

ФОРМИРОВАНИЕ КЭПИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА НА МЕДЛЕННО РАСТУЩЕМ КОНЦЕ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ

©2008 г.

А. С. КОСТЮКОВА

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область;
RWJMS – UMDNJ, Piscataway, NJ*

I. Введение. II. Изоформы тропомодулина. III. Структура тропомодулина. IV. Локализация участков связывания с тропомиозином, актином и небулином. V. Изоформная специфичность связывания тропомодулина и тропомиозина. VI. Модель медленно растущего конца. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Способность актина полимеризоваться и деполимеризоваться играет важную роль во многих биологических функциях, таких как мышечное сокращение, миграция клеток, организация цитоскелета и транспорт органелл [1–4]. Актиновые филаменты существенно различаются по длине в зависимости от типа тканей и локализации в клетках. Например, актиновые филаменты в саркомерах имеют длину $1,1 \pm 0,025$ микрометра, а в спектриновой сети под мембраной эритроцитов – 33 ± 5 нанометров [5, 6]. Существует около 160 различных актин-связывающих белков, в функции которых входит кэпирование, стабилизация, связывание и разборка филаментов [7]. Актиновые филаменты полярны, их концы, медленно растущий (острый) и быстро растущий (тупой), отличаются по структуре и динамике полимеризации/деполимеризации. Белки, кэпирующие быстро растущий конец – это гельзолин, CapZ, аддуцин [7–9], медленно растущий конец – тропомодулин [10, 11], акументин [12] и белковый комплекс Arp2/3 [13]. Акументин был обнаружен в макрофагах; белок этот мало изучен, и последовательность его до сих пор не известна. Arp2/3 играет важную роль при сборке и разборке актиновых филаментов

Адрес для корреспонденции: allakos@gmail.com

на переднем крае мигрирующих клеток. Его сродство к актиновым филаментам существенно уменьшается, когда АТФ, связанный с мономерами актина на остром конце, гидролизуется до АДФ [14]. Тропомодулин обнаружен в различных тканях и клетках, его роль особенно важна в тех случаях, когда актиновая нить должна сохранять постоянную длину [15]. Данный обзор посвящен регуляции кэпирования острых концов с помощью тропомодулина.

Исходно тропомодулин был обнаружен в мембранах эритроцитов как тропомиозин-связывающий белок с молекулярной массой около 40 кДа [16]. Тропомодулин специфически связывается с медленно растущими концами актиновых филаментов и ингибирует полимеризацию и деполимеризацию актина [10, 17]. Сродство тропомодулина к актиновым филаментам невысоко в отсутствие тропомиозина ($K_d \sim 0.3\text{--}0.4 \mu\text{M}$), но существенно повышается в его присутствии ($K_d \sim 50 \text{pM}$) [3]. Несмотря на то что в экспериментах *in vitro* тропомодулин прочно связывается с актотропомиозиновыми филаментами, *in vivo* кэпирование – это кратковременный и динамичный процесс. Как показали в своей работе Littlefield и соавторы, молекулы актина и тропомодулина на остром конце могут обмениваться со свободными молекулами [18]. Авторы продемонстрировали, что, несмотря на присутствие кэпирующих белков, инъецированный в миоциты родамин-актин способен включаться в миофибриллы на обоих концах актиновых филаментов. Около 60 % родамин-актина включается на острых концах, которые, таким образом, оказываются более динамичными, чем тупые концы. Было показано, что в каждый момент времени часть острых концов не кэпирована. Авторы предположили, что эндогенного тропомодулина не хватает, чтобы кэпировать все филаменты и предложили модель динамического кэпирования, согласно которой тропомодулин связан с острым концом кратковременно, что позволяет происходить случайной деполимеризации – полимеризации, приводящей к обмену актина. Было показано, что избыточная экспрессия тропомодулина препятствует инкорпорации родамин-актина и приводит к укорачиванию нитей. Это объяснили тем, что избыток тропомодулина не препятствует деполимеризации, но препятствует полимеризации, поскольку избыточный тропомодулин конкурирует с мономерным актином за связывание. Авторы заключили, что длина актиновых филаментов в саркомерах миоцитов определяется координацией различных актин-связывающих белков, которые регулируют динамику острых концов. Тропомодулин и тропомиозин – два важных белка в процессе этой регуляции.

Тропомиозин – это удлиненный двухцепочечный α -спиральный белок, формирующий coiled coil [19]. При формировании комплекса с актиновыми филаментами молекулы тропомиозина связываются вдоль обеих сторон филамента, при этом N-конец каждой молекулы взаимодействует с C-концом следующей. N-конец тропомиозина направлен в сторону острого конца актинового филамента. Изоформы тропомиозина кодируются четырьмя генами α , β , γ и δ . В результате альтернативного сплайсинга, по крайней мере, в двух из 4-х генов синтезируются высокомолекулярные (284 остатка) и низкомолекулярные (246 остатков) изоформы тропомиозина. Распределение этих изоформ зависит от типа тканей и клеток и может меняться в процессе развития. Так, например, в поперечно-полосатых мышцах высокомолекулярные α - и β -тропомиозины взаимодействуют с актиновыми нитями аппарата сокращения в саркомерах, в то время как низкомолекулярный γ -тропомиозин, TM5NM1, обнаружен в цитоскелете, прилегающем к Z-линии [20].

II. ИЗОФОРМЫ ТРОПОМОДУЛИНА

Когда последовательность тропомодулина была определена, не было обнаружено никакой гомологии с известными белками, поэтому эти белки были выделены в отдельную группу [21]. В настоящее время известны четыре изоформы тропомодулина [22–24]. Tmod1, ранее называемый E(erythrocyte)-Tmod, детектирован во многих тканях, но, в основном, находится в эритроцитах, в сердечных и скелетных мышцах. Tmod4, Sk(skeletal)-Tmod, обнаружен в скелетных мышцах и замещает Tmod1 в процессе их развития. Tmod2, N(neuron)-Tmod, обнаружен в клетках мозга. Tmod3, U(ubiquitous)-Tmod, находят во всех тканях. Процент гомологии среди этих изоформ достигает 70%.

На основании гомологии с тропомодулинами были также клонированы лейомодины, белки с большей молекулярной массой, около 64 кДа [24, 25]. Существует три изоформы лейомодинов: Lmod1, найденный во многих тканях, но в основном в гладких мышцах; Lmod2, обнаруженный в сердечной и скелетных мышцах, и Lmod3. Роль этих белков пока неизвестна. Они способны связываться с тропомиозином [25, 26]. Предполагается, что Lmod2 может действовать как фактор нуклеации актиновых филаментов [27].

В мышцах тропомодулин был локализован на медленно растущих концах тонких филаментов [28]. Избыточная экспрессия тропомодулина в сердечных миоцитах приводит к дегенерации миофибрилл [18, 29], а уменьшение его экспрессии приводит к формированию необычно

длинных актиновых филаментов [30]. Функция тропомодулина критична на поздних стадиях миофибриллогенеза [31]. У мышей с «отключенным» геном тропомодулина прекращение развития миокарда приводит к летальности на эмбриональном этапе [32, 33].

В отличие от Tmod1 и Tmod4, которые связываются только с полимерным актином, Tmod3 способен связывать также и мономерный актин [34, 35]. Предположительно Tmod2 тоже способен связывать мономерный актин. Избыточная экспрессия Tmod3 приводит к пониженной подвижности эндотелиальных клеток [36]. Экспрессия Tmod2 меняется при патологических условиях, таких, например, как эпилепсия или церебральная ишемия [37–39].

III. СТРУКТУРА ТРОПОМОДУЛИНА

Из всех изоформ тропомодулина лучше всего изучен Tmod1, его структура, функции и взаимодействие с другими белками. В последующем тексте этого обзора тропомодулином будет называться Tmod1. Тропомодулин представляет собой удлиненную молекулу, его С-концевая половина состоит из одного компактного, кооперативно плавящегося домена [40–42]. Кристаллическая структура этого домена представлена чередующимися α -спиралями и β -структурами [43] (рис. 1А). Такая структура характерна для LRR (leucine rich repeat) мотива, обычно принимающего участие в белок-белковых взаимодействиях [44–47]. N-концевая половина, напротив, почти не структурирована [40–42, 48, 49]. Остатки 24–35 формируют α -спираль, но остальная часть этого фрагмента не имеет регулярной структуры (рис. 1Б).

IV. ЛОКАЛИЗАЦИЯ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ С ТРОПОМИОЗИНОМ, АКТИНОМ И НЕБУЛИНОМ

Несмотря на тот факт, что N-концевая половина тропомодулина не имеет регулярной структуры, добавление N-концевого фрагмента (остатки 1–91) к тропомиозину значительно изменяет кривые плавления, как было показано методами кругового дихроизма и дифференциальной сканирующей калориметрии [42]. Аналогичные результаты были получены методом кругового дихроизма для более длинного фрагмента тропомодулина (остатки 1–130), смешанного с N-концевым фрагментом тропомиозина [50]. В результате формирования комплекса наблюдалось существенное увеличение содержания α -спи-

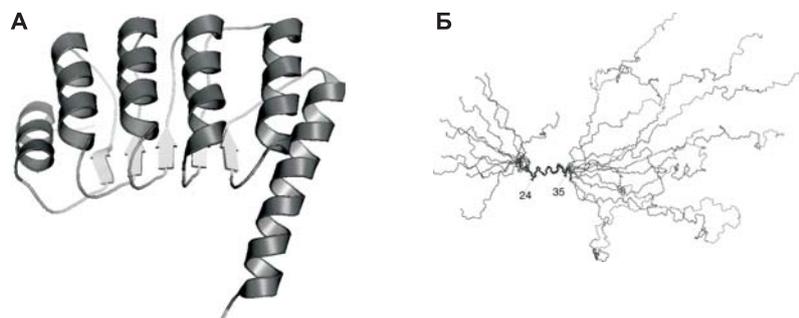


Рис. 1. А. Ленточная диаграмма атомной модели С-концевой половины тропомодулина. Б. Выравнивание десяти структур N-концевого фрагмента тропомодулина (остатки 1–92), полученных в растворе методом ядерного магнитного резонанса.

ралей, а также температуры плавления комплекса по сравнению с температурой плавления фрагмента тропомиозина.

Предполагалось, что в молекуле тропомодулина существуют различные участки для связывания низко- и высокомолекулярных тропомиозинов: остатки 6–94 тропомодулина взаимодействуют с высокомолекулярным скелетным тропомиозином, а остатки 90–184 с эритроцитарным тропомиозином (гомодимеры или гетеродимеры низкомолекулярных α - и γ -тропомиозинов [21, 51–53]). Однако некоторые данные противоречили этому предположению. Так, например, кэпирующая активность фрагмента тропомодулина (остатки 95–359) в присутствии высокомолекулярного тропомиозина увеличивалась в 160 раз, что указывает на наличие второго участка связывания для этого тропомиозина [54]. Кроме того, фрагмент тропомодулина 1–92 способен связываться не только с высокомолекулярным мышечным α -тропомиозином, но и с низкомолекулярным немuscularным α -тропомиозином [55]. В недавних исследованиях [56] было показано, что остатки 105–127 важны для участка связывания с низкомолекулярным γ -тропомиозином, в другой работе [57] утверждалось, что остатки Leu134 и Leu135 являются ключевыми для этого связывания. Ни в одном из этих исследований не было показано связывание низкомолекулярных тропомиозинов с первым участком связывания или высокомолекулярных тропомиозинов со вторым участком связывания. Вопрос о числе участков связывания и их специфичности оставался неразрешенным.

Этот вопрос удалось разрешить при помощи мутагенеза и анализа взаимодействия тропомиозина и тропомодулина с использованием

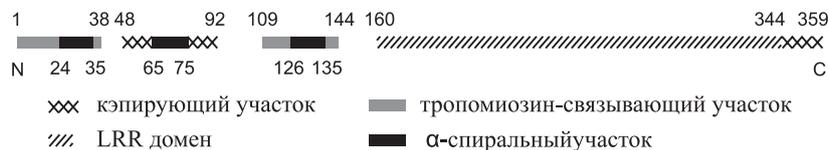


Рис. 2. Схематическое расположение участков связывания тропомиозина и кэпирования актина в молекуле тропомодулина.

модельных пептидов. В дополнение к спирали 24–35, определенной ЯМР, в N-концевой половине тропомодулина есть несколько предсказанных спиральных участков (остатки 65–75 и 126–135) [48]. Одна сторона каждой из этих спиралей образует гидрофобную поверхность. Замена консервативных гидрофобных остатков в этих спиральных участках разрушает формирование гидрофобных поверхностей, что, как оказалось, является решающим для формирования участков связывания [48, 49, 58]. Замены Leu27 на глутамат и Ile131 на аспартат приводят к тому, что как высоко- так и низкомолекулярные тропомиозины перестают связываться в первом и во втором участках связывания. А замена Leu71 на аспартат существенно снижает кэпирующую активность тропомодулина. Все вместе эти три мутации вызывают 30-кратное снижение кэпирующей активности тропомодулина.

На рис. 2 показано положение участков связывания тропомиозина и кэпирования актина в молекуле тропомодулина [48, 49, 54, 55, 58]. Два участка связывания, остатки 1–38 и 109–144, были локализованы как для высоко-, так и для низкомолекулярных изоформ тропомиозина. Тропомиозин-зависимый актин-кэпирующий участок был отнесен к остаткам 48–92, а тропомиозин-независимый актин-кэпирующий участок локализован на C-конце тропомодулина. Удаление 15 C-концевых остатков приводит к тому, что тропомодулин теряет способность кэпировать нити актина в отсутствие тропомиозина. Участки 1–38, 109–144 и 48–92 консервативны во всех изоформах тропомодулина, поэтому, вероятнее всего, другие изоформы имеют те же участки связывания. Кроме того, в Tmod3 два участка (остатки 31–40 и 149–169) предположительно участвуют в связывании мономерного актина [35].

Кроме актина и тропомиозина в поперечно-полосатых мышцах тропомодулин связывается еще с одним белком, небулином. Небулин – это гигантский белок с молекулярной массой около 800 кДа, который тянется вдоль актиновых нитей в саркомерах [59, 60]. N-конец небулина обращен к медленно растущему концу актиновых нитей. Небулин состоит из коротких повторов [61]. Предполагается, что

небулин определяет длину актиновой нити в саркомере за счет регуляции связывания тропомодулина на медленно растущем конце и тем самым действует как молекулярная линейка [31, 62]. Фрагмент небулина, содержащий три N-концевых модуля M1-M2-M3, связывается с тропомодулином [63]. Участок связывания небулина еще не локализован в тропомодулине, но предполагается, что он находится в C-концевой половине молекулы (остатки 160–344) [43].

V. ИЗОФОРМНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ТРОПОМОДУЛИНА И ТРОПОМИОЗИНА

Специфичность связывания тропомиозина с тропомодулином впервые была показана на изоформах тропомиозина из эритроцитов, мозга, тромбоцитов и скелетных мышц [64]. Tmod1 образовывал комплексы со всеми этими изоформами, но преимущественно связывался с эритроцитарным тропомиозином. Поскольку в то время уже было известно, что тропомодулин связывается с одним из концов тропомиозина [65], было высказано предположение, что связывание отражает гетерогенность N- или C-концевых последовательностей, характерных для изоформ тропомиозина [64]. Авторы предположили, что изоформ-зависимое взаимодействие может представлять собой механизм для избирательной регуляции связывания тропомодулина с актин-тропомиозиновым комплексом.

Позже было показано, что тропомодулин связывается с N-концевым участком тропомиозина [52]. Без первых 19 остатков низкомолекулярный немышечный γ -тропомиозин неспособен связываться с тропомодулином, остатки 7–14 формируют участок связывания с тропомодулином [66]. Первые 14 остатков высокомолекулярных тропомиозинов гомологичны остаткам 6–19 низкомолекулярных тропомиозинов (таблица) и также содержат участок связывания с тропомодулином [50].

Для количественного изучения связывания тропомиозина и тропомодулина были использованы модельные химерные пептиды [48–50, 54, 55, 58, 67]. Исходно такие пептиды были сконструированы для определения структуры N-концевых участков тропомиозина [68, 69]. В дополнение к N-концевым участкам низко- и высокомолекулярных изоформ тропомиозина (остатки 1–19 и 1–14, соответственно) химерные пептиды содержат 18 остатков так называемой «лейциновой застежки» из дрожжевого активатора транскрипции GCN4 [68] (см. таблицу). Для формирования стабильной coiled-coil структуры аминокислотная последовательность должна

Таблица.
**Константы диссоциации комплексов, образованных
фрагментами тропомиозина и тропомодулина***

Пептид (тропомиозин)	Последовательность пептида		Tmod1 a.a. 1–38	Tmod1 a.a. 109–44
	тропомиозин	GCN4		
α TM1aZip (α stTM)	<u>M</u> D <u>A</u> I <u>K</u> K <u>K</u> M <u>Q</u> M <u>L</u> K <u>L</u> D	NYHLENEVARLK L VGER	1.1±0.4	1.3±0.3
α TM1bZip (α TM5a)	AG <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> LEAVRRK <u>I</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>Q</u>	NYHLENEVARLK L VGER	0.22±0.10	0.003±0.001
γ TM1bZip γ TM5NM1)	AG <u>S</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>I</u> EAVK <u>R</u> K <u>I</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u>	NYHLENEVARLK L VGER	–	0.04±0.03
δ TM1bZip (δ TM4)	AG <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> LEAVK <u>R</u> K <u>I</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u>	NYHLENEVARLK L VGER	-	0.09±0.02
гептадный повтор	<i>a d a d a d a d a</i>			

* Значения Кд (мкМ) были рассчитаны по кривым денатурации комплексов в сравнении с индивидуальными фрагментами [70]. Последовательности изоформ тропомиозина выравнены в соответствии с их гомологией. Фрагменты тропомиозина представляют собой химерные пептиды, состоящие из N-концевых участков низко- и высокомолекулярных изоформ тропомиозина (остатки 1–19 и 1–14 соответственно) и 18 остатков leucine zipper домена из дрожжевого активатора транскрипции GCN4. Аминокислотные остатки, ответственные за изоформную специфичность низкомолекулярных тропомиозинов при связывании с тропомодулином, подчеркнуты.

состоять из гептадных повторов, где в положениях *a* и *d* находятся гидрофобные остатки. «Лейциновая застежка» содержит гептадные повторы, где в *d* позициях находится, в основном, лейцин. Она формирует димеры и стабилизирует coiled-coil структуру химерных пептидов. Поскольку известно, что N-концевое ацетилирование, стабилизирующее структуру высокомолекулярного тропомиозина, существенно для взаимодействия с тропомодулином [50], все химерные пептиды были ацетилированы.

Взаимодействие тропомодулина и тропомиозина было детально изучено с помощью метода кругового дихроизма (рис. 3) на двух фрагментах тропомодулина, содержащих индивидуальные участки связывания, и четырех пептидах тропомиозина, α TM1aZip, α TM1bZip, γ TM1bZip, and δ TM1bZip, представляющих разные изоформы: высокомолекулярный мышечный α -тропомиозин, и низкомолекулярные немускульные α -, γ - и δ -тропомиозины. 1a и 1b соответствуют альтернативным экзонам, отличающим высокомолекулярную изоформу от низкомолекулярной. Константы диссоциации, рассчитанные из кривых плавления [26, 48, 67], представлены в таблице. Уравнения, используемые для вычисления, детально описаны в [70].

N-концевая последовательность тропомиозина, использованная при дизайне химерного пептида α TM1aZip (см. таблицу), идентична у двух изоформ высокомолекулярных тропомиозинов, α и β . В соответствующей последовательности высокомолекулярного γ -тропомиозина есть только одна консервативная замена – Asp2 на глутамат (выделено жирным шрифтом в таблице). Высокомолекулярный тропомиозин, кодируемый δ -геном, не обнаружен. Таким образом, константы диссоциации, полученные для комплексов α TM1aZip с фрагментами тропомодулина, должны быть такими же или очень близкими для всех высокомолекулярных изоформ. Что касается низкомолекулярных изоформ, то их N-концевые участки различаются, хотя и высокогомологичны. Несмотря на гомологию, разница в аффинности связывания поразительна. В то время как α TM1bZip и α TM1aZip прочно связываются с обоими участками в тропомодулине (хотя и с разным сродством), γ TM1bZip и δ TM1bZip связываются хорошо только со вторым участком. Связывание этих пептидов с первым участком недостаточно прочно, чтобы было возможно рассчитать константы диссоциации, пользуясь методом кругового дихроизма, но может быть легко установлено другими методами, как, например, методом химического «сшивания» [67]. Аминокислотные остатки, отвечающие за изоформную специфичность связывания низкомолекулярных тропомиозинов с тропомодулином, находятся в положении 4 и 14 в аминокислотной последовательности, представленной в таблице [67].

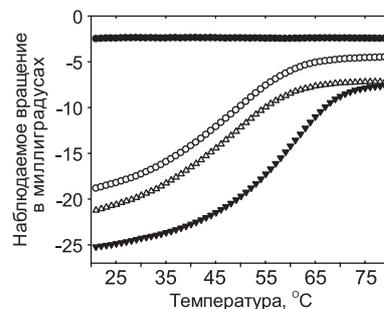


Рис. 3. Влияние связывания фрагмента тропомодулина на тепловую денатурацию фрагмента тропомиозина на примере Tmod1₁₀₉₋₁₄₄ и γ TM1bZip.

Кривые температурной зависимости кругового дихроизма, измеренного при 222 нм, полученные для фрагмента тропомодулина (●), фрагмента тропомиозина (○), смеси фрагментов тропомодулина и тропомиозина (▼), суммы значений кругового дихроизма для несмешанных фрагментов тропомодулина и тропомиозина (▲). Увеличение спиральности и стабильности в смеси по сравнению с суммарной кривой указывает на формирование комплекса.

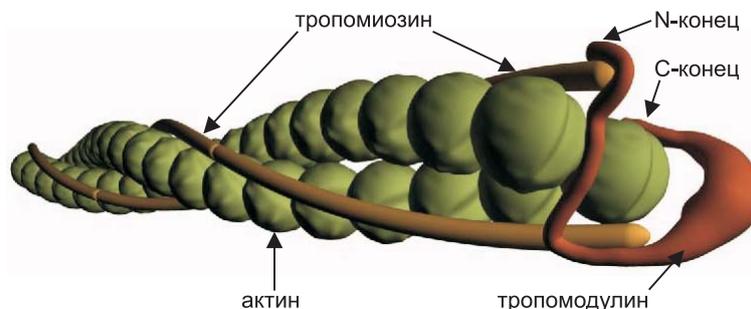


Рис. 4. Модель медленно растущего конца актинового филамента. N-концы молекул тропомиозина обращены к острому концу. Тропомодулин взаимодействует с обеими молекулами тропомиозина.

VI. МОДЕЛЬ МЕДЛЕННО РАСТУЩЕГО КОНЦА

В результате вышеописанных экспериментов длительная дискуссия в литературе, касающаяся локализации участков связывания тропомиозинов в молекуле тропомодулина, завершилась. Все изоформы тропомиозина связываются с обоими участками, однако низкомолекулярные γ - и δ -изоформы связываются с первым участком со значительно более низким сродством. Однако, если тропомодулин имеет два участка связывания с тропомиозинами, сколько молекул тропомиозина связывает одна молекула тропомодулина? Раствор тропомодулина титровали раствором α TM1bZip [48]. Было обнаружено, что одна молекула тропомодулина связывает одновременно две молекулы пептида. Была предложена модель, согласно которой на медленно растущем конце расположена одна молекула тропомодулина, взаимодействующая с обеими молекулами тропомиозина (рис. 4).

Комплексы фрагментов тропомиозина и тропомодулина были исследованы методом ядерного магнитного резонанса и было показано, что структуры этих комплексов существенно различаются [67]. Предложены возможные способы взаимодействия, основанные на данных кругового дихроизма, мутагенеза и эффекта формирования комплексов на ^1H - ^{15}N HSQC спектры пептида α TM1bZip [48, 49, 56, 57, 67]. Предполагается, что в первом участке связывания остатки тропомодулина образуют петлю вокруг N-конца тропомиозина, а во втором участке связывания остатки тропомодулина связываются с тропомиозином антипараллельно. Это гипотетические модели, структуры комплексов, расположение спиралей и значение аминокислотных остатков еще предстоит определить в дальнейших работах.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы, с помощью которых может регулироваться кэпирование тропомодулином, пока неизвестны. Возможно, существуют факторы, непосредственно влияющие на функцию тропомодулина за счет связывания с ним или его модификации. Изоформная специфичность взаимодействия тропомодулина и тропомиозина может также быть одним из регулирующих механизмов. Незначительные изменения в аминокислотной последовательности изоформ тропомиозина имеют большое влияние на связывание с тропомодулином и таким образом могут модулировать динамику медленно растущих концов актиновых филаментов. Высокомолекулярный мышечный тропомиозин связывается с обоими участками в молекуле тропомодулина с одинаковым средством, в то время как связывание низкомолекулярных тропомиозинов со вторым участком сильнее, чем с первым участком. Эта разница в средстве для двух участков может регулировать правильное расположение молекулы тропомодулина в отсутствие другого тропомодулин-связывающего белка, небулина, найденного только в поперечно-полосатых скелетных и сердечных мышцах. Кроме того, средство тропомодулина к разным изоформам тропомиозина влияет на эффективность кэпирования в присутствии этих изоформ. Регуляция связывания тропомодулина, так же как и эффективность кэпирования в присутствии специфичных тропомиозинов, может иметь существенное влияние на формирование локального цитоскелета и динамику актиновых нитей в клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fowler, V.M. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 86–96.
2. Fowler, V.M. (1997) *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, **52**, 79–89.
3. Weber, A., Pennise, C.R. and Fowler, V.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 34637–34645.
4. Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003) *Cell*, **112**, 453–465.
5. Shen, B.W., Josephs, R. and Steck, T.L. (1986) *J. Cell Biol.*, **102**, 997–1006.
6. Sosa, H., Popp, D., Ouyang, G. and Huxley, H.E. (1994) *Biophys. J.*, **67**, 283–292.
7. dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. and Nosworthy, N.J. (2003) *Physiol. Rev.*, **83**, 433–473.
8. Cooper, J.A. and Schafer, D.A. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 97–103.
9. Kuhlman, P.A., Hughes, C.A., Bennett, V. and Fowler, V.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 7986–7991.
10. Weber, A., Pennise, C.R., Babcock, G.G. and Fowler, V.M. (1994) *J. Cell Biol.*, **127**, 1627–1635.
11. Schafer, D.A. and Cooper, J.A. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 497–518.

12. Southwick, F.S. and Hartwig, J.H. (1982) *Nature*, **297**, 303–307.
13. Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6181–6186.
14. Blanchoin, L., Pollard, T.D. and Mullins, R.D. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 1273–1282.
15. Weber, A. (1999) *Mol. Cell Biochem.*, **190**, 67–74.
16. Fowler, V.M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12792–12800.
17. Gregorio, C.C. and Fowler, V.M. (1995) *J. Cell Biol.*, **129**, 683–695.
18. Littlefield, R., Almenar-Queralt, A. and Fowler, V.M. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 544–551.
19. Perry, S.V. (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **22**, 5–49.
20. Gunning, P.W., Schevzov, G., Kee, A.J. and Hardeman, E.C. (2005) *Trends Cell Biol.*, **15**, 333–341.
21. Sung, L.A., Fowler, V.M., Lambert, K., Sussman, M.A., Karr, D. and Chien, S. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 2616–2621.
22. Watakabe, A., Kobayashi, R. and Helfman, D.M. (1996) *J. Cell Sci.*, **109**, 2299–2310.
23. Almenar-Queralt, A., Lee, A., Conley, C.A., de Pouplana, L.R. and Fowler, V.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 28466–28475.
24. Conley, C.A., Fritz-Six, K.L., Almenar-Queralt, A. and Fowler, V.M. (2001) *Genomics*, **73**, 127–139.
25. Conley, C.A. (2001) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **280**, C1645–1656.
26. Kostyukova, A. (2007) *Archives Biochem. Biophys.*, **465**, 227–230.
27. Chereau, D., Boczkowska, M., Skwarek-Maruszewska, A., Fujiwara, I., Hayes, D.B., Rebowski, G., Lapalainen, P., Pollard, T.D. and Dominguez, R. (2008) *Science*, **320**, 239–243.
28. Fowler, V.M., Sussmann, M.A., Miller, P.G., Flucher, B.E. and Daniels, M.P. (1993) *J. Cell Biol.*, **120**, 411–420.
29. Sussman, M.A., Welch, S., Cambon, N., Kleivitsky, R., Hewett, T.E., Price, R., Witt, S.A. and Kimball, T.R. (1998) *J. Clin. Invest.*, **101**, 51–61.
30. Sussman, M.A., Baque, S., Uhm, C.S., Daniels, M.P., Price, R.L., Simpson, D., Terracio, L. and Kedes, L. (1998) *Circ. Res.*, **82**, 94–105.
31. McElhinny, A.S., Schwach, C., Valichnac, M., Mount-Patrick, S. and Gregorio, C.C. (2005) *J. Cell Biol.*, **170**, 947–957.
32. Chu, X., Chen, J., Reedy, M.C., Vera, C., Sung, K.L. and Sung, L.A. (2003) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1827–1838.
33. Fritz-Six, K.L., Cox, P.R., Fischer, R.S., Xu, B., Gregorio, C.C., Zoghbi, H.Y. and Fowler, V.M. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 1033–1044. Epub 2003 Dec 1031.
34. Fischer, R.S., Sept, D., Weber, K.L., Speicher, D.W. and Fowler, V.M. (2004) *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 147a.
35. Fischer, R.S., Yarmola, E.G., Weber, K.L., Speicher, K.D., Speicher, D.W., Bubb, M.R. and Fowler, V.M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 36454–36465.
36. Fischer, R.S., Fritz-Six, K.L. and Fowler, V.M. (2003) *J. Cell Biol.*, **161**, 371–380.
37. Yang, J.W., Czech, T., Felizardo, M., Baumgartner, C. and Lubec, G. (2006) *Amino Acids*, **30**, 477–493.
38. Iwazaki, T., McGregor, I.S. and Matsumoto, I. (2006) *Brain Res.*, **1097**, 19–25.

39. *Chen, A., Liao, W.P., Lu, Q., Wong, W.S. and Wong, P.T.* (2007) *Neurochem Int.*, **50**, 1078–1086.
40. *Kostyukova, A., Maeda, K., Yamauchi, E., Krieger, I. and Maeda, Y.* (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6470–6475.
41. *Fujisawa, T., Kostyukova, A. and Maeda, Y.* (2001) *FEBS Lett.*, **498**, 67–71.
42. *Kostyukova, A.S., Tiktopulo, E.I. and Maeda, Y.* (2001) *Biophys. J.*, **81**, 345–351.
43. *Krieger, I., Kostyukova, A., Yamashita, A., Nitani, Y. and Maeda, Y.* (2002) *Biophysical J.*, **83**, 2716–2725.
44. *Kobe, B. and Deisenhofer, J.* (1995) *Mol. Cell Neurosci.*, **6**, 97–105.
45. *Papageorgiou, A.C., Shapiro, R. and Acharya, K.R.* (1997) *Embo J.*, **16**, 5162–5177.
46. *Price, S.R., Evans, P. R. and Nagai, K.* (1998) *Nature*, **394**, 645–650.
47. *Kobe, B. and Kajava, A.V.* (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 725–732.
48. *Kostyukova, A.S., Choy, A. and Rapp, B.A.* (2006) *Biochemistry*, **45**, 12068–12075.
49. *Greenfield, N.J., Kostyukova, A.S. and Hitchcock-Degregori, S.E.* (2005) *Biophys. J.*, **88**, 372–383.
50. *Greenfield, N.J. and Fowler, V.M.* (2002) *Biophys. J.*, **82**, 2580–2591.
51. *Babcock, G.G. and Fowler, V.M.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27510–27518.
52. *Sung, L.A. and Lin, J.J.* (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 627–634.
53. *Sung, L.A., Gao, K.M., Yee, L.J., Temm-Grove, C.J., Helfman, D.M., Lin, J.J. and Mehrpouryan, M.* (2000) *Blood*, **95**, 1473–1480.
54. *Fowler, V.M., Greenfield, N.J. and Moyer, J.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 40000–40009.
55. *Kostyukova, A.S. and Hitchcock-Degregori, S.E.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 5066–5071.
56. *Vera, C., Lao, J., Hamelberg, D. and Sung, L.A.* (2005) *Arch. Biochem. Biophys.*, **444**, 130–138.
57. *Kong, K.Y. and Kedes, L.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 9589–9599.
58. *Kostyukova, A., Rapp, B., Choy, A., Greenfield, N.J. and Hitchcock-Degregori, S.E.* (2005) *Biochemistry*, **44**, 4905–4910.
59. *Wang, K.* (1996) *Adv. Biophys.*, **33**, 123–134.
60. *Fock, U. and Hinssen, H.* (2002) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 205–213.
61. *Pfuhl, M., Winder, S.J., Castiglione Morelli, M.A., Labeit, S. and Pastore, A.* (1996) *J. Mol. Biol.*, **257**, 367–384.
62. *Witt, C.C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H. and Labeit, S.* (2006) *Embo J.*, **25**, 3843–3855.
63. *McElhinny, A.S., Kolmerer, B., Fowler, V.M., Labeit, S. and Gregorio, C.C.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 583–592.
64. *Sussman, M.A. and Fowler, V.M.* (1992) *Eur. J. Biochem.*, **205**, 355–362.
65. *Fowler, V.M.* (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 471–481.
66. *Vera, C., Sood, A., Gao, K.M., Yee, L.J., Lin, J.J. and Sung, L.A.* (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **378**, 16–24.
67. *Kostyukova, A., Hitchcock-Degregori, S.E. and Greenfield, N.J.* (2007) *J. Mol. Biol.*, **372**, 608–618.
68. *Greenfield, N.J., Montelione, G.T., Farid, R.S. and Hitchcock-Degregori, S.E.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 7834–7843.
69. *Greenfield, N.J., Huang, Y.J., Palm, T., Swapna, G.V., Monleon, D., Montelione, G.T. and Hitchcock-Degregori, S.E.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 40000–40009.

- gori, S.E.* (2001) *J. Mol. Biol.*, **312**, 833–847.
70. *Greenfield, N.J.* (2004) *Methods Mol. Biol.*, **261**, 55–78.