителя (P1951, Sigma, США). Флуоресцентный сигнал TRITC-фаллоидина регистрировали с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200M, оснащенного CCD камерой AxioCam. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения Axiovision версии 3.1 и Adobe Photoshop версии 6.0.

Количественная обработка изображений и статистический анализ

Количество филаментарного актина в клетках до и после стимуляции сывороткой, а также в клетках активно мигрировавших в зону царапины оценивали с помощью программы MetaMorph Offline версии 7.1.7.0. Выделяли границы анализируемой клетки и в ее пределах оценивали среднее минимальное значение интенсивности окрашивания актина, которое принимали за базовое значение. Подсчитывали площадь, которую в клетке занимали актиновые стресс фибриллы - филаменты актина, интенсивность окрашивания которых в два раза превышала базовое значение. Количество актиновых стресс фибрилл в клетках

оценивали как отношение площади занимаемой стресс фибриллами к общей площади клетки. Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Excel версии 5.0.

Метод зарастания царапины

На пластиковые чашки Петри (или на покровные стекла в зависимости от эксперимента) высевали одинаковое количество контрольных или дефицитных по кальдесмону клеток линии HeLa 1469, таким образом, чтобы через 24 часа клеточная культура достигала состояния 95% конфлюэнтного монослоя. Царапину в клеточном монослое наносили стерильным наконечником пипетки толщиной 0.5 мм и проводили замену среды культивирования. За миграцией клеток в зону царапины на пластиковых чашках следили, фотографируя одни и те же участки царапины через каждые 15-30 минут в течение 12 часов после повреждения клеточного слоя, используя микроскоп Zeiss Axiovert 200M, оснащенный боксом, в котором поддерживаются основные условия инкубации клеток (37°C и 5% CO₂), и CCD камерой AxioCam. Степень зарастания царапины клетками вычисляли как отношение площади царапины через 12 часов после повреждения, к площади царапины сразу после повреждения.

В случае зарастания зоны царапины на покровных стеклах, клетки оставляли на 4 часа в инкубаторе после повреждения монослоя, затем фиксировали и окрашивали иммуноцитохимически на актин как описано выше. Количество филаментов актина анализировали в клетках, которые располагались непосредственно на краю царапины и первыми заполняли зону повреждения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подавление экспрессии кальдесмона в клетках линии HeLa 1469

Клетки линии HeLa 1469 экспрессируют преимущественно низкомолекулярную изоформу немышечного кальдесмона. С помощью лентивирусной трансдукции этих клеток мы получили популяцию, в которой 99% клеток стабильно экспрессировали иРНК к кальдесмону и репортерный белок GFP, наличие которого детектировали с помощью проточной цитофлуориметрии. В этих клетках содержание эндогенного кальдесмона было существенно снижено по сравнению с нестрандуцированными клетками и с клетками, экспрессирующими контрольную иРНК (рис. 1). Снижение экспрессии кальдесмона на 95% от исходного уровня, происходившее уже через 72 часа после трансдукции, оставалось на низком уровне в течение всего времени проведения экспериментов с этой популяцией клеток (3 недели). Компенсаторного повышения уровня экспрессии высокомолекулярной гладкомышечной изоформы кальдесмона мы не обнаружили.

Кальдесмон участвует в формировании стресс-фибрилл при стимуляции клеток

Мы обнаружили, что снижение внутриклеточного содержания кальдесмона не приводит к заметным изменениям в структуре и локализации актиновых филаментов в покоящихся клетках HeLa 1469. Площадь, занимаемая стресс-фибриллами в контрольных и дефицитных по кальдесмону клеток не различалась и составляла 18% от общей площади клетки (рис. 2, А). Чтобы выяснить, участвует ли кальдесмон в перестройках актинового цитоскелета при воздействии хемоаттрактантов, мы стимулировали контрольные и дефицитные по кальдесмону клетки сывороткой. В контрольных клетках сыворотка вызывала заметное накопление стресс-фибрилл с их тенденцией к периферическому и кольцевому, но не краевому, расположению (рис. 2, Б). Общее количество фибрилл возрастало с 18 до 29% занимаемой площади клетки (рис. 2, А). Однако в клетках со сниженным уровнем экспрессии кальдесмона такой перестройки не происходило (рис. 2, Б) и площадь, занимаемая фибриллярным актином, не изменялась (рис. 2, А). Таким образом, наличие кальдесмона в клетках обеспечивает формирование актиновых стресс-фибрилл при стимуляции клеток.

Кальдесмон ингибирует миграцию клеток

Методом зарастания «царапины» мы исследовали как кальдесмон влияет на скорость направленной миграции клеток в свободное пространство. Оказалось, что клетки с подавленной экспрессией кальдесмона эффективнее заполняют зону повреждения

монослоя (рис. 3, правая нижняя панель), чем контрольные клетки (рис. 3, левая нижняя панель). Анализ 24 полей зрения в двух независимых экспериментах показал, что подавление экспрессии кальдесмона приводит к ускорению скорости миграции клеток в рану более чем на 25 %. Чтобы исключить возможность того, что это происходит за счет ускоренной пролиферации кальдесмон-дефицитных клеток, эффект которой мог быть замечен в течение 12 часов эксперимента, мы также проанализировали скорость роста клеток обеих популяций и не выявили значимых отличий (данные не представлены).

Кальдесмон структурирует актин на лидирующем крае мигрирующих клеток

Поскольку в неполяризованных клетках кальдесмон структурирует цитоскелет равномерно во всей клетке, мы исследовали его влияние на актин в поляризованных клетках, активно мигрирующих в зону повреждения монослоя. В зоне протрузионной активности контрольных клеток были выявлены короткие пучки актиновых филаментов, располагавшиеся перпендикулярно мембране (рис. 4, А). В клетках, дефицитных по кальдесмону, таких структур практически не наблюдалось и актин располагался хаотично в узкой примембранной зоне переднего края (рис. 4, Б). Эти различия наблюдались только для поляризованных клеток наружного слоя, но не клеток внутренних слоев, которые не имели свободного пространства для направленной миграции. Кроме того, общее количество полимерного актина было снижено в наружных клетках, дефицитных по кальдесмону в сравнении с контрольными. Площадь, занимаемая фибриллярным актином в них составляла 13 % от всей площади клетки против 19 % в контрольных клетках. Таким образом, в отличие от неполяризованных клеток, кальдесмон структурирует актин преимущественно на лидирующем крае направленно мигрирующих поляризованных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы показали, что кальдесмон функционирует в клетке как организатор актина, способствуя его сборке в крупные фибриллярные структуры, имеющие различную локализацию в зависимости от поляризации клетки. Важно, что этот эффект проявляется только при стимуляции клеток и не наблюдается в покоящихся клетках. Дефицитные по кальдесмону клетки мигрировали в просвет монослоя быстрее, чем клетки, содержащие этот белок, и мы предполагаем, что это связано с изменением динамики актина на лидирующем крае направленно мигрирующих клеток.

В предыдущих исследованиях других авторов были предприняты попытки выяснить механизм действия кальдесмона в клетках с помощью сверхэкспрессии или временного подавления экспрессии этого белка, однако, прямых экспериментов по влиянию кальдесмона на скорость миграции клеток не проводилось. В сумме, эти данные указывают на то, что кальдесмон регулирует сборку крупных актиновых структур, выполняющих в клетке механические функции, связанные с двигательной и сократительной активностью. В эндотелии кальдесмон важен для сборки кольца стресс-фибрилл, сократимость которого регулирует проницаемость эндотелия [17]. В гладкомышечных клетках кальдесмон участвует в формировании плотного актинового ядра подосом – специальных структур, обеспечивающих инвазию клеток [16, 26, 32]. В трабекулярных клетках глаза, ответственных за удаление слезной жидкости, кальдесмон функционирует в реорганизации и перераспределении актиновых филаментов [33]. В полном согласии с этими данными, полученные нами результаты также указывают на то, что кальдесмон структурирует фибриллярный актин, и подавляет направленную миграцию клеток (рис. 2).

Хотя молекулярный механизм действия кальдесмона на актин внутри клетки остается по-прежнему неясным, можно предположить, что он включает ускорение полимеризации и пучкование актиновых филаментов [13], нарушение нуклеации новых филаментов и ветвления полимеров [21], защиту от фрагментации под действием, например, гельзолина [19]. Суммарным результатом всех этих воздействий должно быть удлинение актиновых филаментов и увеличение плотности их боковых агрегатов, приводящие к уменьшению пула мономерного актина и коротких одиночных нитей. Обратный процесс наблюдается при снижении внутриклеточного содержания кальдесмона (рис. 2, Б и рис. 4).

Механизм сопряжения структурных изменений актинового цитоскелета с двигательной активностью клеток также остается неясным. Временное повышение уровня кальдесмона в фибробластах путем трансфекции его кДНК вело к подавлению сократимости стресс-фибрилл и ослаблению клеточной адгезии [15]. Это хорошо согласуется с ингибиторной

активностью кальдесмона по отношению к актомиозиновой АТФазе и обратной зависимостью между натяжением стресс-фибрилл и прочностью адгезивных контактов [34]. С другой стороны, ослабление адгезивных контактов ведет к повышению клеточной подвижности [2], и тогда снижение внутриклеточного содержания кальдесмона должно приводить к усилению силы адгезии и снижению скорости миграции. Поскольку скорость миграции не была измерена для клеток с повышенной экспрессией кальдесмона [15], в данный момент трудно судить о механизме ее изменения под действием кальдесмона. Обнаруженное нами ускорение миграции при снижении количества кальдесмона в клетках не согласуется с предложенным механизмом, а полученные нами данные об одинаковой скорости адгезии кальдесмон-дефицитных и контрольных клеток (Кудряшова Т.В., личные результаты) свидетельствуют против влияния кальдесмона на скорость миграции путем регуляции силы адгезивных контактов.

Наши результаты предполагают иной механизм сопряжения цитоскелетных эффектов кальдесмона с изменением скорости миграции. Тот факт, что кальдесмон увеличивает количество полимерного актина означает уменьшение пула мономерного актина в клетке. Мы предполагаем, что это снижает «круговорот» актина в ламеллиподии и протрузионную силу на лидирующем крае. Примечательно, что такое накопление фибриллярного актина происходит именно в ламеллиподиях активно мигрирующих поляризованных клеток и нарушается при снижении содержания кальдесмона (рис. 4). Напротив, в неполяризованных клетках действие кальдесмона связано с равномерным усилением цитоскелета (рис. 2), что косвенно указывает на перераспределение кальдесмона под действием хемоаттрактанта в условиях направленной миграции. Это согласуется с многочисленными данными о том, что внутриклеточная активность кальдесмона находится под рецепторным контролем и регулируется фосфорилированием. Динамика фосфорилирования кальдесмона в клетках коррелирует с изменениями их двигательной активности [27, 35] и, таким образом, фосфорилирование может являться механизмом передачи сигнала от активации рецептора хемоаттрактантом к внутриклеточной машинерии через кальдесмон.

Благодарности

Мы крайне благодарны сотрудникам НИИ Теоретической и Экспериментальной Биофизики Пущинского Государственного Университета З.А. Подлубной и И.М. Вихлянцеву за поддержку и внимание, а также студентам факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова Гмызиной А.И. и Бунцевой О.А. за помощь в проведении отдельных экспериментов. Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 05-04-49347-а.

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рис. 1. Эффективность подавления экспрессии кальдесмона в клетках линии HeLa 1469 с помощью РНК-интерференции.

Представлены результаты иммуноблоттинга одинаковых по общему белку количеств лизатов нетрансдуцированных клеток эпителия человека линии HeLa 1469 (полоса 1), контрольных клеток, экспрессирующих иРНК к люциферазе (полоса 2), а также клеток, экспрессирующих иРНК к кальдесмону (полоса 3) через 72 часа после трансдукции. *Верхняя панель* демонстрирует окраску мембран антителами к кальдесмону, а *нижняя панель* – окраску тех же мембран антителами к ГАФД для контроля эквивалентности нанесения образцов.

Рис. 2. Влияние кальдесмона на формирование актиновых стресс фибрилл в клетках линии HeLa 1469 при стимуляции сывороткой.

Контрольные и дефицитные по кальдесмону клетки анализировали на содержание полимерного актина до и после стимуляции сывороткой с помощью флуоресцентно меченного фаллоидина как описано в «Методах исследования». Представлены средние значения ($n=30$) \pm стандартное отклонение (А) и репрезентативные фотографии окрашенных клеток (Б).

Рис. 3. Влияние кальдесмона на скорость направленной миграции клеток в зону повреждения монослоя.

Представлены фазово-контрастные изображения (10-кратное увеличение) монослоя контрольных (А и Б) и дефицитных по кальдесмону (В и Г) клеток сразу после и через 12 часов после повреждения целостности монослоя, соответственно.

Рис. 4. Изменения в структуре актинового цитоскелета переднего края мигрирующих клеток после подавлении экспрессии кальдесмона.

Представлена окраска полимерного актина TRITC-фаллоидином в контрольных (А) и дефицитных по кальдесмону (Б) клетках, мигрирующих слева направо в пространство царапины. Стрелками обозначены упорядоченные пучки коротких актиновых филаментов, расположенных перпендикулярно мембране на переднем крае контрольных клеток и хаотично расположенные конгломераты филаментов актина на переднем крае клеток, дефицитных по кальдесмону.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T. and Horwitz A.R.*, *Science*, 2003. V. 302. № 5651. P. 1704.
2. *Lauffenburger D.A. and Horwitz A.F.*, *Cell*, 1996. V. 84. № 3. P. 359.
3. *Theriot J.A. and Mitchison T.J.*, *Nature*, 1991. V. 352. № 6331. P. 126.
4. *Cramer L.P., Mitchison T.J. and Theriot J.A.*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1994. V. 6. № 1. P. 82.
5. *Small J.V. and Resch G.P.*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2005. V. 17. № 5. P. 517.
6. *Mitchison T.J. and Cramer L.P.*, *Cell*, 1996. V. 84. № 3. P. 371.
7. *Machesky L.M. and Gould K.L.*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1999. V. 11. № 1. P. 117.
8. *Bershadsky A.*, *Trends Cell. Biol.*, 2004. V. 14. № 11. P. 589.
9. *Pollard T.D. and Borisy G.G.*, *Cell*, 2003. V. 112. № 4. P. 453.
10. *Winder S.J. and Ayscough K.R.*, *J. Cell. Sci.*, 2005. V. 118. № 4. P. 651.
11. *Воротников А.В., Крымский М.А., Ширинский В.П.*, *Биохимия*, 2002. Т. 67. С. 1587-1610.
12. *Greenberg M.J., Wang C.L., Lehman W. and Moore J.R.*, *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 2008. V. 65. № 2. P. 156.
13. *Dabrowska R., Kulikova N. and Gagola M.*, *Protoplasma*, 2004. V. 224. № 1-2. P. 1.
14. *Kordowska J., Huang R. and Wang C.L.*, *J. Biomed. Sci.*, 2006. V. 13. № 2. P. 159.
15. *Helfman D.M., Levy E.T., Berthier C., Shtutman M., Riveline D., Grosheva I., Lachish-Zalait A., Elbaum M. and Bershadsky A.D.*, *Mol. Biol. Cell*, 1999. V. 10. № 10. P. 3097.
16. *Eves R., Webb B.A., Zhou S. and Mak A.S.*, *J. Cell. Sci.*, 2006. V. 119. № 9. P. 1691.
17. *Mirzapoiazova T., Kolosova I.A., Romer L., Garcia J.G. and Verin A.D.*, *J. Cell. Physiol.*, 2005. V. 203. № 3. P. 520.
18. *Warren K.S., Shutt D.C., McDermott J.P., Lin J.L., Soll D.R. and Lin J.J.*, *Cell. Motil. Cytoskeleton.*, 1996. V. 34. № 3. P. 215.
19. *Ishikawa R., Yamashiro S. and Matsumura F.*, *J. Biol. Chem.*, 1989. V. 264. № 13. P. 7490.
20. *Ishikawa R., Yamashiro S., Kohama K. and Matsumura F.*, *J. Biol. Chem.*, 1998. V. 273. № 41. P. 26991.
21. *Yamakita Y., Oosawa F., Yamashiro S. and Matsumura F.*, *J. Biol. Chem.*, 2003. V. 278. № 20. P. 17937.
22. *Patchell V.B., Vorotnikov A.V., Gao Y., Low D.G., Evans J.S., Fattoum A., El-Mezgueldi M., Marston S.B. and Levine B.A.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2002. V. 1596. № 1. P. 121.
23. *Huang R., Li L., Guo H. and Wang C.L.*, *Biochemistry*, 2003. V. 42. № 9. P. 2513.
24. *Goncharova E.A., Shirinsky V.P., Shevelev A.Y., Marston S.B. and Vorotnikov A.V.*, *FEBS Lett.*, 2001. V. 497. № 2-3. P. 113.

25. *Goncharova E.A., Vorotnikov A.V., Gracheva E.O., Wang C.L., Panettieri R.A., Jr., Stepanova V.V. and Tkachuk V.A.*, Biol. Chem., 2002. V. 383. № 1. P. 115.
26. *Gu Z., Kordowska J., Williams G.L., Wang C.L. and Hai C.M.*, Exp. Cell. Res., 2007. V. 313. № 5. P. 849.
27. *Eppinga R.D., Li Y., Lin J.L., Mak A.S. and Lin J.J.*, Cell. Motil. Cytoskeleton, 2006. V. 63. № 9. P. 543.
28. *Laemmli U.K.*, Nature, 1970. V. 227. № 5259. P. 680.
29. *Schaffner W. and Weissmann C.*, Anal. Biochem., 1973. V. 56. № 2. P. 502.
30. *Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1979. V. 76. № 9. P. 4350.
31. *Birukov K.G., Shirinsky V.P., Vorotnikov A.V. and Gusev N.B.*, FEBS Lett, 1990. V. 262. № 2. P. 263.
32. *Morita T., Mayanagi T., Yoshio T. and Sobue K.*, J. Biol. Chem., 2007. V. 282. № 11. P. 8454.
33. *Gabelt B.T., Hu Y., Vittitow J.L., Rasmussen C.R., Grosheva I., Bershadsky A.D., Geiger B., Borrás T. and Kaufman P.L.*, Exp. Eye Res., 2006. V. 82. N 6. P. 935.
34. *Bershadsky A.D., Balaban N.Q. and Geiger B.*, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2003. V. 19. P. 677.
35. *Kordowska J., Hetrick T., Adam L.P. and Albert Wang C.L.*, Exp. Cell Res., 2006. V. 312. № 2. P. 95.