

## ХЕМОТАКСИС: ДВИЖЕНИЕ, НАПРАВЛЕНИЕ, УПРАВЛЕНИЕ

©2011 г.

А. В. ВОРОТНИКОВ

*Кафедра биохимии и молекулярной медицины факультета  
фундаментальной медицины Московского государственного  
университета им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Общие положения. III. Экспериментальные модели. IV. Общие механизмы движения. V. Направленное движение. VI. Хемотактическая сигнализация. VII. Обратные связи. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Все клетки способны к движению. В отсутствие внешних воздействий только некоторые остаются неподвижны, тогда как большинство беспорядочно перемещается в свободном пространстве, в разные стороны выдвигая мембранные выросты, или протрузии. При этом покрываемые клетками расстояния достаточно малы, так как они не могут удерживать направление движения. Клетки часто останавливаются, «топчутся на месте» и их движение носит беспорядочный характер. Однако их поведение кардинально меняется под воздействием внешних факторов. Клетки отвечают активацией поверхностных рецепторов и задействуют целый ряд внутренних

---

*Принятые сокращения:* АФК – активные формы кислорода; НАД(Ф)Н – восстановленный никотинамидаденин-динуклеотид (фосфат); Arp (actin-related protein) – родственник актину белок; DOCK (dedicator of cytokinesis) – посвящающий цитокинезу – группа факторов обмена гуаниловых нуклеотидов Rho-белков); EGF – эпидермальный фактор роста; Ерас (exchange protein directly activated by cAMP) – фактор обмена гуаниловых нуклеотидов, активируемый цАМФ; Erk (extracellular regulated MAP-kinase) – MAP-киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; ФАК (focal adhesion kinase) – тирозиновая киназа фокальных адгезий; FH1/FH2 (formin homology 1/2) – (домены) форминовой гомологии; GBD/CRIB (GTPase-binding domain/Cdc42 and Rac interactive binding) – домен, связывающий малые ГТФ-азы Cdc42 и Rac; GbpC (cGMP-binding protein C) – белок C, связываю-

*Окончание см. на сл. стр.*

*Адрес для корреспонденции:* Vorotnikov@fbm.msu.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-01519-а.

сигнальных молекул для передачи сигнала к цитоскелету и изменения формы и морфологии. В этих условиях клетки приобретают четкую поляризованную морфологию и движутся вдоль градиента внешнего стимула, непрерывно определяя его вектор и направляя движение к его источнику. Такое поведение называют направленной миграцией, или хемотаксисом, в случае если внешним стимулом является растворимое соединение.

Хемотаксис – фундаментальное явление, имеющее много физиологических и патофизиологических приложений. Хемотаксис прояв-

#### Окончание

вающий цГМФ в клетках *Dictyostelium*; GPCR (G-protein-coupled receptors) – рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками; Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) – белок-адаптор рецепторов факторов роста; IL-1 $\beta$  – интерлейкин-1 $\beta$ ; LEGI (local excitation, global inhibition) – модель локального возбуждения и общего ингибирования; LIM-киназа (*lin-11*, *isl-1*, *mec-3*) – протеинкиназа нематоды *Caenorhabditis*, фосфорилирующая кофилин и содержащая LIM-домен, обнаруженный в белках, кодируемых указанными генами; LPA – лизофосфатидная кислота; MLCK (myosin light chain kinase) – киназа легких цепей миозина II; PDGF (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста; PDK (phosphoinositide-dependent kinase) – фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа; PAK (p21-activated kinase) – киназа, активируемая Ras-подобным белком p21; PH (pleckstrin homology) – (домен) плекстриновой гомологии; PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) – фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP2, PI(3,4)P2 и PI(4,5)P2 – фосфатидилинозитол-бисфосфат с фосфатными группами, соединенными к указанным цифрами положениями инозитольного кольца; PIP3 и PI(3,4,5)P2 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат; PIX (PAK-interacting exchange factor) – фактор обмена гуаниловых нуклеотидов, связывающий PAK-киназу; PKB/Akt (protein kinase B, or Akt) – протеинкиназа B, известная также как Akt; PLA2 – фосфолипаза A2; PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) – фосфатаза, содержащая участок гомологии с белком тензином, отсутствующая в 10-й хромосоме ряда опухолевых клеток, и дефосфорилирующая фосфатидилинозитолы по 3'-положению; ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) – протеинкиназа, активируемая Rho-белком и содержащая суперспираль; RPTK (receptor protein tyrosine kinases) – рецепторные тирозиновые протеинкиназы; Scar (suppressor of cAMP receptor) – супрессор рецептора цАМФ в клетках *Dictyostelium*; sGC (soluble guanylyl cyclase) – растворимая гуанилатциклаза; SH2 (Src-homology 2) – (домен) гомологии 2 с Src; SHIP1 (Src homology 2 domain containing inositol-5-phosphatase 1) – фосфатаза 1, дефосфорилирующая фосфатидилинозитолы по 5'-положению и содержащая SH2-домен; Src (Rous Sarcoma) – протоонкогенная тирозиновая киназа, характерная для вирусной саркомы Рауса; TorC2 (target of rapamycin complex 2) – комплекс 2 мишени действия рапамицина; WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome protein) – белковый продукт гена WAS, мутации которого характерны для синдрома Вискотта-Олдриха; WAVE (WASP and verprolin homologous protein) – белок клеток млекопитающих, гомологичный WASP и верпролину; WH1/WH2 (WASP homology) – WASP-гомологичные (домены).

ляется в репродуктивной фазе и всех последующих этапах эмбрионального развития, включая закладку, ориентацию и формирование органов, а также мобилизацию и хоуминг стволовых и прогениторных клеток. Во взрослом организме он важен для иммунного ответа лимфоцитов и развития воспалительных реакций, эндотелий-зависимого ангиогенеза, созревания и роста сосудов, для навигации и роста нервных окончаний. Хемотаксис участвует в воспалении, ранозаживлении и ремоделировании при регенерации и репарации тканей. Он является важным звеном в патологии инфекционных и аллергических заболеваний, астмы и атеросклероза. Ключевая роль хемотаксиса в метастазировании опухолей также не вызывает сомнений.

Существует много биологических веществ, которые привлекают или, напротив, отталкивают клетки, однако их строгая классификация пока не разработана. К ним относятся различные молекулы, в целом классифицируемые как хемоаттрактанты или хеморепелленты, а также полипептиды и белки семейства *цитокинов*, само название которых отражает способность вызывать клеточное (*cyto-*) движение (*-kinos*). Подсемейство хемокинов включает хемотактические цитокины, обычно пептидной природы и малого размера. Эти растворимые молекулы выступают лигандами мембранных рецепторов, которые запускают хемотаксис. Движение клеток, направляемое нерастворимыми факторами внеклеточного матрикса, известно как гаптотаксис. Оно контролируется особыми поверхностными рецепторами, которые участвуют в клеточных и межклеточных взаимодействиях и включают интегрины, кадерины, селектины, эфриновые рецепторы и их лиганды.

Сопряжение хемотактических рецепторов с двигательным аппаратом клетки происходит за счет специальных механизмов передачи хемотактического сигнала, которые обеспечивают управление движением клеток в определенном направлении. Данный обзор посвящен анализу молекулярных процессов, лежащих в основе движения клеток, и управления ими.

## II. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Клетки мигрируют, используя *протрузии*, также известные как *псевдоподии*, которые представляют собой выросты переднего края плазматической мембраны – того, что обращен в сторону движения. Псевдоподии различной формы и размеров скрепляют клетку с окружающим матриксом за счет *адгезивных контактов* или заполняя собой лакуны в окружающем 3-мерном матриксе. В первом случае тело клетки после этого «протаскивается» вперед за счет тянущих

усилий (англ. *traction*), прикладываемых к точкам прикрепления, а во втором случае тело перемещается за счет образования мембранных пузырей и «выдавливания» в них цитоплазмы, известное как блеббовидное движение (от англ. *blebbing motility*).

Ключевым событием для начала миграции является *поляризация* клетки, приводящая к изменению ее формы и морфологии, и определяющая ее дальнейшее поведение. Этот процесс схематически представлен на рис. 1. Непрерывное изменение формы клетки показано как динамическое равновесие между основными базовыми состояниями. Хотя все переходы формально обратимы, в реальности каждое равновесие в той или иной степени сдвинуто в сторону одного из состояний, что зависит от степени поляризации клетки. Рассматривая эти состояния как промежуточные, можно провести аналогию с традиционной для биохимиков формализацией многоэтапных ферментативных реакций, таких как, например, цикл гидролиза АТФ актомиозиновым мотором [1]. Именно способность к поляризации определяет переход между состояниями А и Б в нестимулированных клетках и вносит существенный вклад в равновесие между состояниями В и Г в стимулированных клетках, однако становится малозначимой в уже поляризованных клетках (см. рис. 1). Внутриклеточные механизмы, которые определяют способность клетки к поляризации и выбору направления движения, остаются во многом загадочными; некоторые из возможных механизмов разбираются в заключительном разделе.

Стимуляция вызывает поляризацию клеток, а неравномерная стимуляция обладает значительно более сильным действием (рис. 1), что зависит от восприимчивости клеток и обозначается как *восприятие направления* (англ. *directional sensing*) [2]. Способность поляризованных клеток выдвигать протрузии и двигаться преимущественно в одном направлении в градиентах аттрактантов определяется как *поддержание направления* (англ. *persistent motility*). Этот параметр может быть измерен экспериментально [3]. Активируя фронтальные рецепторы клетки, аттрактанты запускают *сигнальные каскады*, которые переводят внешний градиент во внутриклеточный градиент своих сигнальных молекул, и локализуют протрузионную активность на лидирующем крае. Затем эта активность еще более усиливается под действием сложной комбинации сигнальных сетей, известной как механизм *локального усиления и общего ингибирования* (LEGI, от англ. *Local Excitation and Global Inhibition*) [2, 4]. Эти сигнальные механизмы запускают перестройки цитоскелета и двигательные реакции клетки, ориентируя их в направлении градиента внешнего стимула.

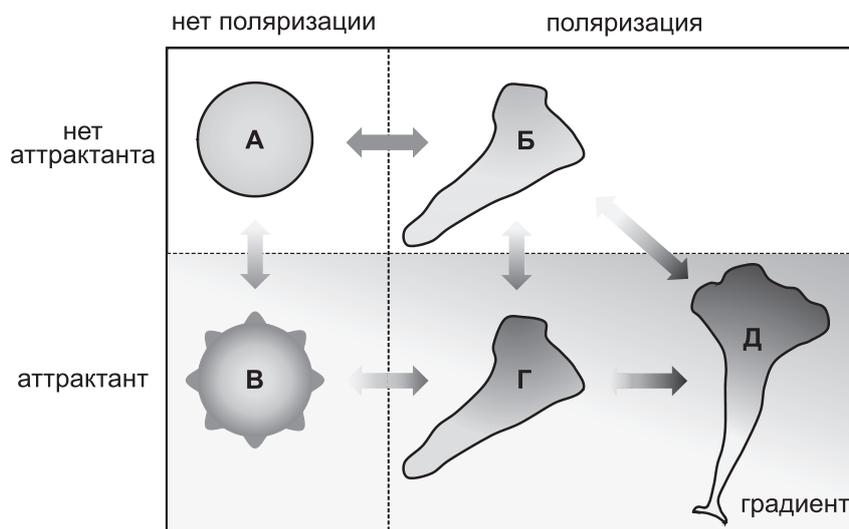


Рис. 1. Схема морфологических изменений клетки при поляризации и действии аттрактанта.

Последовательные изменения формы неполяризованной (А, В) и исходно поляризованной (Б, Г, Д) клетки представлены как обратимые переходы ее основных состояний в отсутствие (А, Б) или присутствии (В-Д) аттрактанта. Д – состояние в условиях градиента хемоаттрактанта, исходящего справа сверху, как показано полутоновым затенением.

### III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

С точки зрения основного типа движения, рецепции и проведения хемотактического сигнала, клетки можно условно разделить на четыре основных группы. *Прокариоты* используют совершенно иной механизм определения внешнего градиента и движения, чем эукариотические клетки. Хотя в какой-то степени этот механизм можно считать прототипным (см. [5]), его анализ не входит в задачи настоящего обзора. Два типа эукариотических клеток, свободноживущая амеба *Dictyostelium* и лейкоциты млекопитающих, являются *амебоидными* по способу движения. Для детекции хемоаттрактантов они используют поверхностные рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками (GPCR). При этом термин «амебоидный» является морфологическим определением, но не указывает на использование принципиально особой механики передвижения [6]. Хотя и очень далекие в эволюционном отношении, клетки *Dictyostelium* и нейтрофилы очень сходны по морфологии и используют общие

принципы проведения хемотактических сигналов [7–9]. В отличие от них, *фибробласты* и гладкомышечные клетки исходно сильно поляризованы и движутся, чередуя фазы выдвижения, остановки и втягивания мембранных протрузий [10, 11]. Эти клетки используют рецепторы с тирозинкиназной активностью (RPTK) для связывания хемоаттрактантов. Хотя сигнальные и двигательные механизмы этих клеток отличны от таковых в амебоидных, многие их свойства сохраняются общими [12–16]. К этой группе могут быть также отнесены и многие другие способные к хемотаксису клетки, включая эпителиальные [17, 18], краевые фолликулярные [19, 20], стволовые и прогениторные клетки [21–23]. К четвертой группе относятся нервные клетки, хемотактическое поведение которых значительно более сложное. Хотя эти клетки не перемещают тела, они используют как GPCR, так и RPTK для детекции разных внешних сигналов, служащих для привлечения или отталкивания нервных окончаний при росте аксонов [9, 24]. Поскольку сигнальные механизмы и движение этих клеток подчиняются общим закономерностям, в дальнейшем они не будут рассматриваться отдельно.

#### СЛИЗЕВИК *DICTIOSTELIUM*

Впервые описанная в 1935 году амeba *Dictyostelium discoideum* на данный момент является наиболее популярной экспериментальной моделью для изучения хемотаксиса [25, 26]. Она имеет малый размер (10–20 мкм в диаметре), обитает в лесной почве и имеет две фазы жизненного цикла. В вегетативной фазе она существует в виде отдельных клеток, питается бактериями и дрожжами, которых узнает и настигает с помощью хемотаксиса, поглощает их за счет фагоцитоза, и размножается путем митоза. Отдельные клетки движутся со скоростью до 20 мкм/мин, и делятся каждые 4–12 часов. При истощении пищевых источников индивидуальные клетки запускают программу дифференцировки и вступают в репродуктивную фазу. Они синтезируют цАМФ и используют его как хемоаттрактант для передачи друг другу сигнала о необходимости собраться в одной точке и сформировать многоклеточник. Для этого центральные клетки испускают радиальные волны цАМФ с периодичностью в 5 мин [27]. Встречаясь с этой волной, окружающие клетки испускают вторичные волны цАМФ позади себя. Находясь во фронте набегающей волны около 1,5 мин, клетки-соседи оказываются в области нарастающего градиента цАМФ. Они быстро поляризуются и движутся к источнику цАМФ. При приближении к гребню волны градиент уменьшается и клетки выключают проведение хемотактического сигнала, теряют поляри-

ность и останавливаются. После прохождения гребня волны клетки оказываются в ниспадающем градиенте цАМФ около 90 сек, и последующие 2 мин пребывают почти в отсутствие хемоаттрактанта. В это время их движение подавлено и активируется внеклеточная фосфодиэстераза, которая гидролизует цАМФ, не позволяя клеткам развернуться и преследовать уходящий градиент. Это делает эффективной внеклеточную передачу сигнала на большие расстояния от центра клеточной колонии к периферии и вызывает агрегацию нескольких тысяч клеток [28, 29].

Образовавшийся клеточный агрегат может ползти как миниатюрный садовый слизняк. Именно из-за такого сходства он получил название слизевика. Хотя слизевик является скоплением одиночных клеток, он ведет себя как единое существо и направленно движется по градиенту света, тепла и аттрактантов. Выйдя на поверхность, слизевик формирует плодовое тело, которое состоит из спороножки и спорангия, образует и рассеивает споры. После этого клетки стебля отмирают, а споры дают начало новым амебам и жизненный цикл повторяется. Полный цикл занимает около 24 часов, но в лабораторных условиях продолжительность одноклеточной и многоклеточной стадий можно контролировать, регулируя подачу питательных веществ [25].

Преимущество *Dictyostelium* как экспериментальной модели связано с простотой его генома и легкостью связанных с ним манипуляций. Его шесть хромосом полностью сиквенированы [30] и эта информация общедоступна, так же как и множество биохимических протоколов и клеточных линий (см. <http://dictybase.org>, [31]). Эта модель позволяет относительно легко определять функции индивидуальных белков, а результаты таких исследований часто направляют поиск ортологов в других эукариотических клетках. Клетки *Dictyostelium* высокочувствительны в широком диапазоне внешних сигналов. Они усиливают внешние сигналы, переводя их во внутриклеточные градиенты пространственно разделенных сигнальных молекул и морфологически отвечают изменением поляризации, направления и скорости движения. Они также корректируют свою чувствительность, адаптируя ее к изменениям внешнего градиента в пространстве и времени. Многие свойства клеток *Dictyostelium* являются общими для большинства малых хемотактирующих клеток, включая лейкоциты млекопитающих, а также отчасти для фибробластов и опухолевых клеток.

## ЛЕЙКОЦИТЫ

Хемотаксис полностью определяет функции лейкоцитов в иммунной системе млекопитающих. Нейтрофилы наиболее подробно изучены в этом отношении [7]. Они – одни из наиболее быстрых и чувствительных клеток млекопитающих, мигрирующих со скоростями, близкими к *Dictyostelium* (10–20 мкм/мин), и также определяющие до 1 % разницы концентраций хемоаттрактанта на дистанции длины клетки около 10 мкм [32]. И те и другие клетки используют GPCR как хемотактические рецепторы и почти идентичные внутриклеточные механизмы обработки и передачи их сигналов. Однако лейкоциты отличаются от *Dictyostelium* в двух важных аспектах.

Во-первых, в покое нейтрофилы совершенно не поляризованы: они полностью неактивны и неподвижны; их хемотаксис полностью зависит от внешних воздействий. В остальном движение этих клеток является типично амебоидным: ненаправленный сигнал вызывает неупорядоченную протрузионную активность, но в градиентах она ориентируется в сторону высокой концентрации хемоаттрактанта [17, 32] (рис. 1). Чем круче градиент, тем более эффективна ориентация клеток в пространстве и их направленное движение.

Во-вторых, лейкоциты способны одновременно распознавать несколько градиентов различных хемоаттрактантов [33]. Они избирательно направляются в различные участки инфекций и воспаления в организме под действием сложной гаммы более чем 50 хемокинов, обычно формирующих перекрывающиеся градиенты. Для того, чтобы успешно достичь цели, эти клетки преимущественно реагируют на так называемые «целевые факторы» и, в меньшей степени, на «промежуточные хемоаттрактанты» [9]. Хотя причины такой селективности не вполне понятны, они скорее всего включают разную чувствительность к средней концентрации хемоаттрактантов, крутизне их градиентов, использование разных рецепторов и активированных ими внутриклеточных сигнальных каскадов [34], а также механизмов их взаимной десенситизации [35]. Эффективность хемотаксиса нейтрофилов возрастает с увеличением концентрации хемоаттрактанта до определенного уровня, после достижения которого она падает так же, как и в клетках *Dictyostelium* [28, 29, 32]. Поэтому градиенты вторичных факторов могут по-прежнему направлять миграцию нейтрофилов тогда, когда концентрация первичного фактора достигает насыщения. Считается, что этот механизм, известный как последовательная навигация, позволяет лейкоцитам направленно проходить значительные расстояния до нужных мест в организме [33].

Поддержание стабильных хемотактических градиентов весьма проблематично *in vivo*. Поэтому в дополнение к «последовательной навигации», была сформулирована другая гипотеза, которая предполагает, что как и клетки *Dictyostelium*, нейтрофилы могут распознавать внешний сигнал, приходящий в форме пульсовой волны [28, 29]. Нейтрофилы могут так же импульсно реагировать на волны хемоаттрактанта, ориентируя сигнальную и протрузионную активность на фронте волны и затем, адаптируясь, уменьшая миграцию на время прохождения задней части волны и выключая ее в промежутке между волнами [28]. Пока остается неясным, существуют ли такие волны аттрактанта в пределах организма и как далеко они могут распространяться в крови. Возможно, что в отдельных нишах, обогащенных определенными типами клеток, нейтрофилы только отвечают на эстафетный сигнал, тогда как другие «сигнальные» клетки его обеспечивают. Одним из таких кандидатов является костный мозг, из которого гематопозитические клетки-предшественники выходят в процессе мобилизации.

#### ФИБРОБЛАСТЫ

Фибробласты отличаются от амебоидных клеток по морфологии, подвижности и хемотаксису [11, 15, 16, 36, 37]. Это значительно более крупные мезенхимальные клетки (50–200 мкм в распластанном виде), обладающие внутренней полярностью и развитым цитоскелетом. Фибробласты сильнее адгезируют, используя многочисленные интегрины, и поэтому передвигаются значительно медленнее, со скоростями порядка 0,25–1 мкм/мин. Они используют широкие ламеллиподии, заполненные поляризованной дендритной сетью актина, а также систему микротрубочек [38, 39]. Движение фибробластов в 3-мерном матриксе еще более сложное. Оно включает взаимодействие с внеклеточным матриксом и его деградацию под действием секретруемых металлопротеиназ [40, 41]. В то же время, компоненты внеклеточного матрикса тоже служат сигналом для этих клеток, направляя их внутри тканей путем интегрин-зависимого гаптотаксиса.

Миграция фибробластов является важным этапом в процессе ранозаживления и репарации тканей. Она контролируется факторами роста и их рецепторами (RPTK) на поверхности клеток. Основным хемоаттрактантом, который привлекает фибробласты в рану из прилегающей ткани является PDGF, который секретруется в этих местах клетками «первой помощи» – тромбоцитами, нейтрофилами и макрофагами [14, 16, 42]. Фибробласты располагаются вокруг раны и поэтому не нуждаются в выборе дальней цели или эстафетной стиму-

ляции. Аттрактант в избытке поступает из раны, а его градиент формируется и стабильно поддерживается на краю клеточной популяции за счет рецептор-зависимого эндоцитоза и истощения PDGF самими фибробластами [12]. Такое физиологическое окружение определяет способ, каким фибробласты отвечают на PDGF. Они детектируют его градиенты более просто, чем амебоидные клетки [15, 16], и менее эффективны в поддержании прямолинейного движения. Они менее чувствительны и распознают только крутые градиенты, которые наблюдаются вокруг раны [12]. Их хемотактические реакции оптимальны при промежуточных и ингибируются при высоких концентрациях PDGF [43]. Однако это может оказаться удобным при заживлении раны, поскольку разные концентрации PDGF оказывают различное действие на миграцию и деление фибробластов [44]. Так, хемотаксис стимулируется низкими концентрациями PDGF, которые при этом не влияют на деление. В высокой концентрации PDGF полностью переключает миграцию фибробластов на пролиферацию [44].

Хотя хемотактические каскады фибробластов имеют много общего с таковыми в амебоидных клетках, существуют и важные отличия. У фибробластов нет ни значительного усиления сигнала, ни последующей адаптации, как считается, из-за отсутствия обратных связей в хемотактической сигнализации [15]. Локализация внутриклеточных сигнальных молекул происходит иным образом, имеет более медленную кинетику и более продолжительна, чем в амебоидных клетках [12, 16]. Поэтому фибробласты часто рассматриваются как упрощенная клеточная система [2, 45].

С другой стороны, у фибробластов есть дополнительные и специфичные механизмы регуляции миграции и, возможно, хемотаксиса. Их направленное движение включает направленный синтез  $\beta$ -актина в передней части клетки [46]. Этого механизма нет у *Dictyostelium* и нейтрофилов, но он также обнаружен в растущих аксонах [9]. Фибробласты используют рецептор-зависимый эндоцитоз для поддержания градиента PDGF [12] и для сопряжения активации рецепторов PDGF с Ras1-зависимой динамикой актина [47]. Кроме того, микротрубочки, субстратные контакты и исходная поляризация цитоскелета вносят важный вклад в усиление внешнего сигнала и подвижность фибробластов [11, 36, 38, 39, 48].

#### IV. ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ ДВИЖЕНИЯ

Процесс движения является комплексным и циклическим; его можно наблюдать, помещая клетки на свободную или покрытую матриксом поверхность. В этих условиях клетки движутся путем непрерывного чередования фаз выдвигания псевдоподий, закрепления, перемещения тела и подтягивания задней части [10]. Такое поведение отчетливо заметно у фибробластов, движение которых состоит из дискретных рывков и пауз, и называется фибробластоподобным [11]. Напротив, *Dictyostelium* и нейтрофилы имеют амебоидный тип подвижности, при котором индивидуальные фазы неотчетливы и слиты в единое скользящее движение. Клетки умеют переключать способ движения в зависимости от окружения и структуры матрикса, но при этом используют общие принципы и стратегии движения [6, 37, 40].

Поляризованные клетки последовательно чередуют циклы перемещения, в каждом из которых выделяют четыре основных стадии (рис. 2) [49, 50]. *Первая стадия* заключается в выдвигании передней части мембраны, именуемой протрузией или псевдоподией. Хотя в настоящее время последний термин больше применяется к клеткам *Dictyostelium* и лейкоцитов, он формально является общим для всех видов клеток [6]. В большинстве случаев рост протрузий обеспечивается локальной полимеризацией актина и связан с формированием ламеллиподий, филоподий и прочих мембранных выростов [51]. Ламеллиподии представляют собой плоские листовые структуры, заполненные ветвящейся сетью актиновых филаментов [52], а филоподии – это малые пальцеобразные или нитевидные выросты, содержащие плотные пучки параллельно упакованных акти-

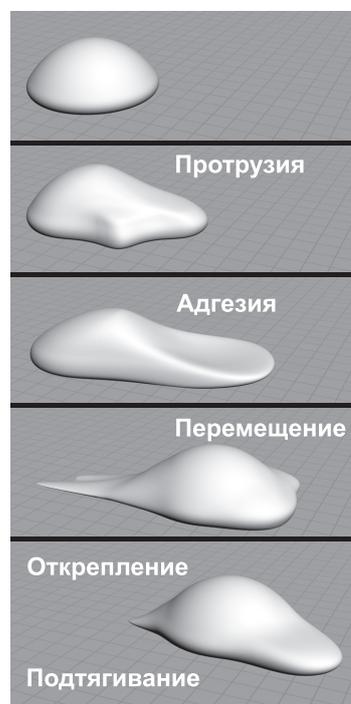


Рис. 2. Двигательный цикл клетки.

Схематично показана исходно неполяризованная клетка (сверху) и ее движение, включающее последовательные этапы, показанные ниже [49, 50]. У амебоидных клеток, таких как *Dictyostelium* и нейтрофилы, эти процессы происходят одновременно, поэтому изменения морфологии при движении этих клеток не так отчетливы, как у фибробластов.

новых филаментов [53]. На *второй стадии* мембранные протрузии прикрепляются к субстрату за счет адгезивных структур, которые соединяют цитоскелет с внеклеточным матриксом и обеспечивают последующее передвижение тела клетки [54]. Эти структуры очень динамичны. Они служат каркасом для сборки актиновых стресс-фибрилл и реагируют на механическую нагрузку [48, 54]. На *третьем этапе* клетка реально перемещает тело вперед. Это требует сократительных усилий, обеспечиваемых миозином II типа, включенным в состав пучков актиновых филаментов [55, 56]. Заключительный этап состоит из открепления и подтягивания задней части клетки – двух пространственно и функционально различных событий [55, 57].

Скорость движения клетки зависит не только от протрузионной активности, но также от силы адгезии и сократимости. Экспериментальные и теоретические исследования показали, что максимальная скорость достигается при средних тянущих усилиях и силе адгезии [58], см. также [49]. Быстро мигрирующие амебы и лейкоциты слабо адгезируют и имеют среднюю тянущую силу, в то время как сильно адгезирующие фибробласты генерируют значительные усилия и движутся медленно. Сам факт наличия оптимума скорости следует из того, что протрузионная, адгезивная и сократительная активности клетки зависят друг от друга и четко сбалансированы [6].

#### ПРОТРУЗИИ

Механизм дендритной полимеризации актина в настоящее время доминирует при объяснении протрузионной активности переднего края движущихся клеток [52, 59]. Он является основным для многих форм подвижности и образования мембранных структур, но клетки могут использовать и другие способы передвижения, включая миозин-зависимое блеббовидное движение [60] и перестройки мембраны за счет поляризованного эндоцитоза [61]. Актиновая подвижность регулируется на разных стадиях большим количеством актин-связывающих белков.

Образование мембранных протрузий на переднем крае является первым механическим этапом движения клетки. Оно происходит за счет АТФ-зависимой полимеризации-деполимеризации актиновых филаментов; этот циклический процесс известен как тредмиллинг (англ., *treadmilling*) [59, 62, 63] (рис. 3). Впервые тредмиллинг был обнаружен *in vitro* [64], но затем и в большинстве клеток. Актиновые филаменты полярны, т.е. их концы отличаются по скорости присоединения и отсоединения мономеров актина. Связанные с

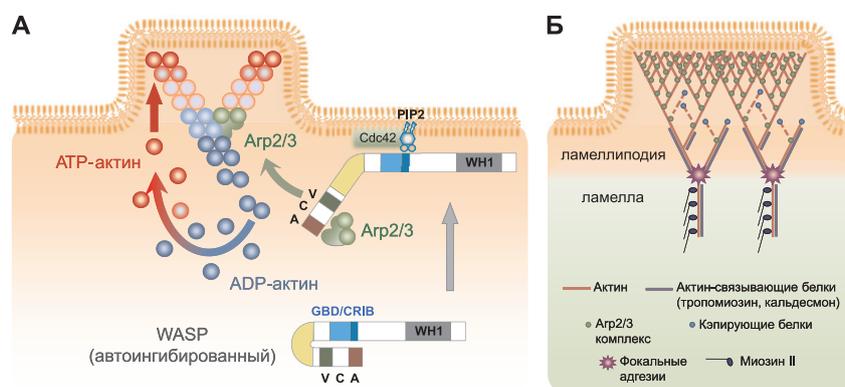


Рис. 3. Полимеризация актина на лидирующем крае.

А – Полимеризация и ветвление актиновых филаментов. Представлена схема тредмиллинга актиновых филаментов, их ветвления под действием комплекса Arp2/3, и последовательной активации Arp2/3 с участием Cdc42 и PIP2, на примере WASP ([63, 77], с изменениями).

Б – Организация актина в ламеллиподии и ламелле. Схема изменений структуры и состава актиновой сети по мере удаления от лидирующей мембраны в ламеллиподии и переходе в ламеллу; фокальные адгезии маркируют границу между этими компартментами клетки (с упрощениями из [62]).

АТФ мономеры актина присоединяются к так называемым «тупым» концам филамента, расположенным ближе к мембране. Гидролиз АТФ актином в составе филамента дестабилизирует «острый» конец и приводит к диссоциации АДФ-актина. Удлинение «тупых» и деполимеризация «острых» концов тщательно сбалансированы. Скорость тредмиллинга и протрузионная активность зависят от доступности и локальной концентрации мономерного актина, количества и активности его регуляторов.

Известны три основных группы цитоплазматических белков, которые связывают и поддерживают пул актиновых мономеров, освобождая их при активации клеток к миграции. Они проявляют уникальное действие и часто обладают несколькими активностями, внося значительный вклад в динамику актина [63]. Профилин ускоряет элонгацию и косвенно активирует нуклеацию нитей актина; кофилин ускоряет деполимеризацию актина с «острых» концов и может разрезать филаменты;  $\beta$ -тимозин является поставщиком мономерного актина. Активность кофилина блокируется при его фосфорилировании LIM-киназой и восстанавливается путем регулируемого дефосфорилирования под действием фосфатаз *Slingshot* и *Chronophin* [65]. Считается, что стимуляция клетки к движению ведет в первую

очередь к активации кофилина на ее переднем крае, что запускает быструю полимеризацию актина, в том числе за счет разрезания филаментов и создания многочисленных «тупых» концов; после этого рекрутируется Agr2/3 комплекс (см. ниже) и усиливает этот эффект [66].

Полимеризации филамента, позволяет растущему филаменту актину своим «тупым» концом толкать плазматическую мембрану вперед (рис. 3). Предложено несколько моделей этого процесса, среди которых наиболее реалистичной представляется модель эластичного броуновского храповика [67]. Она состоит в том, что растущий актиновый филамент касается клеточной мембраны, которая постоянно флуктуирует, образуя зазоры между концом филамента и мембраной. Когда пространство позволяет, следующий мономер актина встраивается в такой зазор, продвигая мембрану в новое положение. Эта модель дает описание основного механизма, связывающего движение мембраны с полимеризацией актина, который согласуется практически со всеми экспериментальными наблюдениями [67].

Динамичные актиновые филаменты образуют непрерывную сеть (рис. 3Б), которая регулируется множеством актин-связывающих белков [68–70]. В результате их действия на периферии клетки появляются разные по форме и архитектуре структуры [51]. Ламелла граничит с телом клетки и на периферии переходит в ламеллиподию. Ламеллиподия имеет всего несколько микрон в глубину, гораздо тоньше и динамичнее, чем ламелла. В ней наблюдается быстрый тредмиллинг актина, тогда как в ламелле идет медленный ретроградный поток актиновых филаментов и формируются сильные субстратные адгезии [71, 72]. Плохо закрепленная ламеллиподия формирует короткоживущие мембранные складки (или рафлы от англ. *ruffles*), которые не прикрепляются к субстрату, а часто заворачиваются вверх и движутся назад по верхней стороне ламеллиподии. Листообразная форма ламеллиподии поддерживается разветвленной сетью филаментов актина, ориентированных «тупыми» концами к переднему краю клеточной мембраны.

Индивидуальные филаменты актина латерально взаимодействуют в ламеллиподии с образованием пальцеобразных родственных образований – микрошипов и филоподий [11, 69]. Филоподии заполнены параллельными пучками актина, которые «перешиты» белками фасцином, эспином и фимбрином. В основании филоподии эти пучки соединяются с дендритным актином. Другим концом они прикреплены к верхушке филоподии форминами mDia и фосфобелком VASP, активируемым вазодилататорами, которые отвечают за удлинение

нитей актина и рост филоподии [53]. Филоподии – весьма гибкие структуры; считается, что с их помощью клетка исследует окружающее пространство.

Внешние стимулы, изменяющие скорость и направление движения клеток, действуют через сигнальные каскады на актин-связывающие белки и их активность, приводя к изменению динамики и структуры актина [73]. В этой регуляции ключевую роль играют малые ГТФ-азы Rho-семейства [74, 75]. ГТФ-азы Rac и Cdc42 регулируют ламеллиподии и филоподии, соответственно, а Rho – сборку стресс-фибрилл и сократимость актомиозина в задней части клетки.

Очевидно, что форма, размер и общая скорость образования протрузий зависят от геометрии сети актина, количества свободных «тупых» концов и скорости тредмиллинга актина. Количество «тупых» концов увеличивается за счет нуклеации и образования новых филаментов *de novo*, а также путем регулируемого освобождения концов и разрезания существующих филаментов. Поскольку нуклеация термодинамически невыгодна и является скоростью-лимитирующей стадией, для инициации сборки актина необходимо действие нуклеирующих факторов. Известны три класса таких белков, включающих формины, Spire и Agr2/3 [51].

Формины представляют собой эспирующие белки, связывающие растущие концы актиновых филаментов, но позволяющие их дальнейшую полимеризацию [76, 77]. Это гомодимеры, содержащие профилин-связывающий (FH1), актин-связывающий (FH2) и регуляторный домены, в том числе связывающий Rac/Cdc42 [77]. Связанный с форминем профилин одновременно взаимодействует с актиновым мономером, приводя его к концу филамента и ускоряя элонгацию последнего. FH2 домены образуют бубликообразную структуру, которая охватывает растущий конец филамента и отвечает за нуклеацию [76]. Важно, что формин остается связанным с растущим филаментом в процессе полимеризации актина.

Белки Spire нуклеируют, сводя продольно четыре мономера актина, и после этого, видимо, диссоциируют [78]. Для них характерен общий доменный состав: четыре домена WH2, связывающих мономеры актина, и два регуляторных домена KIND и FYVE, расположенные на концах молекулы и ответственные за прием регулирующих сигналов. Домен KIND (the *kinase noncatalytic C-lobe domain*) является эволюционно выделившейся некаталитической С-долей активного центра многих протеинкиназ [78] и может сопрягать Spire с сигнальными каскадами. Домен FYVE (структура цинкового пальца, впервые обнаруженная в белках *Fab1p*, *YOTB*, *Vac1p* и *EEA1*) связывает

PIP3, который образуется определенными изоформами PI3-киназы и локализуется предпочтительно на эндосомах [79]. Таким образом, Spire может связывать актин-полимеризующий аппарат с эндоцитозными каскадами.

В отличие от формина и Spire, которые нуклеируют линейные филаменты актина, Arp2/3 комплекс нуклеирует актин, находясь на боку готового филамента и формирует ответвление (рис. 3). Arp2/3 комплекс состоит из семи субъединиц. Два близкородственных актину белка, Arp2 и Arp3, ориентируются нужным образом пятью другими белками, от ARPC1 до ARPC5 [52, 77, 80, 81]. По-видимому, все компоненты контактируют с филаментом, а Arp2 и Arp3 формируют первый псевдо-актиновый димер, смотрящий «тупым» концом в сторону от исходного филамента. В этом процессе участвуют остальные субъединицы и специальные белки, ускоряющие полимеризацию, такие как WASP, Scar/WAVE, кортактин и другие [52, 62, 73, 81]. Из-за очень точной ориентации этих белков и их контактов, дочерние филаменты всегда растут «тупым» концом к мембране под углом 70° к родительскому филаменту. Кроме того, некоторые биохимические данные указывают на то, что Arp2/3 может также разветвлять сами «тупые» концы актиновых филаментов [82]. При этом мономерный актин, Arp2/3 и такие факторы полимеризации, как WASP, могут соединяться в единый ветвящийся комплекс прямо на «тупом» конце, где Arp2/3 сразу дает боковое ветвление [63].

Arp2/3 комплекс изначально неактивен и активируется при связывании с белками WASP или Scar/WAVE, которые передают сигнал от хемотактических рецепторов. Эти факторы нуклеации наиболее изучены [80, 83–85]. WASP содержат ряд доменов, выполняющих разные функции. Домены GBD/CRIB и WH1 принимают сигналы, а домен VCA обеспечивает объединение белков Arp2/3 комплекса (рис. 3). Этот домен включает участок V, гомологичный последовательности верпролина – актин-связывающего белка дрожжей, который связывает мономер актина, а также кофилин-подобный (C) и кислый (A) участки, которые вместе взаимодействуют с Arp2/3 и активируют этот комплекс. Активация WASP белков происходит путем снятия автоингибирования при связывании Cdc42 и PIP2 с доменами GBD/CRIB и WH1, соответственно (рис. 3). Тем самым активация WASP привязана к плазматической мембране, где он инициирует ветвление актиновых филаментов и их растущих концов в непосредственной близости к мембране [62]. Кроме того, другие белки, содержащие SH3-домены (WISH, Ash/Grb2, Nck и профилин) могут активировать WASP, связываясь с его пролин-богатым участком

и также устраняя автоингибирование [85]. Напротив, белки WIP взаимодействуют с WASP через WH1 домен, препятствуют его активации и снижают активность WASP [77, 83].

Белки семейства WAVE/Scar содержат характерный домен гомологии WAVE/Scar (WHD), а также VCA домен, который обеспечивает этим факторам способность активировать Agr2/3 и нуклеировать ответвления актина. В отличие от WASP, белки WAVE/Scar не имеют GBD/CRIB домена, не автоингибированы и активируются внутри белкового комплекса. Один из его участников связывает Ras своим Ras-связывающим доменом (RCB), а другой важный участник комплекса является белком-мишенью для c-Abl (*Abelson*) протоонкогенной тирозиновой киназы [80, 85]. К сожалению, детали регуляторного механизма активации WAVE/Scar остаются малоизвестными.

Таким образом, факторы нуклеации являются ключевыми передатчиками сигнала и Agr2/3-зависимой полимеризации актина при активации миграции клеток. Их число непрерывно растет и выявляются новые участники, включая кортактин, который вместе с WASP стабилизирует ответвления, а также белки WASH, WHAMM и JMY [80, 83]. Оборачиваемость актина дополнительно регулируется разнообразными белками, которые кэпируют и защищают от роста «тупые» концы, ограничивают длину филаментов, соединяют их конец-в-конец, защищают от разрезания, поперечно сшивают и пучкуют, и изменяют количество доступных свободных мономеров актина [63]. Многие из них имеют несколько активностей и, в свою очередь, регулируются сигнальными молекулами, что обеспечивает эффективный контроль динамики актина со стороны сигнальных каскадов, запускаемых внешними стимулами.

#### АДГЕЗИЯ

Для того, чтобы переместить тело, клетка должна прикрепиться к субстрату и создать тянущие усилия. В таком простейшем случае как движение по поверхности, на протрузиях формируются устойчивые к нагрузке адгезивные контакты между клеткой и матриксом. В них входят трансмембранные интегрины, которые и обеспечивают связь актинового цитоскелета с матриксом и приложение создаваемых актомиозином тянущих усилий [69, 86]. Сила адгезий регулируется в движущейся клетке так, что более прочные контакты поддерживаются спереди и слабеют в направлении задней части, где они открепляются [87].

Адгезивные контакты имеют жизненный цикл, включающий создание, созревание, рост и разрушение [54, 57, 88] (рис. 4А). Рождаются

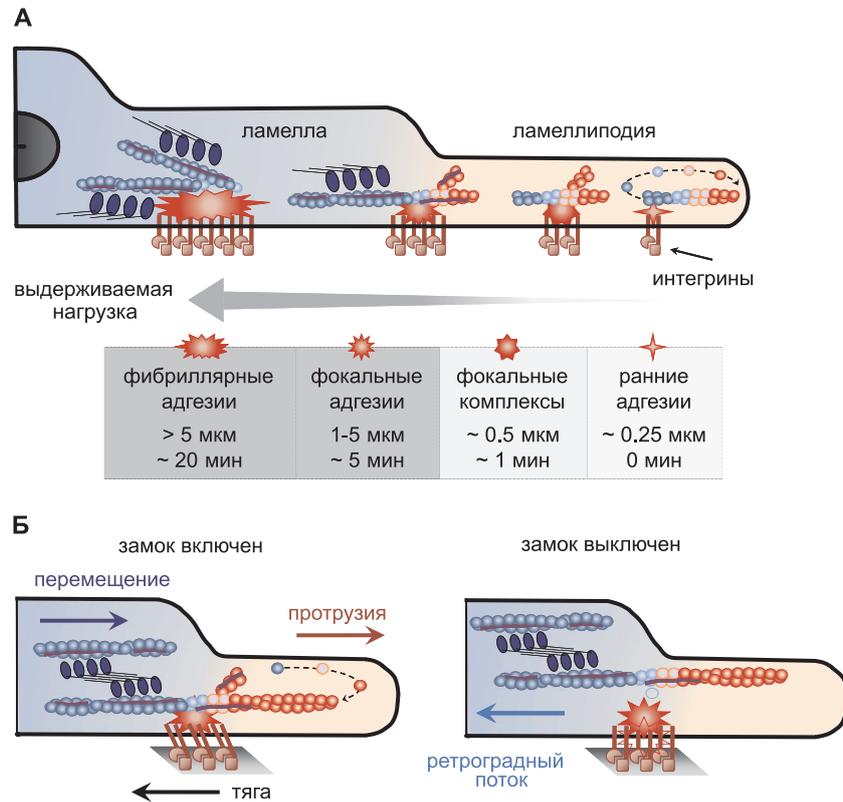


Рис. 4. Динамика клеточных адгезий при движении клетки.  
Пояснения к рис. даны на сл. стр.

адгезии в ламеллиподии в виде микрокластеров из нескольких интегринов. *Ранние адгезии* очень подвижны и разбираются в течение минут, если не захватываются винкулином и талином – белками, которые инициируют связывание интегринов с матриксом. Если это происходит, то далее в комплекс привлекаются паксиллин и  $\alpha$ -актинин, вызывающие дальнейшую кластеризацию интегринов и связывание актина [89]. В этот момент ранние адгезии превращаются в *фокальные комплексы* и, далее, в *фокальные адгезии*. Этот процесс начинается на границе между ламеллиподией и ламеллой [71], и прямо не зависит от тянущих усилий со стороны миозина II [89].

Для последующего созревания требуется механическое натяжение, прикладываемое к фокальным адгезиям через прикрепленные актиновые филаменты и создаваемое миозином II [48]. Величина усилий,

Рис. 4. Динамика клеточных адгезий при движении клетки.

А – Основные фазы созревания адгезивных контактов (с изменениями из [54]). Сверху схематически проведен срез через ламеллиподию, ламеллу и переднюю часть тела клетки и дано относительное расположение в них субстратных адгезий разной степени зрелости (красные многолучевые фигуры) и связанных с ними филаментов актина и миозина II, обозначенных так же, как на рис. 3. Полутоновая стрелка ниже характеризует относительную способность этих контактов выдерживать механическую нагрузку, а принятая номенклатура субстратных адгезий с указанием расстояний от края клетки и времени их жизни приведена в таблице снизу. Показано, что слабые адгезивные контакты в ламеллиподии обеспечивают закрепление актиновых филаментов, которые претерпевают тредмиллинг и удлинение, тогда как фокальные адгезии на границе с ламеллой являются точкой включения миозиновых олигомеров, которые обеспечивают работу молекулярного замка, показанную на панели (Б). Мощные фибриллярные адгезии объединяют несколько филаментов актина, в том числе со смешанной полярностью, и входят в состав сократительного домена тела клетки.

Б –Предполагаемая схема работы молекулярного замка ([54, 63], с изменениями). Когда замок включен (слева), актиновые филаменты иммобилизованы на интегриновых комплексах за счет многочисленных вспомогательных белков-компонентов адгезивных контактов. Прикладываемые к актину силы, создаваемые миозиновыми моторами, преобразуются в тягу (*traction*), приложенную к внеклеточному матриксу, а двунаправленная структура миозиновых олигомеров позволяет одновременно перемещать вперед внутренние филаменты актина и ламеллу. Присоединение мономеров актина к концам иммобилизованных филаментов обеспечивает проталкивание вперед края лидирующей мембраны по механизму Броуновского храповика. Когда замок выключен (справа), продвижение лидирующей мембраны останавливается и миозин обеспечивает ретроградное движение актиновых филаментов, которые внешне выглядят неподвижными из-за тредмиллинга актина.

приложенных на поздних этапах, влияет на судьбу более ранних адгезий и фокальных комплексов. При низкой активности миозина II ранние адгезии более склонны к разборке, чем к созреванию [89, 90]. И наоборот, сила натяжения возрастает с укреплением адгезий, так как она же стимулирует полимеризацию и рост актиновых филаментов, заякоренных на адгезивных контактах [48] (рис. 4А).

Фокальные адгезии, образованные на границе ламеллиподии с ламеллой, созревают внутри ламеллы под перемещающимся сверху телом клетки и превращаются в длинные и стабильные *фибриллярные адгезии* [54,57]. Пусковым сигналом к этому служит натяжение. Оно переключает  $\alpha_5\beta_1$ -интегрин из релаксированного в напряженное состояние, аллостерически усиливая контакты [91]. В этом состоянии интегрин взаимодействует с дополнительным участком на фибронектине, что привлекает киназу фокальных адгезий (ФАК), и запускает вторичную сигнализацию. ФАК фосфорилирует остатки тирозина

в связанных с интегрином белках паксиллине и p130<sup>cas</sup>, создавая участки посадки для Src и других адаптерных белков, содержащих SH2-домены. Считается также, что натяжение вызывает изменение белкового состава адгезивного контакта за счет его частичной деструктуризации и демаскирования новых участков связывания [92].

Динамика адгезивных контактов регулируется малыми ГТФ-азами Rho-семейства. Rac и Cdc42 контролируют полимеризацию актина во фронтальных протрузиях, а Rho регулирует сборку адгезий за счет активации миозина II [93]. Rho-активируемые киназы, ROCKI и ROCKII прямо активируют миозин II, фосфорилируя остаток Ser-19 в его регуляторных легких цепях [94]. Параллельно, Rho-зависимые киназы активируют миозин непрямым образом, фосфорилируя миозин-связывающую субъединицу фосфатазы миозина и ингибируя ее активность [94]. По-видимому, две изоформы ROCK функционируют в разных частях клетки. ROCKI регулирует сборку стресс фибрилл и фокальных адгезий, а ROCKII – микрофиламентов [95].

Классический Ca<sup>2+</sup>/кальмодулиновый путь фосфорилирования и активации миозина II специально предназначенной для этого киназой легких цепей миозина (MLCK) [96] также регулирует адгезии в определенных клетках. Биосенсор к активной MLCK выявляет ее активацию в передней ламелле эпителиальных клеток и отсутствие таковой в хвостовой части [97]. Специфичный ингибитор MLCK нарушает созревание краевых фокальных адгезий и стабильность псевдоподий в фибробластах, тормозя их движение [98]. Однако другой биосенсор, отражающий уровень фосфорилирования Ser-19 легких цепей миозина II, показывает, что этот процесс локализован преимущественно в задней части клетки, но не в передней ламелле [99]. Его ингибирование или удаление Ca<sup>2+</sup> из цитозоля нарушало подтягивание хвостовой части и движение нейтрофилов по адгезивным субстратам, но не влияло на их поведение на неадгезивных поверхностях [100]. Таким образом, совокупность имеющихся данных указывает на второстепенный вклад Ca<sup>2+</sup>/MLCK, по отношению к Rho/ROCK, в регуляцию динамики адгезий и миграцию клеток.

Образование прочных и поляризованных контактов с субстратом может быть не обязательным для клеток, движущихся в трехмерном внеклеточном матриксе. Вместо этого клетки используют протрузии, заполняя ими поры и зазоры в матриксе, закрепляясь в них, а затем заполняя выросты цитоплазмой и подтягивая тело в их направлении [101]. Как показано на амебоидных лейкоцитах и *Dictyostelium*, одни и те же клетки могут адаптировать и переключать способ движения между интегрин-зависимым и независимым [102, 103]. Эти

наблюдения подтверждают гипотезу о том, что разные клетки используют общие элементы подвижности, поочередно переключая актин-зависимый и блеббовидный типы движения [6]. При этом реализуется разная последовательность событий. Блеббовидное движение начинается с сокращения кортикального актомиозина, которое создает гидростатическое давление, достаточное для образования мембранного пузыря спереди клетки и выдавливания в него цитоплазмы. После этого в пузырь поступает актин и регуляторные белки, которые формируют характерную для ламеллиподии сеть актина [103].

#### ПЕРЕМЕЩЕНИЕ ТЕЛА

По сравнению с протрузионной и адгезивной компонентами этот этап движения наименее ясен. Он включает адгезию и сократимость, а также интуитивно ожидаемый механизм использования актина и миозина для развития тянущих усилий по продвижению тела клетки [54]. По-видимому, он во многом аналогичен мышечному сокращению и предполагает «протягивание» актиновых филаментов миозином [104, 105]. Однако важные вопросы остаются пока без ответа, например, из чего состоят и как организованы сократительные единицы, как они прикрепляются и функционируют вместе с адгезивными контактами, наконец, отличается ли перемещение тела в передней и задней частях клетки [97, 98].

Сократительный актомиозиновый аппарат, который участвует в перемещении тела, находится в передней ламелле и отличается от протрузионного аппарата ламеллиподии. Хотя молекулярные детали динамики актина в этих двух компартментах не совсем ясны и дискутируются [106, 107], известно, что миозин II находится в ламелле и отсутствует в ламеллиподии. Кроме того, сильные адгезии образуются на границе этих компартментов и связывают актиновый цитоскелет ламеллы с внеклеточным матриксом [71, 86]. Предполагается, что эти контакты сопрягают протрузионную активность переднего края с транслокацией тела по механизму регулируемого «молекулярного замка» (рис. 4Б) [54, 57, 63]. Когда замок включен, актиновые филаменты неподвижно закреплены на адгезивном контакте. Полимеризация на «тупых» концах актиновых филаментов обеспечивает рост протрузий на лидирующем крае, а натяжение филаментов создает силу по направлению к центру клетки, которая передается через адгезии и преобразуется в тягу, приложенную к внеклеточному матриксу (рис. 4Б, слева). Когда замок выключен, исчезает связь между адгезиями и филаментами актина и начинается ретроградное, миозин-зависимое движение фила-

ментов; при этом рост протрузий прекращается и тянущие усилия не производятся (рис. 4Б, справа). Хотя мало известно о том, как регулируется этот молекулярный замок, винкулин и талин рассматриваются как главные кандидаты в основные регуляторы [54].

С помощью ингибиторного анализа и избирательного выключения экспрессии различных изоформ немышечного миозина II типа было установлено, что этот молекулярный мотор отвечает за перемещение тела клетки [89, 108–111]. По своим свойствам миозин II больше подходит для этого, чем другие молекулярные моторы [112]. Он собирается в филаменты, состоящие из нескольких молекул и способен создавать значительные усилия. Олигомерная организация и наличие двух относительно независимых моторных доменов позволяют миозину II «протягивать» актиновые филаменты, не давая им отрываться и проскальзывать назад. Таким образом, как активность, так и полимеризация миозина II вносят свой вклад в динамику фокальных адгезий и хемотаксис разных клеток [90, 113].

Электронная микроскопия миозина II в изолированном состоянии (см. [114]), и *in situ* [115, 116] показывает, что он образует филаменты, в которых моторные части ориентированы к полюсам. Саркомероподобные олигомеры миозина II наполняют зону ламеллы у фибробластов [115], где они объединяются в лентообразные структуры, вероятно, нужные для сборки стресс-фибрил [116]. Включение таких биполярных олигомеров миозина (или альтернативных им структур с боковой полярностью [114]), в состав нитей актина должно приводить к образованию актомиозиновых пучков (стресс-фибрилл) со смешанной полярностью. Однако при сокращении такие структуры стягивают два своих полюса и практически не дают тяги, необходимой для перемещения клетки. Это предполагает, что миозин II, по-видимому, не включается, а латерально ассоциирует, в виде олиго- или полимеров, с полярными филаментами актина, растущими от интегринов в ламелле. Эти филаменты образуют дорсальные стресс-фибриллы, которые одним концом заякорены на интегрингах, а вторым обращены концом к верхней поверхности клетки [55, 117]. Таким образом, полярные по актину дорсальные стресс-фибриллы могут обеспечивать создание вектора тяги при включенном интегриновом молекулярном замке, так, как это показано на рис. 4Б".

Изнутри к верхней стороне клетки прикреплены поперечные арки – короткие миозин-содержащие стресс-фибриллы – к концам которых могут стыковаться дорсальные [117]. Альтернативно, миозиновые олигомеры могут прямо соединять свободные концы двух дорсальных стресс-фибрилл. В любом случае, результирующие

структуры, «прошитые» миозином так, как это показано на рис. 4Б, должны иметь смешанную полярность актина. Они представляют собой вентральные стресс-фибриллы [117], основной задачей которых является сокращение.

Таким образом, сократительный компартмент ламеллы отличается от остальной части клетки. Он содержит менее плотные актиновые пучки, чем внутренние стресс-фибриллы, имеет другой изоформный состав актина [119] и немышечного миозина [89, 90, 109–111]. Если миозин ПА находится в основном в ламелле и участвует в расплывании, адгезии и приложении силы к адгезивным контактам, то миозин ПВ расположен преимущественно в задней части клетки и обеспечивает ее подтягивание. Различная регуляция этих изоформ миозина [56, 98] обеспечивает их ассиметричное распределение, которое вносит существенный вклад в хемотаксис. Хотя важная роль миозина II в направленной миграции клеток не вызывает сомнения, в литературе есть много разных данных о распределении активной (фосфорилированной) и неактивной (нефосфорилированной) форм миозина II в клетке [99, 108, 118], а также о роли миозина в поддержании направления движения [90, 113, 118].

#### ОТКРЕПЛЕНИЕ И ПОДТЯГИВАНИЕ

Подобно тому как адгезия и перемещение неразрывно связаны друг с другом, подтягивание задней части сопряжено с ее откреплением. Однако если открепление является, по существу, обращением адгезии, то подтягивание и перемещение выполняют одну функцию, используя общий механизм сокращения с участием актина и миозина II. Структуры, обеспечивающие подтягивание, тоже являются стресс-фибриллами, но они более плотные, имеют другую изоформу миозина и иной способ ее регуляции. Сокращение в теле клетки, по-видимому, выполняет другую задачу, чем в ламелле и служит не столько для создания сильной тяги в направлении переднего края, сколько значительных стягивающих усилий, необходимых для открепления субстратных адгезий.

Вентральные стресс-фибриллы являются главными структурами, обеспечивающими отрыв от субстрата адгезивных контактов тела клетки. Встраивание белка зиксина, являющегося маркером зрелых фокальных адгезий [88], начинается их сборку из дорсальных стресс-фибрилл и включение в состав миозина II [55, 117]. Важно, что они содержат актиновые филаменты смешанной полярности, более активную изоформу миозина ПВ и  $\beta$ -изоформу немышечного актина, хотя функциональные особенности последней неясны [119]. Такая

структура обеспечивает этим стресс-фибриллам возможность центростремительного сокращения и стягивания прикрепленных к ним зрелых адгезий.

Вместе с тем, суммарный вектор этого сокращения не равен нулю и направлен внутрь клетки благодаря работе неясных пока механизмов, стабилизирующих центральные адгезии по мере того как периферические ослабляются и разбираются [57]. Киназа фокальных адгезий (ФАК) является ключевым участником нескольких этапов разборки фокальных контактов. Действуя прямо или через тирозиновые киназы Src-семейства, ФАК повышает фосфорилирование остатков тирозина белков адгезий, приводя к их диссоциации и ускоряя циклирование контактов несколькими малопонятными способами [54, 57, 88, 120]. Другие важные механизмы разборки адгезивных контактов включают кальпаин-зависимый протеолиз  $\beta$ -интегринов, талина и других ассоциированных белков [121], а также ассиметричную разборку контактов под действием микротрубочек [86, 87]. Обычно после частичной разборки зрелые задние адгезии эндоцитируют и их компоненты транспортируются в ламеллу по верхней стороне клетки, давая материал для сборки новых адгезий ([61] и ссылки в этой работе).

Интервальная съемка мигрирующих нейтрофилов и клеток *Dictyostelium* часто показывает, что эти клетки эффективно движутся за счет одной лидирующей псевдоподии, фактически волоча за собой хвост. Из этого следует, что протрузионная активность и ассиметричное циклирование адгезивных контактов более важны для движения, чем подтягивание задней части. Действительно, нокаут миозина II не ведет к серьезным дефектам миграции клеток *Dictyostelium*, но влияет на скорость движения в зависимости от силы адгезии [122]. Последнее косвенно указывает на роль открепления задних адгезий, но у слабо адгезирующих клеток этот компонент проявляется слабо. Напротив, он важен для сильно адгезирующих клеток, например, фибробластов, которые часто движутся, оставляя за собой вереницу интегриновых комплексов, отрывающихся от задней мембраны вместе с клеточными адгезиями [87].

## V. НАПРАВЛЕННОЕ ДВИЖЕНИЕ

Направленная миграция требует поляризации, а способность поддерживать полярность определяет способность удерживать направление. Морфологическая поляризация есть следствие внутренней асимметрии в распределении сигнальных молекул и клеточных структур. Внешние стимулы не обязательно вызывают и поддерживают полярность (рис. 1А и В), но вносят существенный вклад и сдвигают равновесие в сторону поляризованных состояний (рис. 1Г). Поляризованные клетки сохраняют возможность изменить направление и делают это чаще в отсутствие, чем в присутствии хемотактических градиентов. Градиенты выступают как внешние направляющие, поддерживая полярность клеток и снижая вероятность смены курса (рис. 1Д). В дополнение к поляризации, зависимой от градиента, нельзя не учитывать исходной поляризации клетки, которая не зависит от внешних стимулов. Ее вклад проявляется из-за сопряженности переходных состояний (см. рис. 1). В некоторых клетках (таких как лейкоциты, имеющие в отсутствие стимуляции округлую форму) вклад исходной поляризации невелик, но в других клетках (например, в фибробластах, которые сильно поляризованы даже в покое) вклад этого фактора очень значителен. Хемотаксис фибробластов требует крутых внешних градиентов [15], вероятно потому, что хемоаттрактанты должны преодолеть и перенаправить исходную полярность клетки, приспособив ее к внешнему градиенту. Как происходит такое преобразование, не совсем понятно, однако предполагается, что внешний градиент управляет поведением уже существующих псевдоподий, но не вызывает образования новых [45].

### ДИНАМИКА ПСЕВДОПОДИЙ

Известное уже более 50 лет, свойство многих клеток двигаться направленно в отсутствие внешних воздействий объясняется явлением «скоррелированного произвольного движения» [3, 123, 124]. Оно связано с тем, что псевдоподии образуются по одной и каждая последующая выдвигается в направлении, близком к положению предыдущей, т.е. коррелирует ориентацию. Обычно новые псевдоподии образуются в основании предыдущей, то слева, то справа от оси «старой» псевдоподии, подобно движениям конькобежца [123, 124]. Когда дочерняя псевдоподия становится основной, остатки родительской втягиваются и направление движения сохраняется. В отсутствие градиента такая динамика псевдоподий поддерживается за счет внутренней поляризации клеток, которая снижает частоту

возникновения новых (латеральных) по бокам клетки или в ее задней части, и стабилизирует разделяющиеся псевдоподии вдоль оси поляризации [45, 125].

В пологих градиентах клетки сохраняют исходную динамику и по-прежнему образуют протрузии спонтанно. Градиент действует перmissive, но не instructive: он постепенно ориентирует движение, подстраивая место возникновения новой протрузии в свою сторону и устанавливая новую ось поляризации [45, 124, 125]. При резкой смене направления градиента клетка плавно изменяет направление, постепенно разворачиваясь к источнику градиента. Это достигается повышением вероятности образования нескольких последовательных псевдоподий только на той стороне родительской, которая обращена к градиенту. Такое поведение напоминает движения конькобежца, делающего разворот на трекe.

В крутых градиентах поведение клеток меняется. Такие градиенты становятся instructive и часто вызывают образование новых псевдоподий. При движении по градиенту новые псевдоподии образуются как непосредственное продолжение предыдущих и клетка движется прямолинейно. Если градиент круто меняет направление, то клетка часто поворачивает путем образования новых псевдоподий, а не делением предыдущих. В какой степени один способ движения превалирует над другим зависит от силы внешнего стимула и исходной оси поляризации [45, 124, 126].

#### РЕГУЛЯТОРНАЯ СТРАТЕГИЯ

В настоящее время существуют две основные гипотезы, которые основаны либо на instructive функции хемоаттрактанта [2, 4, 127], либо на его permissive влиянии на исходную псевдоподиальную активность [45, 125]. Каждая достаточно аргументирована и наилучшим образом объясняет свой аспект одного и того же явления: первая – движение клеток в крутых градиентах, вторая – в пологих.

Первая модель развивает более раннюю теорию биологического формообразования (детали см. в [128]) в отношении вероятности образования последовательных псевдоподий на ограниченном участке мембраны путем локального возбуждения и общего ингибирования, известной под названием LEGI [2, 4, 127]. Ее ключевое положение состоит в том, что существуют два сигнала, один из которых действует сильно, но локально, а второй – слабо, но на большом расстоянии. Первый проявляется только тогда, когда превышает пороговый уровень, создаваемый вторым сигналом. Далее это различие усиливается и поддерживается за счет положительных обратных связей [128].

В отношении хемотаксиса эта модель постулирует, что в клетках есть некий внутренний компас, обеспечивающий навигацию в градиентах. Хемотаксис действует в качестве первичного сигнала, активируя больше рецепторов на той стороне клетки, которая обращена в их сторону. Активация рецепторов ведет к образованию вторичных сигналов внутри клетки: те, которые действуют локально, вызывают образование псевдоподий, а те, которые действуют на большом расстоянии, выступают в качестве «общего ингибитора» [2, 4, 126, 127]. Очевидно, что «общие ингибиторы» должны иметь более высокую скорость диффузии и/или продолжительность жизни, чем активаторы. Пока модель LEGI экспериментально подтверждена только в неполяризованных клетках, но ясно, что поляризация должна вносить важный дополнительный вклад [2] (см. рис. 1).

В клетках *Dictyostelium* хемотаксисические GPCR обеспечивают синтез как ингибиторных, так и активаторных сигналов. В роли общего ингибитора выступает цГМФ, образуемый растворимой гуанилатциклазой (sGC), который подавляет образование латеральных псевдоподий [129]. В клетках млекопитающих функцию цГМФ выполняют цАМФ и Rho-белок, действие которых направлено на регуляцию миозина II и адгезии клеток. Короткоживущий липид фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат (PIP3), который образуется под действием PI3K в ответ на активацию хемотаксисических рецепторов, действует на лидирующей мембране как возбуждающий вторичный сигнал практически во всех клетках [130–133]. Вместе эти сигнальные молекулы (цГМФ/цАМФ, sGC и PIP3) отвечают за ориентацию клеток *Dictyostelium* в градиентах [129]. Кроме них в хемотаксисе клеток *Dictyostelium* и лейкоцитов участвуют рапамициновый комплекс 2 (TORC2) и фосфолипаза A2 (PLA2), которые с большой вероятностью выполняют активирующую функцию [134, 135]. Одновременное подавление этих сигнальных путей в клетках *Dictyostelium* вызывает полный коллапс хемотаксисической системы [129]. Таким образом, модель LEGI дает разумное толкование того, как и с помощью каких сигнальных молекул может разрешаться вопрос о пространственно-временной регуляции хемотаксиса [2, 4], но однозначных экспериментальных доказательств этой модели пока нет.

Другие модели [136, 137] предполагают, что «скоррелированное произвольное движение» может лежать в основе движения клеток в хемотаксисических градиентах. Недавно была предложена «псевдоподиальная» модель хемотаксиса, которая базируется на едином поведении клеток и псевдоподий как в отсутствие внешних стимулов, так и в пологих градиентах [45, 125]. Эта модель рассматривает дви-

жение клетки как подстраивание под внешний градиент, а разделение лидирующей псевдоподии как механизм, управляющий направлением движения. По сути она учитывают вклад внутренней поляризации (рис. 1Б и 1Г) в движение клетки в градиентах (рис. 1Д). В ситуациях, когда эта компонента дает существенный вклад (градиентов нет или они пологие), она доминирует и внешние стимулы оказывают перmissive, ориентирующий эффект. В крутых градиентах доминирует внешняя стимуляция и она становится инструктивной. Даже если клетка поляризована в одном направлении, то крутой боковой градиент вызывает формирование новой псевдоподии и задает другое направления движения. Вопросы, касающиеся сигнальной регуляции хемотаксиса в рамках этой новой модели пока основательно не разработаны. Вероятнее всего, некая комбинация LEG1 и псевдоподиальной модели может наиболее полно объяснить и сигнальные аспекты, и двигательное поведение клеток в отсутствие и в присутствии хемотактических градиентов.

## VI. ХЕМОТАКТИЧЕСКАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

Современное понимание хемотактической сигнализации позволяет сформулировать несколько ключевых положений. (1) Поверхностные *рецепторы регистрируют* внешний сигнал и передают его внутрь клетки. (2) Внешний градиент переводится во *внутренний градиент* сигнальных молекул клетки. *Усиление* происходит на пост-рецепторном уровне. (3) В клетке есть *несколько* сигнальных каскадов, ведущих к хемотаксису. Одного доминирующего каскада нет, все они в разной степени дублируют и влияют друг на друга. (4) Целью передачи сигнала является *поляризация* сигнальных молекул и цитоскелета. (5) Должны существовать механизмы *усиления* внутренних градиентов, контроля *длительности* активации сигнальных каскадов и *адаптации* клеточных реакций к пространственным и временным изменениям внешнего градиента.

Передача сигнала от хемотактических рецепторов до белков, обеспечивающих двигательные реакции, организована очень сходно во многих клетках и включает общие компоненты. Рецепторы передают информацию о внешних сигналах через мембрану к белкам Ras и PI3K – двум основным маршрутизаторам передачи хемотактического сигнала внутри клетки [8, 138, 139]. В амебоидных клетках сигнал далее разделяется на 3 каскада, включающих PIP3, TgC2 и/или sGC (рис. 5). PIP3 является главным усилителем и «дирижером»

двигательного аппарата псевдоподий, а также определяет высокую чувствительность к изменениям градиента [26, 131]. Большинство сигнальных каскадов направлено на малые ГТФ-азы семейства Rho – первичные регуляторы полимеризации актина и активации миозина II. Эти белки распределяются асимметрично, определяя направление поляризации и движения (рис. 5) [73, 140].

Другие направления, пока менее характеризованные, включают MAP-киназы, фосфолипазу A2 (PLA2) (рис. 5А) и фосфолипазу C $\gamma$  (рис. 5Б). Они могут быть специфичны для определенных типов клеток и включаться рецепторами, параллельно PI3K и белку Ras. В фибробластах передача сигнала устроена более просто, но и в этих клетках PIP3 также является основным регулятором [16]. Активация растворимых тирозинкиназ Src и FAK необходима для хемотаксиса фибробластов, так как динамика фокальных контактов важна для мезенхимального типа миграции [6]. Она запускается от рецепторных тирозиновых протеинкиназ RPTK (рис. 5Б) и интегринов, взаимопередача сигналов между которыми также играет важную роль [141]. Фосфолипаза C $\gamma$  регулирует начальные изменения формы фибробластов и развитие тянущих усилий [142]. Независимо от типа клеток, этот каскад ведет к образованию локально действующих липидных (диацилглицерол) и цитозольных (инозитолтрифосфат и Ca<sup>2+</sup>) вторичных посредников общего действия, которые могут действовать по механизму LEG1 и обеспечивать локальную регуляцию Ras и миозина II (рис. 5Б).

Удержание направления движения требует непрерывной подстройки внутренних сигнальных градиентов и их поддержания во времени. Это достигается включением положительных обратных связей. Хорошо известна регуляторная петля, усиливающая и продлевающая образование PIP3 в *Dictyostelium* и лейкоцитах (рис. 6), но ее существование в фибробластах подвергается сомнению [15, 16]. Вместо этого, в хемотаксисе фибробластов вносят критический вклад сигнальные механизмы, связанные с эндоцитозом и эндосомальной сигнализацией [19, 44, 47, 143]. Предполагается наличие нескольких обратных петель регуляции, обеспечивающих контроль актинового цитоскелета и динамику фокальных адгезий [144]. Вероятно, они могут объяснить способ поддержания внутренних градиентов и мест образования новых протрузий.

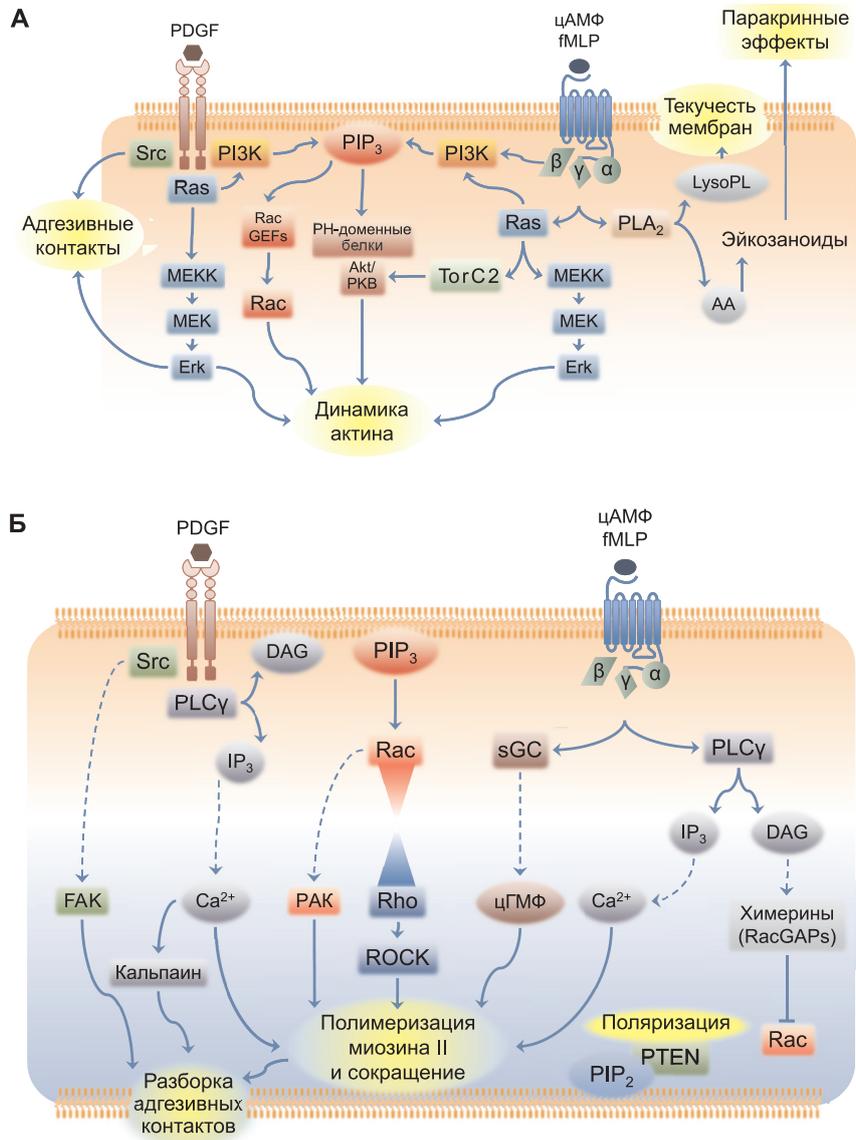


Рис. 5. Хемотактическая сигнализация на переднем (А) и заднем (Б) крае клетки.  
Пояснения к рис. даны на сл. стр.

Рис. 5. Хемотактическая сигнализация на переднем (А) и заднем (Б) крае клетки.

А – Ключевые каскады, запускаемые RPTK в фибробластах (лиганд – PDGF), и  $\beta\gamma$ -комплексом мембранных G-белков, сопряженных с GPCR, в клетках *Dictyostelium* (лиганд – цАМФ) и нейтрофилах (лиганд – формил-метионин-лейцин-фенилаланин, fMLP). Показаны общие компоненты (малые ГТФ-азы Ras и Rac, PI3K/PIP3 модуль, PH-доменные белки, PKB/Akt), регулирующие динамику актина на переднем крае. MAP-киназы активируются в Ras-зависимом каскаде с участием киназ первого уровня (MEKK), второго уровня (MEK) и эффекторных Erk-MAP-киназ. Для хемотаксиса амeboидных клеток критичны рецептор-зависимая PLA2 и Ras-зависимый TorC2. PLA2 образует арахидоновую кислоту (AA) – предшественник эйкозаноидов (лейкотриенов, тромбоксанов и простагландинов), которые обладают паракринным действием, и лизофосфолипиды (LysoPL), которые влияют на жидкостные свойства мембран. TorC2 опосредует PI3K/PIP3-независимую активацию PKB/Akt. Роль PLA2 и TorC2 в хемотаксисе других клеток вероятно, но пока не доказана.

Б – Передача хемотактического сигнала от передних рецепторов на задний край клетки условно показана пунктирными стрелками. Обращенные друг к другу треугольники в центре обозначают антагонизм Rac и Rho. Взаимодействие с PIP2 определяет переход PTEN на заднюю мембрану. Каскад с участием sGC и цГМФ характерен только для *Dictyostelium*. PLC $\gamma$  – фосфолипаза C- $\gamma$ , IP3 – инозитолтрифосфат, DAG – диацилглицерин.

#### РЕЦЕПТОРНЫЙ УРОВЕНЬ

Клетки используют разные рецепторы чтобы распознавать различные хемоаттрактанты. По своей структуре и функциональным свойствам эти рецепторы традиционно делятся на две основные группы. Одна включает серпентиновые рецепторы (GPCR), которые сопряжены с тримерными G-белками. В другую входят рецепторы с одним трансмембранным доменом (RPTK), которые димеризуются при активации и либо обладают собственной тирозинкиназной активностью. По сходству сигнальных механизмов к этой группе можно также отнести аналогичные рецепторы с серин-треониновой киназной активностью (рецептор TGF $\beta$ ), либо привлекающие растворимые тирозиновые киназы для дальнейшей передачи сигнала (рецептор фактора, стимулирующего образование колоний макрофагов/гранулоцитов, GM-CSF). Клетки одного типа предпочитают использовать определенный тип рецепторов для хемотаксиса и связанной с ним механизм передачи сигнала. Например, клетки *Dictyostelium*, лейкоциты млекопитающих и гематопoэтические клетки задействуют для этого GPCR [9, 131]. Напротив, RPTK служат основными хемотактическими рецепторами у фибробластов, мезенхимальных стромальных клеток, краевых клеток яичника дрозофилы, гладкомышечных, эпителиальных и раковых клеток [17–23, 145]. Навига-

ционные рецепторы аксонов также относятся преимущественно к RPTK [9]. Общей чертой хемотактических рецепторов является использование малых G-белков суперсемейства Ras и PI3K для повышения уровня PIP3 на лидирующей мембране (рис. 5).

В клетках *Dictyostelium* хемотактические рецепторы проводят сигнал через  $\beta\gamma$ -субъединицы Gi-подгруппы тримерных G-белков, с которыми они сопряжены. В этих клетках обнаружено 11 изоформ субъединиц Ga и по одной изоформе G $\beta$  и G $\gamma$  субъединиц; с хемотактическими рецепторами в основном связаны Ga2 [2, 26, 126]. В нейтрофилах хемотактические GPCR сопряжены с Ga1 и Ga12/13 [146]; они передают сигналы в передний и задний отдел клеток, соответственно. По-видимому, Ga1 действует через  $\beta\gamma$  субъединицы, направляя сигнал к PIP3 и Ras на переднем крае, тогда как Ga12/13 запускает Rho и образование миозин II-содержащих филаментов в задней части [26, 146]. Как в клетках *Dictyostelium*, так и в нейтрофилах комплекс G $\beta\gamma$  абсолютно необходим для хемотаксиса (см. [147] и ссылки в этой работе).

Хемотактические рецепторы остаются равномерно распределенными на поверхности клеток при поляризации в процессе хемотаксиса *Dictyostelium* [148] и нейтрофилов [149]. Количество связанных с рецепторами лигандов отражает внешние пологие градиенты, фосфорилирование хемотактических рецепторов практически не влияет на хемотаксис этих клеток (детали см. [2, 26]). При хемотаксисе активированные рецепторы быстро диффундируют в плоскости мембраны без заметной кластеризации [150]. Слитая с белком GFP, G $\beta$ -субъединица также показывает слабую поляризацию в клетках *Dictyostelium*, которая соответствует внешнему градиенту [147]. Использование техники FRET показало, что активные тримерные G-белки и их  $\beta\gamma$ -субъединицы распределяются в мембране пологим передне-задним градиентом, отражая крутизну внешнего градиента и степень насыщения рецепторов [151, 152]. Таким образом, на уровне указанных рецепторов происходит только частичная поляризация хемотактического сигнала, а его главное умножение происходит после рецепторов и связанных с ними тримерных G-белков.

При хемотаксисе, запускаемом ростовыми факторами, связывание лиганда ведет к димеризации и самофосфорилированию рецепторов. Это создает участки связывания модульных доменов сигнальных и адапторных белков. PDGF-BB является основным хемоаттрактантом для фибробластов. Он связывается с  $\beta$ -рецепторами PDGF и вызывает их самофосфорилирование по остатку Тир-857. Это приводит к связыванию и активации PI3K и белка Ras, образованию PIP3, и активации Rac, Src, Ras-GAP и фосфолипазы C- $\gamma$  (рис. 5A) [14, 152,

153]. Ras и PI3K играют ведущую роль в сигнализации от RPTK, также как и от GPCR [153]. Это означает, что PDGF активирует те же ключевые эффекторы, что и лиганды хемотактических GPCR. Есть и другие сигнальные молекулы, которые активируются только RPTK. Многие из них главным образом связаны с пролиферацией, но также служат и дополнительными регуляторами хемотаксиса [44, 154].

Не совсем ясно, перемещаются ли RPTK и другие однодоменные хемотактические рецепторы на передний край клеток при направленной миграции. Рецептор эпидермального фактора роста (EGF) равномерно распределялся по мембране в клетках аденокарциномы, мигрирующих в сторону EGF [155], но PVR – рецептор граничных клеток дрозофилы, подобный рецепторам PDGF и VEGF, – собирается на переднем крае [20]. Это означает, что внутренний градиент может отчасти создаваться на уровне рецепторов. Тем не менее основной перевод внешнего градиента во внутренний происходит все же на пост-рецепторном уровне.

#### МЕМБРАННЫЙ УРОВЕНЬ

Хемотактические рецепторы обеспечивают поляризацию клетки, и исходящие от рецептора каскады можно разделить на две группы. Одни каскады активируют события на переднем крае клеток, стимулируют динамику актина и формирование адгезий (рис. 5А), а другие активируют миозин II, сборку сократительных стресс-фибрилл и ослабление адгезий на заднем крае (рис. 5Б).

Основное направление хемотактического сигнала проходит через малую ГТФ-азу Ras, которая является общим регулятором и распределителем сигнала в передне-заднем направлении клетки. На переднем крае Ras активирует мембранный PI3K/PIP3 каскад и цитозольные TorC2 и MAP-киназный каскады. Помимо Ras, на переднем крае мембранный липид PIP3 локально усиливает и распределяет сигнал, а фосфолипаза A<sub>2</sub> модифицирует мембранные липиды, изменяя физические свойства мембраны и образуя вторичные сигнальные молекулы (рис. 5А).

#### ГТФ-аза Ras

Суперсейство Ras белков включает большое число консервативных малых ГТФ-аз, которые разделяются на 6 семейств по структурной гомологии и функциональному сходству [156]. Семейство Ras включает сам Ras, а также Rap, Ral и Rheb, которые, по сути, являются сигнальными коммутаторами клетки. Наиболее обширное семейство Rab-белков отвечает за транспорт везикул, сортировку эндосом и

организацию на них вторичных сигнальных комплексов. Arf-белки регулируют везикулярный транспорт в эндоцитозном и секреторном направлениях, а также между ретикулумом и аппаратом Гольджи. К семейству Rho-белков относятся регуляторы актинового цитоскелета Rho, Rac и Cdc42. ГТФ-азы Rap участвуют в транспорте РНК и белков между ядром и цитоплазмой. К шестой группе относятся нетипичные ГТФ-азы Miro, которые содержат  $Ca^{2+}$ -связывающий домен EF-руки, находясь в митохондриях и регулируют целостность этих структур [156]. Интересно, что *Dictyostelium* содержит многочисленные Ras, Rab и Arf белки, включая Rap и Rac, но не имеет гомологов Ral, Rho и Cdc42 [30]. В этих клетках обнаружено более десяти Ras белков, гомологичных трем основным H-, N- и K-Ras-белкам млекопитающих. Возможно, такое многообразие связано с выполнением тех функций, которые позже закрепились за Rho и Cdc42 в клетках млекопитающих. Это может объяснить ряд сигнальных отличий у *Dictyostelium* по сравнению с лейкоцитами [138].

Нарушение функции Ras сильно влияет на хемотаксис как *Dictyostelium* [157], так и фибробластов [158]. Как правило, повышенная активность Ras связана с усилением миграции, а введение в клетку доминант-негативных мутантов Ras – с подавлением. Любопытно, что гиперактивация Ras вызывает дефекты направленного движения [130, 157, 158]. Ключевая роль Ras в хемотаксисе нейтрофилов однозначно не доказана. Не исключая ее, можно предположить, что в результате эволюции часть функций Ras перешла к Rac и Rho, которые в нейтрофилах активируются от рецепторов, сопряженных с Gi и G12/13 тримерными G-белками, соответственно [146].

Основная задача Ras состоит, по-видимому, в проведении сигнала к ГТФ-азам Rho-семейства. При этом Ras не передает сигнал непосредственно к Rho-белкам, а использует PI3K/PIP3 в качестве промежуточного этапа для усиления активирующего сигнала в передней части клетки [138] (рис. 5A). О том, что усиление происходит после Ras свидетельствует равномерное распределение этого белка вдоль плазматической мембраны клеток при хемотаксисе, отражающее распределение рецептора. Хотя активный Ras имеет предпочтение к переднему краю, его градиент также соответствует крутизне внешнего градиента и активации рецептора [157].

#### PI3K/PIP3 модуль

Ферменты обширной группы PI3K образуют PI(3,4,5)P3 из PI(4,5)P2, фосфорилируя 3'-положение инозитольного кольца. Они делятся на 3 класса, среди которых рецептор-зависимыми являются PI3K класса I

[153]. Эти PI3K представляют собой гетеродимеры, включающие одну из 4 возможных изоформ каталитической субъединицы p110 и одну из нескольких p50–55/p85 регуляторных субъединиц. В зависимости от каталитической субъединицы, PI3K подразделяются на класс IA (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  от p110 $\delta$ ) и класс IB (p110 $\gamma$ ), и часто называются по типу каталитической субъединицы, например, PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  и  $\gamma$  [153].

Ras-зависимый механизм активации PI3K дублирован прямой активацией этого фермента непосредственно на рецепторах (в случае RPTK) или G $\beta$  субъединице (в случае GPCR). PI3K переходят в участки плазматической мембраны, обращенные к внешнему градиенту, формируя при этом более крутой внутренний градиент [130, 159]. Активация происходит после связывания регуляторной субъединицы PI3K с  $\beta$ -субъединицей G-белка и Ras-белком и ее взаимодействия с каталитической субъединицей, которая заякоривается на мембране при помощи специальной N-концевой последовательности [130]. В случае RPTK, регуляторная субъединица p85 прямо связывается с активированным рецептором своим SH2-доменом и взаимодействует с Ras своим RBD-доменом, что усиливает активацию. Затем регуляторная субъединица взаимодействует с каталитической p110 и формирует активный холофермент [153].

Из пяти PI3K класса I, присутствующих в *Dictyostelium*, PI3K1, PI3K2 и PI3K3 наиболее важны, а первые две абсолютно необходимы для хемотаксиса [130, 132, 160]. Тройной нокаут генов PI3K1/2/3 приводит к тяжелым нарушениям скорости движения и полярности клеточек *Dictyostelium* [132]. В клетках млекопитающих для хемотаксиса наиболее важна  $\gamma$ -изоформа PI3K, хотя PI3K $\beta$  и PI3K $\delta$  также вносят свой вклад [131]. Макрофаги и нейтрофилы мышей, нокаутированных по гену p110 $\gamma$ , не способны образовывать PIP3 в ответ на стимуляцию хемоаттрактантами, стабилизировать и поддерживать лидирующий край и, как следствие, малоподвижны [161, 162].

Способность экзогенных мембран-проницаемых аналогов PIP3 вызывать поляризацию и движение клеток является прямым доказательством ключевой роли PIP3 в хемотаксисе [7, 163]. PIP3 привлекает из цитозоля и специфично связывает белки, имеющие в составе домен плекстриновой гомологии (PH-домен). Этот домен присутствует у многих факторов обмена гуаниловых нуклеотидов Ras-белка – главного регулятора динамики актина, а также у белков – прямых регуляторов полимеризации актина (рис. 5А). Кроме того, его содержат и другие участвующие в хемотаксисе белки, механизмы их действия пока не до конца ясны.

Градиенты PIP3 наблюдаются в живых клетках с помощью экспрессируемых в них химер GFP-подобных флуоресцентных белков, слитых с PH-доменами разных белков. Градиенты PIP3 обнаружены в направленно мигрирующих клетках *Dictyostelium* [160,164], нейтрофилах [162, 165] и фибробластах [13]. Они направлены строго вдоль внешних хемотактических градиентов и показывают, что усиление и распределение сигнала идет на уровне образования PIP3. Внутренние градиенты PIP3 значительно более круты, чем внешние градиенты, а также градиенты активных рецепторов и Ras-белка в клетках. В нейтрофилах и *Dictyostelium* PIP3-сигнал усиливается примерно на порядок и требует включения обратной регуляторной петли с участием PI3K и актинового цитоскелета [8, 146, 163]. Эта петля отсутствует в фибробластах, внутренние градиенты PIP3 у которых не так круты и зависят только от рецептор-активируемой PI3K [13, 15].

Липидные фосфатазы PTEN и SHIP1 являются функциональными антагонистами PIP3-каскада и играют важную роль в миграции амебoidных клеток и фибробластов [130, 166–169]. PTEN гидролизует фосфат в 3'-положении инозитольного кольца преимущественно в PIP3 и, в меньшей степени, в PIP2, тогда как SHIP1 отщепляет 5'-фосфат. Как и PI3K, PTEN обладает двойной специфичностью, т.е. использует в качестве субстрата как белки, так и липиды [170].

*Pten* – один из наиболее часто мутированных генов опухолевых супрессоров во многих опухолях [170]. Его выключение ведет к нарушению направленности движения клеток, связанному с дезориентацией лидирующих псевдоподий и повышенной частотой образования боковых псевдоподий [166]. При этом ненаправленная подвижность может возрастать. Так, не содержащие PTEN фибробласты мигрируют с повышенной скоростью, которая снижается при реэкспрессии PTEN дикого типа [168]. Напротив, в хемотаксисе нейтрофилов участвует не PTEN, а SHIP1 [169]. Нокаут SHIP1 снижает скорость движения нейтрофилов в 5 раз, но не изменяет направленности [169]. Ни в фибробластах, ни в нейтрофилах не исследованы изменения внутриклеточной локализации PTEN и SHIP1 при стимуляции, что могло бы прояснить указанные различия.

В нестимулированных клетках *Dictyostelium* PI3K находится в цитозоле и быстро перемещается на передний край при стимуляции. В покое, PTEN равномерно распределена вдоль плазматической мембраны клеток, взаимодействуя с ней за счет 15-членной N-концевой последовательности, связывающей PIP2. Переводя PIP2 в PIP3, PI3K уменьшает число участков связывания PTEN на переднем крае. Поэтому при стимуляции PTEN «уходит» с лидирующего края

в цитозоль и затем скапливается в задней части клетки [130,166]. Там она гидролизует PIP<sub>3</sub>, повышая уровень PIP<sub>2</sub> и создавая себе дополнительные участки связывания [167]. Именно так физическое распределение PI3K и PTEN усиливает внутренний градиент PIP<sub>3</sub>. Далее этот градиент поддерживается за счет положительной обратной связи с участием малой ГТФ-азы Ras и полимерного актина [8, 171].

Нет сомнения в том, что PI3K и PIP<sub>3</sub> играют исключительно важную роль в передаче сигнала и направленной миграции многих клеток. Однако исследования последних лет показывают, что этот направляющий механизм не является единственным. Полное подавление PI3K оказывает сильный, но лишь частичный эффект на хемотаксис клеток *Dictyostelium*, причем только в пологих, но не в крутых градиентах [172], не выключает направленную миграцию макрофагов в животных [161], и практически не влияет на миграцию Т-лимфоцитов [133]. Даже полное выключение всех 5 изоформ PI3K и фосфатазы PTEN в *Dictyostelium* не до конца блокирует хемотаксис [173]. Это означает, что существуют параллельные рецептор-зависимые механизмы узнавания внешних градиентов и передачи сигнала.

#### Фосфолипаза A<sub>2</sub>

Фосфолипаза A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) действует параллельно PI3K/PIP<sub>3</sub> при хемотаксисе амебодных клеток [135, 172, 174] (рис 5А). Этот механизм пока мало изучен и до конца неясно, активируется ли PLA<sub>2</sub> напрямую хемотаксическими рецепторами или зависит от Ras-белка [139].

PLA<sub>2</sub> удаляет ацильный остаток из 2-го положения глицерольного остова глицерофосфолипидов, который часто является арахидоновой кислотой, и оставляет лизофосфолипид. Большинство клеток, в том числе лейкоциты, содержат 3 основных класса PLA<sub>2</sub>: секреторные (sPLA<sub>2</sub>), Ca<sup>2+</sup>-зависимые цитозольные (cPLA<sub>2</sub>) и Ca<sup>2+</sup>-независимые цитозольные (iPLA<sub>2</sub>). Только cPLA<sub>2</sub> и iPLA<sub>2</sub> считаются сигнальными, причем cPLA<sub>2</sub> очень специфично гидролизует остаток арахидоновой кислоты, активируется низкими концентрациями Ca<sup>2+</sup> и фосфорилированием под действием протеинкиназы С [174]. Однако сомнительно, что cPLA<sub>2</sub> регулирует направленность движения, скорее всего, этот фермент участвует в регуляции псевдоподиальной активности и скорости перемещения. Добавление арахидоновой кислоты к cPLA<sub>2</sub>-дефицитным клеткам *Dictyostelium* восстанавливает их хемотаксис [135], что говорит о том, что функция cPLA<sub>2</sub> связана с ненаправленным действием арахидоновой кислоты, а не лизофосфолипидов. В лейкоцитах cPLA<sub>2</sub> находится в цитоплазме и при стимуляции перемещается на эндоплазматический ретикулум, а не на

лидирующую мембрану [175]. Мутанты PLA2 теряют способность разветвлять лидирующие псевдоподии и беспорядочно образуют новые латеральные псевдоподии [129]. В результате клетка сбивается с курса и перестает удерживать направление.

Арахидоновая кислота переводится в активные эйкозаноиды под действием циклооксигеназы, липоксигеназы или цитохром р450-зависимой эпоксигеназы, которая представляется вероятным участником хемотактической сигнализации с участием сPLA2 [174]. Ее продукты, также как и сама арахидоновая кислота, вызывают выход  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо и повышают уровень  $Ca^{2+}$  в цитозоле [139, 176].  $Ca^{2+}$  нужен для миграции лейкоцитов [100] и вносит вклад в хемотаксис *Dictyostelium*, не являясь критическим регулятором [135, 172]. Он активирует миозин-зависимую сократимость в задней части клеток [7, 100], однако следует подчеркнуть, что в активации миозина II не меньшую роль играют и другие механизмы.

Напротив, iPLA2 не специфична по отношению к 2'-ацильной группе и в основном использует фосфатидную кислоту в качестве субстрата. В отличие от сPLA2, хемотаксис iPLA2-дефицитных клеток восстанавливается при добавлении лизофосфатидной кислоты (LPA), которая и действует как интермедиат [174]. Долгое время считалось, что iPLA2 постоянно активна и не регулируется, однако, именно она рассматривается сейчас как регулятор направления и скорости миграции клеток [174, 135, 175, 172]. MCP-1, основной хемоаттрактант моноцитов, вызывает перемещение iPLA2 из цитозоля на плазматическую мембрану, накопление iPLA2 в лидирующих псевдоподиях и ее колокализацию с малой ГТФ-азой Cdc42, совпадающие с поляризацией клетки [175].

LPA и структурно сходный с ней сфингозин-1-фосфат (S1P) являются стимуляторами миграции и сигнальными компонентами хемотактических каскадов многих клеток, включая стимулируемый хемокинами хемотаксис лейкоцитов и PDGF-зависимую миграцию фибробластов [174, 176]. Клетки содержат ряд рецепторов LPA, которые относятся к GPCR, сопряженным с  $G_{q/11}$ ,  $G_{j/0}$  и  $G_{12/13}$  белками [176]. Считается, что они ауто- или паракринным образом поддерживают миграцию клеток, возможно, с помощью рецептор-зависимой активации PLA2. Последние исследования показывают, что LPA и ее рецепторы направляют сигнал в заднюю часть клеток, вызывая фосфорилирование и активацию миозина II [177] с участием малых ГТФ-аз Rho-семейства [176].

Наконец, потенциально важным и пока не исследованным механизмом действия PLA2 может быть локальное изменение жидкостных свойств мембраны за счет образования лизофосфолипидов, обла-

дающих детергент-подобными свойствами. Сходную активность проявляют и полиненасыщенные жирные кислоты, такие как арахидоновая кислота. Они изменяют вязкость и вызывают локальные искривления мембран, в норме участвуя в созревании и отрыве внутриклеточных везикул для их транспорта к аппарату Гольджи и от него, а при инфекции – отпочковывании вирус-содержащих везикул [178]. Не исключено, что локальное снижение вязкости внешней мембраны при активации PLA2 может сходным образом вызывать образование мембранных протрузий при направленной миграции. Локализация iPLA2 в участках псевдоподиальной активности [175] отвечает этому условию. Кроме того, sPLA2 образует главным образом лизофосфатидилхолин, наиболее сильно повышающий текучесть мембран. Имея в основном внутриклеточную локализацию, sPLA2 может частично переходить на плазматическую мембрану, специфически связываясь с p47<sup>phox</sup> субъединицей НАД(Ф)Н-оксидазы и регулировать образование активных форм кислорода (АФК) [179]. АФК и их более стабильный метаболит, пероксид водорода, рассматриваются сейчас как потенциальные регуляторы направленной миграции клеток (см. последний раздел).

Таким образом, PLA2 наряду с PI3K/PIP3 играет важную роль в хемотаксисе. Вместе с тем, даже одновременное выключение PI3K и PLA2 не блокирует хемотаксис полностью: тройной мутант *Dictyostelium* по PLA2 и двум основным изоформам PI3K сохраняет способность распознавать градиент цАМФ [135, 180]. Это означает что существуют резервные механизмы хемотаксиса, способные взять на себя функцию первых двух. Они реализуются на цитозольном уровне каскадной передачи сигнала.

#### ПРИМЕМБРАННЫЙ УРОВЕНЬ

Отличительной чертой хемотаксиса является привлечение к мембране цитозольных белков, содержащих РН-домены, их связывание и активация сигнальными липидными молекулами. Условно эти белки можно разделить на две группы: (1) белки, локально активирующие динамику и полимеризацию актина вблизи мембраны, и (2) белки, инициирующие цитоплазматические каскады. Первый механизм определяет места формирования протрузий; его эффекторами служат факторы нуклеации и полимеризации актина. Второй механизм менее изучен, он может давать разветвление сигнала в цитозоле и передавать его внутрь и на задний край клетки.

РН-домен (pleckstrin homology domain) состоит примерно из 120 аминокислот и входит в состав ряда сигнальных молекул и цитоскелетных белков, функции которых так или иначе связаны с мембраной

[181]. Разные PH-домены обнаружены в составе многих белков, таких как факторы обмена гуаниловых нуклеотидов малых ГТФ-аз, фосфолипаза C, киназы PKB/Akt и  $\beta$ -адренергических рецепторов ( $\beta$ ARK), тирозиновые фосфатазы группы Vtk, а также их субстраты, адаптерные и каркасные белки. PH-домены отличаются по своей специфичности и способны различать фосфоинозитиды, несущие фосфат в различных положениях инозитольного кольца ( $PI(3,4)P_2$ , или  $PI(4,5)P_2$ , или  $PI(3,4,5)P_2$ ).

#### *Активация динамики актина*

Малые ГТФ-азы Rac и Cdc42 контролируют активность факторов нуклеации и полимеризацию актина на переднем крае мигрирующих клеток. Эти белки содержат PH-домены, но активируются разными фосфолипидами. Cdc42 и WASP активируются после связывания  $PIP_2$  и белка-партнера. Таким партнером для Cdc42 является фактор обмена нуклеотидов, а для WASP – активированный Cdc42 [63, 77]. Активность WASP значительно превышает активность всех остальных факторов нуклеации [63]. Поскольку Cdc42 и WASP не требуют накопления  $PIP_3$  для активации, они могут обеспечить первую фазу быстрой, но транзитной, полимеризации актина, диссоциируя с мембраны по мере перехода  $PIP_2$  в  $PIP_3$ .

Cdc42 считается главным инициатором образования филоподий и регулятором полярности клеток [73, 138, 140]. В лейкоцитах активацию Cdc42 под действием хемоаттрактантов опосредуют G $\beta\gamma$ -субъединицы и сигнальный комплекс, содержащий Cdc42, его фактор обмена гуаниловых нуклеотидов  $PIX\alpha$  и p21-активируемую киназу (PAK) 1 [182]. PAK1 служит каркасным белком и рекрутирует в комплекс активный  $PIX\alpha$ , связывая его специальный домен. В составе этого комплекса  $PIX\alpha$  ускоряет обмен гуаниловых нуклеотидов в Cdc42. Помимо запуска актин-полимеризующей машины, Cdc42 активирует PAK1, формируя таким образом петлю положительной обратной связи (см. рис. 6).

Активация Rac хемотактическими рецепторами более длительна, так как требует  $PI3K$ -зависимого образования  $PIP_3$ . Именно  $PIP_3$  привлекает к мембране факторы обмена нуклеотидов Rac, большинство которых содержит PH-домены [181, 183]. Далее Rac запускает локальную полимеризацию актина на переднем крае, активируя все известные факторы нуклеации: формины [77], Scar/WAVE [77,80] и Spire [78, 79]. Кроме Rac, в мембранной локализации и активации Scar/WAVE и Spire прямо участвует  $PIP_3$  [63, 79]. Построенный, в основном, на адаптерных белок-белковых взаимодействиях, этот способ передачи сигнала высокоспецифичен, но не может дать эффективного умножения, нужного для включения большого числа актин-

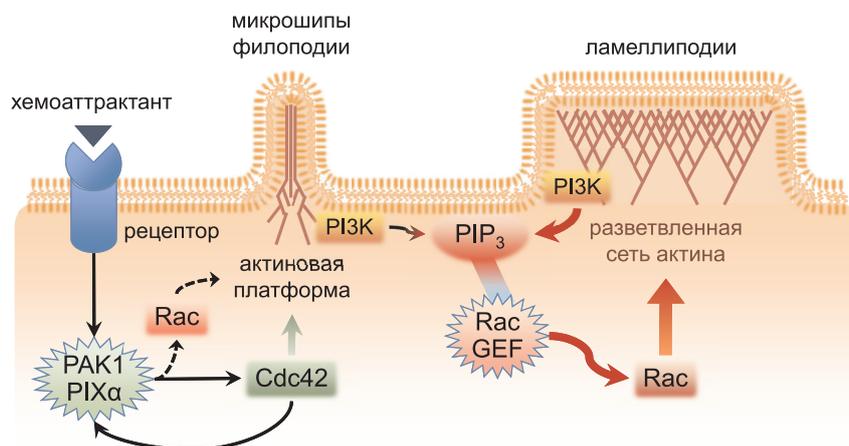


Рис. 6. Обратная регуляция полимеризации актина на лидирующем крае.

Показаны две регуляторных петли, описанные к настоящему времени в амебидных клетках. *Слева*, обратная петля быстрой активации Cdc42 с участием PAK1/PIXα ведет к образованию первичной актиновой платформы, которая может быть предшественником микрошпилей и филоподий. Она фиксирует PI3K и обеспечивает локальное образование PIP<sub>3</sub> в этом микрокомпарменте, инициируя образование второй, автокаталитической обратной петли, показанной *справа*. Через факторы обмена гуаниловых нуклеотидов PIP<sub>3</sub> активирует ГТФ-азу Rac и образование разветвленной ламеллиподиальной сети актина. В обоих случаях полимеризация актина необходима для активации PI3K, но PIP<sub>3</sub> участвует только в работе второй петли.

регулирующих молекул. Такое умножение достигается за счет петель положительной обратной связи, использующих ферменты с высокой каталитической силой и числом оборотов. В ответ на активацию Rac эти механизмы вступают в действие и поддерживают его активность, создавая условия для массовой полимеризации и роста актиновых филаментов (см. рис. 6). За ветвление этих филаментов и формирование дендритной сети актина отвечает Arp2/3-комплекс; он является главной мишенью WASP и Scar/WAVE [80, 85].

Различные адаптерные белки также играют важную роль в активации динамики актина. Рецептор-зависимые адаптеры Nck и Grb2 могут прямо активировать WASP [85], а также вместе с Erk1/2 и Src-киназами активировать кортактин – регулятор комплекса Arp2/3 [63]. В активации и/или локализации Rac участвует субстрат инсулинового рецептора – белок IRSp53, вызывающий образование филоподий и ламеллиподий [85]. Вместе эти белки могут обеспечивать вторую фазу активации WASP и поддерживать активность WASP и Arp2/3 на время формирования протрузий.

Существует по крайней мере 3 изоформы РАК-киназ, которые довольно неразборчиво активируются разными гомологами Ras и Cdc42 [74]. Это свойство лежит в основе другого сигнального механизма повышения динамики актина путем инактивации кофилина. В нефосфорилированном виде кофилин стимулирует дробление и деполимеризацию филаментов актина, а его фосфорилирование под действием LIM-киназы уменьшает деполимеризующую активность кофилина и приводит к полимеризации актина [65]. Активация LIM-киназы достигается ее фосфорилированием РАК-киназами. Очевидно, что указанный механизм отличен от функции РАК1 в  $\alpha$ P1X-зависимой активации Cdc42.

Ras и Cdc42 также играют важную роль в миграции фибробластов при активации RPTK [145, 184, 185]. С помощью флуоресцентного биосенсора, регистрирующего активацию Ras в движущихся фибробластах, был обнаружен градиент активного Ras в направлении лидирующего края, где он концентрировался в области ламеллиподий [186]. Нокаут гена [187] и подавление экспрессии Ras [184] нарушали образование ламеллиподий и снижали скорость движения, однако не вызывали серьезных дефектов направленности. Клетки сохраняли способность различать градиент PDGF и двигаться вдоль него, в основном используя тонкие протрузии типа филоподий [187]. С помощью регулируемой экспрессии Ras в фибробластах было продемонстрировано, что снижение активности Ras подавляет образование латеральных протрузий и вызывает переход от хаотического движения к направленному, P13K-зависимому хемотаксису [185]. В совокупности, эти результаты подтверждают функцию Ras в локальной регуляции динамики актина и образовании ламеллиподий. Они показывают, что при умеренной активации Ras концентрируется на лидирующем крае, вместе с P13K создавая участки повышенной протрузионной активности, но при высоком уровне активности дезориентирует движение, вызывая формирование боковых псевдоподий. В полном согласии с предполагаемой ролью Cdc42 в создании первичных участков полимеризации актина и направления поляризации клетки (см. также рис. 6), подавление экспрессии Cdc42 сильно нарушало направленность движения фибробластов, но не хаотическую миграцию в отсутствие хемоаттрактанта [184, 185]. Однако проверка наличия в фибробластах такого механизма, который показан на рис. 6, пока не привела к успеху [13, 15]. Возможно, он имеет другую организацию в этих клетках.

Интересно, что в клетках *Dictyostelium* хемоаттрактант также вызывает две волны периферической полимеризации актина, которые

совпадают с двумя фазами перемещения на мембрану белков, содержащих РН-домены. При этом только вторая волна зависит от активности PI3K [188]. В отличие от лейкоцитов и мезенхимальных фибробластов млекопитающих, эти клетки не имеют генов Cdc42 и Rho-белка [30]. Считается, что функцию этих белков выполняют некоторые из многочисленных изоформ Ras, которые выступают как функциональные гомологи Cdc42 и Rho в *Dictyostelium* [138]. Несмотря на отличие в деталях, они также обеспечивают двухфазную полимеризацию актина в этих клетках.

#### РН-доменные белки

PI3K служит вторым после Ras распределителем сигнала на переднем крае движущейся клетки. Запуская накопление PIP3, этот фермент усиливает сигнал от хемотактических рецепторов, переводя его в крутой градиент молекул-мишеней PIP3 внутри клетки. Помимо факторов обмена нуклеотидов белка Ras, существуют и другие белки, содержащие РН-домены, которые узнают и специфически связывают продукт действия PI3K – 3'-фосфорилированный PIP3 [153]. К ним относятся протеинкиназы PKB/Akt и PDK1, растворимая тирозинкиназа Vtk (компонент сигнального комплекса рецепторов В-лимфоцитов), факторы обмена гуаниловых нуклеотидов Arg-белков из суперсемейства Ras (регуляторы динамики цитоскелета и везикулярного транспорта), а также разнообразные адаптерные и каркасные белки (компоненты MAP-киназных и других сигнальных каскадов, например, Grb2) [170, 153, 181].

Изолированные РН-домены сохраняют свою PIP3-связывающую активность и, генетически слитые с флуоресцентными белками, в последнее время широко используются для детекции и количественной оценки формируемых внутри клетки хемотактических градиентов. Наибольшее распространение получили такие химерные конструкции, как РНАkt-GFP, содержащая РН-домен протеинкиназы В/Akt [13, 160, 163, 165, 169, 185, 187, 189], а также РНPhd-GFP и РНСrac-GF, содержащие РН-домены специфических белков *Dictyostelium* [130, 164, 166, 171, 188, 190]. Эти транслокационные сенсоры требуют использования прижизненной флуоресцентной конфокальной микроскопии или эванесцентно-волновой, известной также как TIRF-микроскопия [13]. Экспрессированные в нейтрофилах и *Dictyostelium*, эти сенсоры показывают, что PIP3 формирует градиент примерно на порядок круче, чем внешний градиент хемоаттрактанта [165].

У человека есть более 300 генов, кодирующих белки как минимум с одним РН-доменом [181]. Не все они узнают только 3'-фосфори-

лированный PIP3, некоторые из них могут связывать и PI-(3,4)-P2, и PI-(4,5)-P2, причем с разным сродством и избирательностью [170, 181]. Например, PH-домен PTEN связывает PI-(4,5)-P2 – продукт ее же реакции; этот домен играет важную роль во внутриклеточных перемещениях PTEN при хемотаксисе [167]. Аналогично, PH-домен фосфолипазы C-γ преимущественно связывает свой субстрат – тот же PI(4,5)P2, и почти не узнает 3'-продукты PI3K. Напротив, PH-домен PKB/Akt узнает только продукты PI3K, но он чуть более селективен к PI(3,4)P2, чем к PI(3,4,5)P3, а похожий PH-домен киназы Btk высоко специфичен только к PI(3,4,5)P3 [170, 181]. Такие свойства PH-доменов требуют осторожности при выборе адекватного репортера исследуемого сигнального каскада, в том числе при анализе различных PIP3-активируемых сигнальных ветвей.

PKB/Akt считается одной из главных мишеней PI3-киназного каскада [191]. Ее активация тесно связана с плазматической мембраной и требует связывания PH-домена PKB/Akt с PIP3. Фосфорилирование двух участков необходимо для полной активации PKB/Akt, поэтому необходимы два дополнительных фермента – фосфоинозитид-зависимые киназы 1 (PDK1) и 2 (PDK2) [192]. PDK1 транслоцируется на мембрану за счет связывания своего PH-домена с PIP3 и фосфорилирует остаток Thr-308 в активационной петле PKB/Akt. Природа PDK2 долгое время оставалась неизвестной, видимо из-за того, что в разное время были обнаружены несколько ферментов с такой активностью. Однако только недавно стало ясно, что основной PDK2 является комплекс TorC2, который фосфорилирует остаток Ser-473 в гидрофобном участке PKB/Akt [193]. Функции PDK2 могут также выполнять интегрин-зависимая киназа (ILK), киназа, активируемая р38 MAP-киназами (MAPKAPK2), и ДНК-зависимая киназа (DNA-PK) [192]. Таким образом, PKB/Akt является не только мишенью каскада PI3K, но и акцептором других сигнальных путей.

Функции PKB/Akt в клетках разнообразны. Описано более 100 ее потенциальных субстратов [191, 194]. PKB/Akt связана с регуляцией метаболизма, роста, деления и выживания клеток, а также ангиогенеза [191, 192]. Важная роль в регуляции активности эндотелиальной NO-синтазы, транспорта глюкозы и метаболизма гликогена делает PKB/Akt одним из кандидатов во внутриклеточные посредники диабета 2 типа и метаболического синдрома [194].

Участие PKB/Akt в миграции клеток до недавнего времени считалась сомнительным [191]. Однако в последнее время было сделано несколько важных наблюдений, указывающих на роль PKB/Akt в хемотаксисе клеток *Dictyostelium* [160], макрофагов [195], миграции

фибробластов [189] и эндотелиальных клеток [196]. Было обнаружено несколько механизмов действия РКВ/Akt, связанных как с активацией динамики актина на переднем крае, так и с регуляцией миозина II на заднем крае.

Наиболее подробный анализ показал, что механизм действия РКВ/Akt на переднем крае связан с актин-связывающим белком гирдином [197]. В клетках млекопитающих РКВ/Akt фосфорилирует остаток, расположенный в PIP2-связывающем участке гирдина. Вследствие этого гирдин диссоциирует от мембраны, но сохраняет способность связываться с актином и участвует в создании его ламеллиподиальной сети. Нокдаун гирдина снижал скорость миграции клеток, а его ре-экспрессия восстанавливала миграцию [197]. Передача сигнала от РКВ/Akt в заднюю часть клеток происходит, по-видимому, за счет активации регулирующей миозин II PAK-киназы. Скорее всего существуют и другие пока неизвестные механизмы действия РКВ/Akt.

Исследования *Dictyostelium* показали возможность активации РКВ/Akt комплексом TorC2 без участия PI3K и PIP3 [198, 199]. Идентификация TorC2, фосфолипазы A2 [135, 172], а также гуанилатциклазы и цГМФ [200] как самостоятельных сигнальных модулей в клетках *Dictyostelium* сыграла критическую роль в формировании современной точки зрения о существовании нескольких параллельных механизмов регуляции хемотаксиса [2, 125, 129, 180].

#### *Антагонизм Rac и Rho*

Взаимный антагонизм Rac/Cdc42 и Rho представляет собой одну из наиболее интригующих загадок внутриклеточных сигнальных систем. То, что такой механизм существует, известно давно [201], но вопрос, как он реализуется полностью не решен до сих пор. Хотя этот механизм не точно локализован в клетке (рис. 5Б), его можно условно отнести к примембранному уровню.

Ингибирование Rho-зависимых процессов вызывает такие изменения, которые наблюдаются при активации Rac, и наоборот, ингибирование Rac вызывает изменения, характерные для активации Rho [201]. Среди многих проявлений, антагонизм Rac и Rho ярко заметен в динамике адгезивных контактов [93], что указывает на его вероятную роль в сопряжении хемотактических сигналов с регуляцией клеточной адгезии. Так, Rac, но не Rho, отвечает за образование ранних фокальных комплексов на ведущем крае клетки, но их последующий переход в фокальные контакты в зоне ламеллы связан с переключением на Rho-зависимые механизмы [93]. Такая феноменология позволила сформулировать идею о наличии в клетке

пространственно и функционально разделенных Ras- и Rho-доменов [93]. Их функции не ограничены регуляцией адгезивных свойств клетки. Они также реализуются в формировании и регуляции активности протрузионного и сократительного компартментов клетки ([201] и ссылки в этом обзоре). Хемотактические сигналы действуют через Ras и Rho, сопрягая эти домены и выстраивая их в направлении движения, что обеспечивает рост/закрепление передних протрузий и подтягивание тела клетки, соответственно.

#### КАСКАДНЫЙ УРОВЕНЬ

Каскадный уровень имеет цитоплазматическую локализацию и обеспечивает проведение сигнала к отдаленным от рецепторов мишеням. На переднем крае действует одна сигнальная ветвь с участием TorC2 и PKB/Akt (рис. 5А). Вторая ветвь направляет сигнал в задний и боковые отделы клетки, умножая его за счет растворимых вторичных посредников и протеинкиназ. Ее цель состоит в активации и сборке молекул миозина II с образованием сократимых структур, обеспечивающих перемещение тела клетки (рис. 5Б). Наконец, третья группа сигналов диффузно распределена в цитозоле, связывая и координируя процессы на переднем и заднем крае.

#### *TorC2*

В клетках *Dictyostelium* Ras запускает еще один важный для хемотаксиса каскад с участием белкового комплекса TorC2, действуя параллельно каскадам, использующим PIP3 [134,199]. Основу этого комплекса составляет протеинкиназа – мишень действия рапамицина (Tor), которая принимает сигналы от рецепторов инсулина и других факторов роста, а также от внеклеточных аминокислот, выступающих питательными веществами [193, 202, 203]. В эукариотических клетках Tor образует два основных комплекса, многокомпонентный состав которых определяют входящие в них белки раптор (комплекс TorC1) или риктор (комплекс TorC2) [203, 203]. В отличие от TorC1, риктор-содержащий TorC2 нечувствителен к рапамицину.

TorC2 регулирует поляризацию актина и рост в клетках дрожжей [202]. В клетках млекопитающих он фосфорилирует Ser473 в Akt/PKB и регулирует актиновый цитоскелет [193, 203, 204]. В клетках *Dictyostelium* субстратом TorC2 выступает PKBR1, которая в отличие от классической Akt/PKB (PKBA у *Dictyostelium*), не требует PIP3 для связывания с мембраной, а взаимодействует с ней за счет N-концевого миристоильного якоря. Активация PKBR1 под действием TorC2 не требует второго фосфорилирования по Thr308 и, таким образом, оказывается независимой от PIP3/PI3K [134, 199].

Комплекс TorC2 млекопитающих содержит как минимум 5 белков: TOR, LST8, AVO1, AVO2, и AVO3/риктор [203, 204]. AVO1 и AVO3/риктор являются ортологами двух белков *Dictyostelium*, Rip3 (Ras interacting protein 3) и Pia (Pianissimo). Rip3/AVO1 содержит в своей структуре Ras-связывающий домен (RBD), который, по-видимому, обеспечивает активацию TorC2 под действием Ras. Нокаут генов LST8, Rip3/AVO1, или Pia (AVO3/риктор) в клетках *Dictyostelium* приводит к серьезным дефектам хемотаксиса, включая потерю полярности, скорости и направленности движения [198]. Более того, при этом нарушается полимеризация миозина II и синтез цАМФ, необходимого для межклеточной передачи сигнала. Так как оба этих процесса локализованы в задней части клеток, делается вывод, что сигнальные функции TorC2 связаны с регуляцией процессов не только на переднем крае клетки, но и в ее задней части. Считается, что такое распределение сигнала осуществляет PKB/Akt – основная мишень TorC2 [2, 199].

#### Аденилатциклаза и цАМФ

Аденилатциклазный механизм используется в клетках *Dictyostelium* для межклеточной передачи информации о направлении движения [25]. Аденилатциклаза, находящаяся на заднем крае мигрирующих клеток, производит цАМФ во внешнюю среду. По каким-то причинам цАМФ не выполняет в этих клетках функции внутриклеточной сигнальной молекулы, а лишь служит лигандом хемотактических рецепторов для клеток-соседей, направляя их движение. Возможно, это связано с приобретением внутриклеточного аденилатциклазного механизма на более поздних этапах эволюции, поскольку некоторые виды *Dictyostelium*, не использующие цАМФ как хемоаттрактант, по-прежнему не применяют его и для внутриклеточной сигнализации [200].

Напротив, в лейкоцитах млекопитающих аденилатциклаза опосредует еще один важный механизм аксиального распределения сигнала и поляризации клеток, не указанный на рис. 5 [205]. Этот механизм реализует принцип функционального разветвления сигнала от GPCR, сопряженного с Gs-белками, и задействует внутриклеточный цАМФ как вторичный посредник [205]. Его отличительной чертой является участие факторов обмена гуаниловых нуклеотидов, напрямую активируемых цАМФ (Eras), и малого G-белка Rap1, в также цАМФ-зависимой протеинкиназы A. Участвующие в нем каскады локализованы в цитозоле. Один ведет от цАМФ к активации интегринов и передних адгезий путем последовательной активации Eras и Rap1, а второй – к ослаблению задних адгезий и активации миозина II с участием протеинкиназы A [205, 206]. Наличие такого механизма и

его роль в фибробластах пока не исследованы, но вполне ожидаемы, так как Ерас опосредует миграцию гладкомышечных клеток и образование неоинтимы в поврежденных сосудах [207].

Любопытно, что в клетках *Dictyostelium* функционирует похожий, но мало изученный каскад с участием малых ГТФ-аз Ras и Rap1, который запускается рецепторами цАМФ [206,208]. Предполагается, что он действует через киназу тяжелых цепей миозина (см. ниже) и направляет миозин II в заднюю часть клетки [2, 138]. Удивительно, но он, вероятно, использует цГМФ вместо цАМФ, и цГМФ-связывающий белок GbpC в качестве функционального аналога Ерас. В отличие от клеток млекопитающих, для *Dictyostelium* характерна цГМФ-зависимая регуляция структуры и активности миозина II [113, 209].

#### Гуанилатциклаза и цГМФ

Среди исследованных на данный момент клеточных моделей, по-видимому, только *Dictyostelium* использует в хемотактической сигнализации внутриклеточный гуанилатциклазный механизм для регуляции миозина II. Анализ этого механизма позволяет сделать несколько важных обобщений. (1) Этот механизм активируется хемотактическими рецепторами и задействует малую ГТФ-азу Ras-семейства. (2) Он не является ведущим и работает в комбинации с другими сигнальными каскадами. (3) Он обеспечивает две функционально разных ветви сигнала, одна из которых локализует растворимую гуанилатциклазу на переднем крае клетки, а вторая обеспечивает цГМФ-зависимую регуляцию миозина II в теле клетки. (4) Его действие отчетливо проявляется только в мигрирующих клетках: этот механизм поддерживает лидирующие псевдоподии, подавляя образование задних и боковых псевдоподий, то есть, он вряд ли отвечает за поляризацию клетки, а лишь поддерживает ее.

Хемоаттрактант цАМФ действует через Gα2βγ комплекс, вызывая быстрое увеличение цГМФ и хемотаксис [200]. цГМФ образуется мембранной или растворимой (sGC) гуанилатциклазой, при этом только последняя опосредует большинство хемотактических реакций, вызывая формирование филаментов и активацию миозина II [180]. цГМФ связывается с одним из четырех уникальных цГМФ-связывающих белков (GbpC), который имеет лейцин-богатую последовательность, Ras-домен, эффекторный MAPKKK-домен, а также два цГМФ-связывающих участка, способных регулировать обмен нуклеотидов в Ras-домене [209]. GbpC связывает цГМФ с высоким сродством и активирует Ras-домен, который в свою очередь активирует MAPKKK домен. Этот домен гомологичен первой киназе

МАР-киназного модуля, которая вероятно запускает сходный каскад, вызывающий полимеризацию миозина II в задней части клеток [209]. Интересно, что цГМФ-связывающие белки GbpA и GbpB являются цГМФ-фосфодиэстеразами, а цГМФ, по-видимому, является их низко-аффинным аллостерическим активатором.

Одновременное выключение PI3K/PIP3 модуля и PLA2 блокирует хемотаксис только исходно неполяризованных клеток *Dictyostelium*, но уже поляризованные клетки остаются устойчивыми к совместному выключению PI3K/PIP3, PLA2, и даже TorC2, мигрируя эффективно в направлении цАМФ [180]. Дополнительное выключение гена sGC полностью блокирует хемотаксис поляризованных клеток, а ре-экспрессия sGC восстанавливает их хемотаксис [180]. Это означает, что механизм с участием sGC/цГМФ важен, но функционирует не отдельно, а вместе с другими каскадами.

Гуанилатциклазный механизм вызывает два относительно независимых события: переход sGC на передний край и ее колокализацию с полимерным актином, а также образование цГМФ [210] (рис. 5Б). sGC каким-то пока неясным образом повышает вероятность образования каждой последующей псевдоподии в основании предыдущей, а цГМФ обеспечивает локализацию и полимеризацию миозина II в хвостовой части, подавляя образование латеральных и задних протрузий [180]. Таким образом, sGC и цГМФ не определяют исходной полярности клеток *Dictyostelium*, но ориентируют их «по ходу движения» в пологих градиентах [129].

### Миозин II

Активация миозина II вносит критический вклад в поляризацию клеток. Ее механизм, по-разному реализуемый в таких эволюционно далеких организмах, как *Dictyostelium* и млекопитающие, дает наглядный и элегантный пример использования появляющихся альтернатив для оптимального решения похожих задач. Все миозины II типа имеют общую схему строения и состоят из двух крупных (тяжелые цепи) и двух пар малых (легкие цепи) белков. Тяжелые цепи формируют на N-конце два глобулярных моторных домена (головки), которые взаимодействуют с актином и осуществляют АТФ-зависимое сокращение [104, 105], а на C-конце соединяются в длинную суперспираль (хвост), которая отвечает за ассоциацию отдельных молекул в филамент [114]. Принцип работы миозина II подразумевает, что его «активация» включает как усиление ферментативной активности отдельных мономеров, так и их сборку в филаменты [113]. В неактивном состоянии немышечные миозины II находятся в мономерной конформации, ингибированной внутримолекулярными

взаимодействиями. При этом хвостовая суперспираль образует изломы и ее дистальный конец заворачивается в сторону моторных доменов [112]. В такой «свернутой» форме латеральная ассоциация суперспиральных хвостов невозможна, а связывание головок с актином затруднено, вследствие чего АТФ-азная активность миозинового мотора низка.

«Свернутая» конформация миозина II *Dictyostelium* поддерживается за счет фосфорилирования трех остатков треонина в дистальной части хвостовой суперспирали [211]. Эти остатки фосфорилируют три киназы тяжелых цепей миозина: МНСК-А, МНСК-В и МНС-РКС, причем каталитический домен первых двух не похож ни на один из традиционных Ser/Thr- или Tyr-киназ. Механизм активации МНСК-А и МНСК-В неизвестен; предполагается, что он основан на самофосфорилировании. Ситуация с МНС-РКС еще более запутанная: считалось, что она является продуктом слияния генов диациглицеролкиназы и протеинкиназы С, чьи домены были в ней обнаружены, и активируется с участием цГМФ [211]. Однако последние исследования показали, что этот вывод ошибочен из-за неверного прочтения гена МНС-РКС. На самом деле геном *Dictyostelium* кодирует независимую диациглицеролкиназу, которая каким-то пока неясным образом участвует в хемотаксисе, возможно, активируя МНСК-А (подробнее см. [113]). Фосфатаза тяжелых цепей миозина II обнаружена, но она, по-видимому, не регулируется [113]. Таким образом, в клетках *Dictyostelium* МНСК-А, МНСК-В и соответствующие фосфатазы, видимо, конститутивно активны, и обеспечивают фоновый уровень фосфорилирования тяжелых цепей миозина II, за счет которого примерно 50% молекул миозина находится в мономерном состоянии.

Наиболее вероятно, что основной механизм сопряжения хемотактических рецепторов и миозина II в *Dictyostelium* связан с действием РАК-киназы [211]. РАК имеет типичный p21-связывающий домен, которым она связывает один из Ras-белков, а также специальные последовательности, за счет которых она перемещается в участки полимеризации миозина II (рис. 5Б). У *Dictyostelium* РАК не фосфорилирует миозин II прямо, а фосфорилирует и ингибирует все его МНСК-киназы [211]. Клетки, нокаутированные по гену РАК, имеют низкий уровень миозиновых филаментов, который не меняется при активации хемотактических рецепторов. Поведение этих клеток аналогично тем, которые нокаутированы по миозину II.

Кроме того, миозин II *Dictyostelium* фосфорилируется киназой легких цепей миозина (MLCK-A) по остатку Ser13 регуляторных цепей, который соответствует остатку Ser19 регуляторных цепей миозина млекопитающих [211]. Активность MLCK-A опосредованно

зависит от цГМФ, который, по-видимому, действует через цГМФ-зависимую протеинкиназу. Активность MLCK-A не зависит от  $Ca^{2+}$ , а фосфорилирование Ser13 не влияет ни на полимеризацию миозина II, ни на его актин-активируемую АТФ-азу; оно лишь немного повышает активность полимерного миозина II. Точечный мутагенез подтвердил, что фосфорилирование Ser13 не влияет на функции миозина II в *Dictyostelium* (см. [211]).

В клетках млекопитающих фосфорилирование является ключевым событием в активации миозина II, но регулируется другим способом и протекает исключительно по остатку Ser19 регуляторных легких цепей [112]. Это фосфорилирование дестабилизирует «свернутую» конформацию, и одновременно вызывает сборку молекул миозина II в филаменты и активацию его моторной функции. Фосфорилирование легких цепей осуществляют две основные киназы [98]. Одна является классической MLCK, активируется  $Ca^{2+}$ -кальмодулином и использует только миозин II в качестве субстрата [96]. Другая фосфорилирует не только миозин II, но обеспечивает основную регуляцию миозина II в немышечных клетках. Этот фермент прямо активируется Rho-белком и известен как Rho-киназа ROCK [94]. Две изоформы ROCK, различным образом распределенные в клетке, выполняют сходные, но независимые функции [95], возможно, регулируя разные изоформы миозина II [110]. Важно, что их активация во многом определяется внутриклеточной локализацией Rho-белка, который действует в задней части клеток и в адгезивных контактах, тем самым обеспечивая локальную активацию миозина II в тех компартментах, где наиболее необходима сократительная активность (рис. 5Б). Кроме того, ROCK фосфорилирует и ингибирует фосфатазу, дефосфорилирующую остаток Ser19 миозина II, усиливая активацию миозина II.

Итак, независимо от того, на каком эволюционном этапе и как произошло переключение способа регуляции миозина II с цГМФ/РАК-зависимого на Rho-зависимый, оно стало значительным событием, которое существенно увеличило эффективность этого механизма. Селекция, видимо, шла в нескольких направлениях – на повышение эффективности механизмов передачи сигнала (антагонизм Rho и Ras, локализация Rho в задней части клетки), фосфорилирования миозина II (активация киназ и подавление фосфатазы), а также на уровне одиночных молекул (двойной эффект фосфорилирования).

#### *Другие пути*

*Erk1/2* ветвь MAP-киназ является классической мишенью Ras [7,14,145]. Она состоит из трех протеинкиназных модулей, MEKK, MEK и их конечной мишени, Erk1/2 (рис. 5А). В случае

RPTK, этот MAP-киназный каскад запускается связыванием адаптерных белков Grb2 и/или Shc с тирозинкиназным рецептором и последующей активацией Ras. В случае GPCR активация Ras происходит за счет его привлечения из цитозоля Gβγ комплексом. Erk1/2 фосфорилирует множество субстратов в клетке, в основном принимая участие в пролиферативном ответе. Ее роль в миграции, видимо, связана с регуляцией адгезивных контактов. Активная Erk1/2 транспортируется в ранние фокальные адгезии при активации интегринов; в этом процессе участвуют растворимая тирозинкиназа Src, миозин II и MLCK [212]. Функция Src в регуляции адгезии и миграции фибробластов общеизвестна, в этих клетках Src запускается непосредственно хемотаксическими RPTK. Ввиду ненаправленного характера действия роль MAP-киназ и Src в детекции градиентов и определении направления движения клеток маловероятна, но они могут вносить существенный вклад в общую миграцию клеток. Что касается других ветвей MAP-киназных каскадов, таких как p38 и JNK MAP-киназы, то они устроены аналогичным образом и их роль в хемотаксисе достаточно противоречива [7].

$Ca^{2+}$  не играет принципиальной роли в хемотаксисе, но в зависимости от природы клеток он вносит различный вклад как в двигательную, так и в сигнальную компоненту. Например, он имеет важную сигнальную функцию в конусе роста нервов [9], но играет меньшую роль при детекции градиентов в других клетках.  $Ca^{2+}$  является вторичным посредником общего действия и, так же как и MAP-киназы, действует достаточно неспецифично. Хемоаттрактанты вызывают увеличение внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , но его внутренний градиент очень пологий. Считается, что  $Ca^{2+}$  важен для миграции нейтрофилов на адгезивных субстратах, поскольку модулирует функции интегринов [100]. В амeboидных клетках  $Ca^{2+}$  участвует, в основном, в регуляции активности миозина II в задней части клетки [7]. Фибробласты рассматриваются как клетки, наиболее близкие к конусу роста по значимости  $Ca^{2+}$ -сигнализации [9]. Действие  $Ca^{2+}$  опосредовано кальмодулином и активацией MLCK. Фосфорилируя и активируя миозин II в ламелле, MLCK обеспечивает сокращение и подтягивание тела клеток [98].  $Ca^{2+}$  может также вызывать активацию кальпаина, внося вклад в открепление заднего края [121].

**Фосфолипаза C-γ** по разным данным выполняет важную функцию в регуляции миграции клеток. Ее роль наиболее заметна в фибробластах [14, 142, 145] и не очень выражена в амeboидных клетках [139, 180]. Механизм действия фосфолипазы C-γ связан с образованием мембранного диацилглицерида и растворимого инозитол-

трифосфата, вызывающего мобилизацию  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (рис. 5Б). Образующийся диацилглицерид может играть важную роль в сигнализации от фосфолипазы C- $\gamma$ , обеспечивая взаимодействие с белками, имеющими липид-связывающий С1 домен [213]. Классическими представителями таких белков являются протеинкиназа С и химерины – единственные пока известные факторы, обладающие Ras-GAP активностью, направленной на инактивацию Ras-белка [213]. Участие химеринов в хемотаксисе не выяснено, но они являются потенциальными ингибиторами Ras на заднем крае клеток и регуляторами антагонизма Ras и Rho, что согласуется с влиянием фосфолипазы C- $\gamma$  на ассиметричную морфологию клеток [142].

**Микротрубочки** также могут регулировать антагонизм Ras и Rho и поляризацию клеток [38, 39, 86, 214]. Хотя точно не показано, что тубулиновый цитоскелет тесно связан с восприятием, обработкой и проведением хемотактических сигналов [138], он однозначно участвует в регуляции динамики адгезивных контактов и, таким образом, общей подвижности клетки (детали см. в обзорах [38, 86, 87]). Растущие микротрубочки захватываются и стабилизируются адгезивными контактами, но тормозят их развитие и провоцируют их разборку. Действие микротрубочек во многом связано с регуляцией актинового цитоскелета так, что их деполимеризация вызывает активацию Rho-белка и стабилизацию актин-миозинового цитоскелета, а ре-полимеризация приводит к активации Ras-белка. Вероятно, используемый механизм включает обратные связи, так как миозин II поддерживает динамический баланс актинового и тубулинового цитоскелета [109].

## VII. ОБРАТНЫЕ СВЯЗИ

Идеи о необходимости и большой значимости обратных связей в регуляции цитоскелета, поляризации и подвижности клеток многочисленны и давно обсуждаются [54, 59]. К настоящему времени не вызывает сомнений тесная взаимосвязь протрузионной, адгезивной и сократительной активности клеток [6, 40], в основе которой лежат механизмы обратной связи. В отношении хемотаксиса регуляция путем образования обратных связей изучена в меньшей степени [8], но совершенно очевидно, что фокусирование и усиление сигнала на переднем крае клетке, а также его поддержание и развитие адаптивных реакций к изменениям внешнего стимула, являются неотъемлемой частью хемотактической сигнализации.

## ОБРАТНЫЕ ПЕТЛИ

На примере клеток *Dictyostelium* отчетливо виден двухфазный характер изменения динамики актина на переднем крае, отражающий сигнал, приходящий от хемотактических рецепторов (подробнее см. [26, 188, 190]). Первая быстрая фаза появления РН-доменных белков на периферии клетки сменяется длительной фазой их накопления в ограниченных участках плазматической мембраны. В течение первой фазы, нечувствительной к действию ингибиторов PI3K, клетка сжимается и теряет полярность, а во второй фазе начинает выдвигать псевдоподии, образование которых блокируется ингибиторами PI3K. Эти изменения четко совпадают с двумя фазами полимеризации актина, происходящей в этих участках.

Можно предположить, что включение механизма обратной связи определяет двухфазный характер динамики актина (см. рис. 6). Первая фаза инициируется непосредственно рецепторами и сразу включает малые ГТФазы Cdc42 и Rac [138, 182]. На этой стадии нет значительных компонентов усиления сигнала, так как она обеспечивается в основном за счет белок-белковых взаимодействий, но в ней участвует PAK1 киназа, которая дает некоторое усиление сигнала пока не до конца ясным образом [182]. Результатом этой быстрой первой волны активации является формирование локальной актиновой платформы (рис. 6), необходимой для организации обратной регуляторной петли с участием полимерного актина и PI3K/PIP3.

В нейтрофилах Cdc42 действует как организатор короткоживущих полимеров актина [215], которые являются вероятными кандидатами для такой платформы. Эти структуры могут быть предшественниками микрошипов и филоподий, но их развитие требует дополнительных регуляторов, таких как белки Eln/VASP, IRSp53, фасцин, кофилин и формины [53]. Однако сами по себе они не способны формировать разветвленную сеть актина, характерную для ламеллиподий. Это становится возможным только в присутствии Rac-белка [215] и большого числа регуляторных молекул, запускающих нуклеацию, полимеризацию и ветвление актина [52, 62, 73, 81]. Для активации Rac нужен PIP3, поскольку он рекрутирует на мембрану ряд факторов обмена гуаниловых нуклеотидов, содержащих РН-домены [183].

Массированное образование PIP3 достигается за счет функционирования петли обратной связи и прихода второй волны активации динамики актина. Наличие петли обратной связи с участием PI3K и полимерного актина было показано в клетках *Dictyostelium* [159, 171, 190] и нейтрофилах [146, 163, 215, 216]. Умножение сигнала PIP3 происходит за счет киназной активности PI3K, а актин закрепляет

эту петлю в участках формирования ламеллиподий (рис 6). Вторая волна сигнала к полимеризации актина идет от рецептор-зависимой активации PI3K/PIP3 каскада и привлечение из цитозоля факторов обмена гуаниловых нуклеотидов Rac, содержащих PH-домен.

Такая модель позволяет объяснить две волны активации полимеризации актина, запускаемые аттрактантом, причем только вторая зависит от целостности полимерного актина, и то лишь частично [8, 188]. Первая волна полимеризации актина не зависит от активации PI3K и, следовательно, устойчива к ингибиторам этого фермента [188], тогда как вторая волна зависит от активации PI3K. Вторая фаза полимеризации актина и образования ламеллиподий/ псевдоподий (но не филоподий), полностью зависит от активации Rac [215] и при этом равномерное (без градиента) добавление хемоаттрактанта или экзогенного PIP3 вызывает появление очагов PIP3 и его самоподдерживающееся накопление, ведущее к активации Rac и повышению динамики актина [163, 190]. Такой механизм может обеспечить миграцию клеток *Dictyostelium* с нокаутированными G $\beta$  $\gamma$ -субъединицами в отсутствие градиента [171].

Аналогичный механизм может поддерживать природную полярность и способность некоторых клеток к движению в отсутствие хемоаттрактанта. Наиболее ярким примером являются фибробласты, движение которых в отсутствие внешних стимулов [217] и в градиентах [218] зависит от локальных всплесков PIP3, которые каким-то образом динамически и стохастически связаны, что обеспечивает им время жизни, сопоставимое с протрузионной динамикой [219]. Отсутствие в этих клетках актин-зависимой обратной положительной петли предполагает наличие иных способов локального поддержания длительности хемотактической сигнализации. Например, активированные рецепторы факторов роста удаляются с поверхности с помощью эндоцитоза, но могут поддерживать или даже организовывать новые сигнальные платформы на эндосомах [143, 220]. Кроме того, рецептор-зависимая активация мембранной НАД(Ф)Н-оксидазы с участием PI3K и Rac приводит к образованию свободных радикалов [221], которые могут поддерживать активность сигнальных каскадов.

#### ЭНДОЦИТОЗ

Эндоцитоз рецепторов играет важную роль в PDGF-зависимой миграции фибробластов [47]. Он включает образование комплекса рецепторов PDGF с белком DOCK4, адаптерным белком Grb2 и динамином-2. DOCK4 является фактором обмена гуаниловых нуклеотидов Rac1-белка и участвует в миграции лимфоцитов, фагоцитозе и опухолевом росте. В мигрирующих фибробластах

DOCK4 взаимодействует с Grb2 и локализуется на лидирующем крае за счет связывания PIP3 своим PH-доменом. Он специфически активирует Rac1, но не Rho, Cdc42 или Rap, и не влияет на профиль активации ERK1/2 MAP-киназ и PKB/Akt под действием PDGF. Динамин-2 (молекулярный мотор, который осуществляет отрыв клатрин-покрытых везикул от мембраны) связывается с активным рецептором PDGF и обеспечивает эндоцитоз всего комплекса. Внутриклеточный трафик рецепторов регулируется малыми ГТФазами Rab и вносит критический вклад в миграцию клеток [222]. В мигрирующих клетках наблюдается поляризация DOCK4 [47], клатрина [223] и эндосомального транспорта [222] в направлении движения, а рецепторы дольше остаются фосфорилированными в эндосомальном компартменте.

Аналогично, активация и эндоцитоз рецепторов EGF и PVR (аналог рецептора PDGF) необходимы для миграции краевых клеток в процессе оогенеза у дрозофилы [19, 222]. Отсутствие белков, опосредующих ранние этапы их эндоцитоза (*Cbl*, *Sprint* и *Hrs*), нарушает локализацию рецепторов и тирозинового фосфорилирования на лидирующем крае и направленную миграцию клеток [19].

Таким образом, функция эндоцитоза в миграции клеток может не ограничиваться эндосомальным транспортом интегринов и мембранных липидов на передний край клеток, как это предполагалось ранее [61]. Данные о сигнальной функции эндоцитоза обозначают потенциально новый механизм регуляции хемотаксиса. Поступающие в отдельный клеточный компартмент интернализированные хемотактические рецепторы оказываются устойчивыми к «выключению» и поддерживают сигнальную активность на протяжении 30–40 минут – времени, достаточного для формирования псевдоподий у фибробластов [47]. Вопрос о том, функционирует ли такой механизм в амебоидных клетках, обладающих быстрой псевдоподиальной динамикой, остается неисследованным.

#### НАД(Ф)Н-ОКСИДАЗА

Взаимодействуя с другим механизмом, эндоцитоз может увеличивать время пребывания рецептор-зависимых сигнальных каскадов в активном состоянии. Таким механизмом у фибробластов может быть Ras-зависимая активация мембранной НАД(Ф)Н-оксидазы и локальное внутриклеточное накопление пероксида водорода [224, 225]. В настоящее время  $H_2O_2$  рассматривается как сигнальная молекула, обладающая всеми характеристиками классического вторичного посредника. Основной механизм действия  $H_2O_2$  связан с инактиваци-

цией сигнальных тирозиновых фосфатаз, однако, идентифицированы и другие мишени  $H_2O_2$ .

Мембранный комплекс НАД(Ф)Н-оксидазы содержит два липид-связывающих компонента –  $gp91^{phox}$  (Nox2 или его гомологи) и  $p22^{phox}$ , а также несколько регуляторных белков, приходящих из цитозоля при рецептор-зависимой активации НАД(Ф)Н-оксидазы. В случае классической НАД(Ф)Н-оксидазы плазматической мембраны ими являются  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ , и малая ГТФ-аза Ras. Они связывают  $gp91^{phox}/p22^{phox}$  и активируют перенос электронов с НАД(Ф)Н на молекулярный кислород [226]. Образующийся супероксид-радикал является предшественником активных форм кислорода (АФК), роль которых в регуляции физиологических функций клеток подробно рассмотрена в ряде обзоров [226–228]. Стимуляция клеток различными факторами (PDGF, EGF, TNF- $\alpha$  или IL-1 $\beta$ ) вызывает быструю активацию НАД(Ф)Н-оксидазы и увеличение уровня свободных радикалов внутри клетки. В этом участвуют Ras, PI3K, Rac-GEFs и Ras [221, 229]. Супероксид-радикал спонтанно или под действием дисмутазы быстро дисмутирует в более долгоживущий  $H_2O_2$ . Пероксид водорода не является радикалом и поэтому более стабилен и менее активен, что сильно сужает спектр его потенциальных мишеней.

Были описаны многочисленные эффекты АФК и  $H_2O_2$  на внутриклеточную передачу сигнала (подробнее см. [230]). АФК усиливают активацию ERK1/2 и каскадов стресс-активируемых MAP-киназ, а также фосфорилирование PKB/Akt и Src при стимуляции RPTK. Это часто сопровождается увеличением уровня и/или времени фосфорилирования рецепторов. Экзогенный  $H_2O_2$  повышает тирозинное фосфорилирование в разных типах клеток, а каталаза, которая разрушает  $H_2O_2$ , устраняет этот эффект.

$H_2O_2$  действует на белки-мишени путем обратимого окисления тех остатков цистеина, которые в клетке преимущественно ионизированы [224, 228]. Тирозинные фосфатазы являются наилучшими кандидатами для таких реакций, так как они содержат консервативную последовательность Cys-(Xxx)<sub>5</sub>-Arg в активном центре. В этом микроокружении, входящие в нее SH-группы Cys часто бывают диссоциированы и служат мишенью действия  $H_2O_2$  [224]. К таким белкам относятся PTP-1B (основная фосфатаза RPTK) [231] и PTEN (фосфатаза PIP3) [232, 233]. Кроме этих фосфатаз, имеющих прямое отношение к хемотаксису,  $H_2O_2$  вызывает активацию кофилина – основного регулятора динамики актина, – действуя на адаптерный белок 14-3-3 и, опосредованно, фосфатазу кофилина слингшот [234]. Большое число работ, пожалуй наилучшим образом суммированных Sroka & Madeja [235], указывают на участие АФК и  $H_2O_2$  в миграции

клеток. Однако механизмы действия  $H_2O_2$  и его внутриклеточные мишени при хемотаксисе не изучены.

Окисленные цистеины восстанавливаются обратно высокоактивными пероксиредоксинами, а пероксид нейтрализуется каталазой, хотя последняя находится в пероксисомах и свободно не доступна. Топология мембранной НАД(Ф)Н-оксидазы предполагает, что образующий супероксид поступает из клетки наружу и несколько работ это подтверждают (см. [226, 228]). В таком случае, супероксид или  $H_2O_2$  должны диффундировать сквозь внешнюю мембрану чтобы достать до своих внутриклеточных мишеней. В то же время,  $H_2O_2$  быстро разрушается внутри клетки, если немедленно не встречается с находящейся вблизи подходящей мишенью, а это требует поддержания крутых трансмембранных градиентов  $H_2O_2$ . Такая ситуация наблюдалась в рыбе *Danio rerio*, когда  $H_2O_2$  в большом количестве образовывался в острых ранах и служил хемоаттрактантом для лейкоцитов [326]. Хотя этот результат свидетельствует о роли  $H_2O_2$ , он ничего не говорит о том, могут ли такие градиенты формироваться и поддерживаться в нормальных физиологических условиях.

Первые указания на то, что пероксидная сигнализация связана с хемотаксисом начали появляться после обнаружения компонентов НАД(Ф)Н-оксидазы на лидирующем крае мигрирующих клеток (см. обзоры [224, 225]). Помимо этого, НАД(Ф)Н-оксидаза была обнаружена в кавеолах и липидных плотках, которые также поляризуются в мигрирующих клетках. Особенно важными были эксперименты, где наблюдали рецептор-зависимое образование  $H_2O_2$  в эндосомах [237, 238]. Стимуляция клеток  $IL-1\beta$ , EGF или PDGF вызывала эндодцитоз соответствующих рецепторов и образование  $H_2O_2$  в эндосомах. Когда появление  $H_2O_2$  непрерывно регистрировали в живых клетках, оказалось, что уровень  $H_2O_2$  повышен более 30 мин и связан с эндосомальным компартментом [238]. Это означает, что НАД(Ф)Н-оксидаза долго остается активной в эндосомах, вероятно благодаря активности рецепторов и Ras-белка.

Таким образом, существующие на настоящий момент данные указывают на исключительную важность обратной регуляции для хемотаксиса и намечают контуры новых механизмов, которые включают поляризованный эндодцитоз и рецептор-зависимое образование внутриклеточного пероксида водорода – нового вторичного посредника, способного усиливать и продлевать активность рецептор-зависимых сигнальных каскадов.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования базовых и регуляторных механизмов направленного движения клеток активно развивались в новом тысячелетии и раскрыли огромное число участников. Оказалось, что клетки умело используют общие механизмы, чтобы подстраивать свое поведение в соответствие с окружающей средой. Они узнают внешние сигналы, обрабатывают их, используя различные, но все же общие механизмы, и перемещаются, выбирая наиболее подходящие способы движения. Клетки *Dictyostelium* дают понимание основ хемотаксиса, однако, новые регуляторные стратегии могли появиться в клетках млекопитающих, а некоторые старые могли быть утрачены (например, как это было показано для цГМФ-регуляции). Использование ценных знаний, полученных в модельных организмах, должно облегчить изучение более сложных систем, таких как нервные, иммунные, воспалительные, стволовые и прогениторные клетки нашего организма.

Современные методы дают новый инструментарий для визуализации и изучения того, как клетки узнают естественные сигналы и ведут себя в трехмерном физиологическом окружении, какие механизмы лежат в основе межклеточных переговоров и коллективного поведения клеток, как они воспринимают и используют элементы окружающей среды. Возникновение дальних контактов с использованием небольших молекул вполне ожидается для клеток в организме, но мы мало знаем о том, как формируются и поддерживаются стабильные градиенты этих молекул. Эти знания особенно важны для регенеративной медицины и иммунологии. Также не совсем понятно, как, и передают ли клетки информацию в форме градиентов на дальние расстояния? Какова природа хемотактических молекул и как интерпретируются несколько сигналов одновременно? Мало исследован вопрос о навигации конкретных клеток внутри тканей и могут ли клетки разных типов помогать в этом друг другу. Ответы на эти вопросы крайне востребованы в биологии стволовых и прогениторных клеток.

Остаются нерешенными вопросы относительно того, как клетки разбирают и обрабатывают внешнюю информацию, как адаптируются к пространственно-временным изменениям внешнего градиента и каковы механизмы, которые поддерживают внутренние сигнальные градиенты. Представляется вероятным, что медленная механика мезенхимальных клеток требует механизмов обратной связи, которые, возможно, отличаются от таковых в быстро движущихся амебах и лейкоцитах. Возникают новые концепции, которые указывают на то, что в дополнение к классическому дизайну путей передачи сигнала, сигнальная архитектура может привлекать новых старых знакомых, о

которых мы мало подозревали. Они могут оказаться для нас новыми и едва понятными вторичными посредниками химической природы, такими как пероксид водорода, или известными знакомыми, такими как эндоцитоз и сортировка везикул. Дальнейшие исследования должны показать, как устроены эти механизмы и насколько они необходимы, эволюционно консервативны и представлены в клетках.

#### Благодарности

Автор благодарен Н.Б. Гусеву за моральную поддержку и плодотворные обсуждения и М.А. Воротникову за помощь в подготовке иллюстраций.

### ЛИТЕРАТУРА

- Geeves, M.A., Holmes, K.C. (2005) *Adv. Protein Chem.*, **71**, 161–193.
- Swaney, K.F., Huang, C.H., Devreotes, P.N. (2010) *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 265–289.
- Li, L., Norrelykke, S.F., Cox, E.C. (2008) *PLoS ONE*, **3**, e2093.
- Xiong, Y., Huang, C.H., Iglesias, P.A., Devreotes, P.N. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17079–17086.
- Baker, M.D., Wolanin, P.M., Stock, J.B. (2006) *Bioessays*, **28**, 9–22.
- Lammermann, T., Sixt, M. (2009) *Curr. Opin Cell Biol.*, **21**, 636–644.
- Niggli, V. (2003) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**, 1619–1638.
- Charest, P.G., Firtel, R.A. (2006) *Curr. Opin Genet Dev.*, **16**, 339–347.
- von Philipsborn, A., Bastmeyer, M. (2007) *Int. Rev. Cytol.*, **263**, 1–62.
- Sheetz, M.P. (1994) *Semin. Cell Biol.*, **5**, 149–155.
- Small, J.V., Anderson, K., Rottner, K. (1996) *Biosci. Rep.*, **16**, 351–368.
- Haugh, J.M. (2006) *Biophys. J.*, **90**, 2297–2308.
- Haugh, J.M., Codazzi, F., Teruel, M., Meyer, T. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 1269–1280.
- Ronnstrand, L., Heldin, C.H. (2001) *Int. J. Cancer*, **91**, 757–762.
- Schneider, I.C., Haugh, J.M. (2005) *J. Cell Biol.*, **171**, 883–892.
- Schneider, I.C., Haugh, J.M. (2006) *Cell Cycle*, **5**, 1130–1134.
- Condeelis, J., Singer, R.H., Segall, J.E. (2005) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 695–718.
- Kedrin, D., van Rheenen, J., Hernandez, L., Condeelis, J., Segall, J.E. (2007) *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, **12**, 143–152.
- Jekely, G., Sung, H.H., Luque, C.M., Rorth, P. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 197–207.
- Janssens, K., Sung, H.H., Rorth, P. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7323–7328.
- Keller, R. (2005) *Curr. Opin Cell Biol.*, **17**, 533–541.
- Ozaki, Y., Nishimura, M., Sekiya, K., Suehiro, F., Kanawa, M., Nikawa, H., Hamada, T., Kato, Y. (2007) *Stem. Cells Dev.*, **16**, 119–129.
- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., Domenech, J. (2007) *Stem. Cells*, **25**, 1737–1745.
- Birchmeier, C. (2004) In: *Cell Motility* / Eds. M.P.A. Ridley, P. Clark. UK, John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, pp. 317–330.
- Annesley, S.J., Fisher, P.R. (2009) *Mol. Cell Biochem.*, **329**, 73–91.
- Van Haastert, P.J., Devreotes, P.N. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 626–634.
- Tomchik, K.J., Devreotes, P.N. (1981) *Science*, **212**, 443–446.
- Geiger, J., Wessels, D., Soll, D.R. (2003) *Cell Motil. Cytoskeleton*, **56**, 27–44.
- Soll, D.R., Wessels, D., Heid, P.J., Zhang, H. (2002) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 659–672.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sucgang, R., et al. (2005) *Nature*, **435**, 43–57.

31. Chisholm, R.L., Gaudet, P., Just, E.M., Pilcher, K.E., Fey, P., Merchant, S.N., Kibbe, W.A. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, D423–427.
32. Zigmond, S.H. (1977) *J. Cell Biol.*, **75**, 606–616.
33. Foxman, E.F., Kunkel, E.J., Butcher, E.C. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 577–588.
34. Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E., Kubes, P. (2002) *J. Cell Biol.*, **159**, 91–102.
35. Ali, H., Richardson, R.M., Haribabu, B., Snyderman, R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 6027–6030.
36. Kharitonova, M.A., Vasiliev, J.M. (2008) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **19**, 480–484.
37. Mogilner, A., Keren, K. (2009) *Curr. Biol.*, **19**, R762–771.
38. Small, J.V., Geiger, B., Kaverina, I., Bershadsky, A. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 957–964.
39. Vasiliev, J.M. (2004) *Int. J. Dev. Biol.*, **48**, 425–439.
40. Friedl, P., Wolf, K. (2010) *J. Cell Biol.*, **188**, 11–19.
41. Even-Ram, S., Yamada, K.M. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 524–532.
42. Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altrock, B.W., Deuel, T.F., Thomason, A. (1991) *J. Cell Biochem.*, **45**, 319–326.
43. Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffmann, E., Martin, G.R. (1982) *J. Cell Biol.*, **92**, 584–588.
44. De Donatis, A., Comito, G., Buricchi, F., Vinci, M.C., Parenti, A., Caselli, A., Camici, G., Manao, G., Ramponi, G., Cirri, P. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 19948–19956.
45. Insall, R.H. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 453–458.
46. Shestakova, E.A., Singer, R.H., Condeelis, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7045–7050.
47. Kawada, K., Upadhyay, G., Ferandon, S., Janarthanan, S., Hall, M., Vilaradaga, J.P., Yajnik, V. (2009) *Mol. Cell Biol.*, **29**, 4508–4518.
48. Bershadsky, A., Kozlov, M., Geiger, B. (2006) *Curr. Opin Cell Biol.*, **18**, 472–481.
49. Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F. (1996) *Cell*, **84**, 359–369.
50. Mitchison, T.J., Cramer, L.P. (1996) *Cell*, **84**, 371–379.
51. Chhabra, E.S., Higgs, H.N. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1110–1121.
52. Pollard, T.D., Borisy, G.G. (2003) *Cell*, **112**, 453–465.
53. Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T.E., Rottner, K. (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1656–1664.
54. Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., Waterman, C.M. (2010) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **26**, 315–333.
55. Pellegrin, S., Mellor, H. (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 3491–3499.
56. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, A.R. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 778–790.
57. Parsons, J.T., Horwitz, A.R., Schwartz, M.A. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 633–643.
58. DiMilla, P.A., Stone, J.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M., Lauffenburger, D.A. (1993) *J. Cell Biol.*, **122**, 729–737.
59. Rafelski, S.M., Theriot, J.A. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 209–239.
60. Fackler, O.T., Grosse, R. (2008) *J. Cell Biol.*, **181**, 879–884.
61. Bretscher, M.S. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 916.
62. Bugyi, B., Carlier, M.F. (2010) *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 449–470.
63. Le Clairche, C., Carlier, M.F. (2008) *Physiol. Rev.*, **88**, 489–513.
64. Wegner, A. (1976) *J. Mol. Biol.*, **108**, 139–150.
65. Huang, T.Y., DerMardirossian, C., Bokoch, G.M. (2006) *Curr. Opin Cell Biol.*, **18**, 26–31.
66. DesMarais, V., Macaluso, F., Condeelis, J., Bailly, M. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 3499–3510.
67. Mogilner, A. (2006) *Curr. Opin Cell Biol.*, **18**, 32–39.
68. dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J. (2003) *Physiol. Rev.*, **83**, 433–473.
69. Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E., Rottner, K. (2002) *Trends Cell Biol.*, **12**, 112–120.
70. Winder, S.J., Ayscough, K.R. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 651–654.

71. Alexandrova, A.Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J.M., Meister, J.J., Bershadsky, A.D., Verkhovskiy, A.B. (2008) PLoS ONE, **3**, e3234.
72. Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., Danuser, G. (2004) Science, **305**, 1782–1786.
73. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. (2003) Science, **302**, 1704–1709.
74. Ridley, A.J. (2006) Trends Cell Biol., **16**, 522–529.
75. Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K., Scita, G. (2005) Cell Mol. Life Sci., **62**, 955–970.
76. Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., Rosen, M.K. (2005) Nature, **433**, 488–494.
77. Pollard, T.D. (2007) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., **36**, 451–477.
78. Kerkhoff, E. (2006) Trends Cell Biol., **16**, 477–483.
79. Stenmark, H., Aasland, R., Driscoll, P.C. (2002) FEBS Lett., **513**, 77–84.
80. Insall, R.H., Machesky, L.M. (2009) Dev. Cell, **17**, 310–322.
81. Welch, M.D., Mullins, R.D. (2002) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **18**, 247–288.
82. Pantaloni, D., Boujema, R., Didry, D., Gounon, P., Carlier, M.F. (2000) Nat. Cell Biol., **2**, 385–391.
83. Pollitt, A.Y., Insall, R.H. (2009) J. Cell Sci., **122**, 2575–2578.
84. Stradal, T.E., Scita, G. (2006) Curr. Opin. Cell Biol., **18**, 4–10.
85. Takenawa, T., Suetsugu, S. (2007) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **8**, 37–48.
86. Kaverina, I., Krylyshkina, O., Small, J.V. (2002) Int. J. Biochem. Cell Biol., **34**, 746–761.
87. Broussard, J.A., Webb, D.J., Kaverina, I. (2008) Curr. Opin. Cell Biol., **20**, 85–90.
88. Geiger, B., Spatz, J.P., Bershadsky, A.D. (2009) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **10**, 21–33.
89. Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., Horwitz, A.R. (2008) Nat. Cell Biol., **10**, 1039–1050.
90. Vicente-Manzanares, M., Koach, M.A., Whitmore, L., Lamers, M.L., Horwitz, A.F. (2008) J. Cell Biol., **183**, 543–554.
91. Friedland, J.C., Lee, M.H., Boettiger, D. (2009) Science, **323**, 642–644.
92. Vogel, V., Sheetz, M. (2006) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **7**, 265–275.
93. Rottner, K., Hall, A., Small, J.V. (1999) Curr. Biol., **9**, 640–648.
94. Riento, K., Ridley, A.J. (2003) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **4**, 446–456.
95. Yoneda, A., Multhaupt, H.A., Couchman, J.R. (2005) J. Cell Biol., **170**, 443–453.
96. Ханчаев А.Ю., Ширинский В.П., Воротников А.В. (2003) Успехи биолог. химии, **43**, 365–420.
97. Chew, T.L., Wolf, W.A., Gallagher, P.J., Matsumura, F., Chisholm, R.L. (2002) J. Cell Biol., **156**, 543–553.
98. Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Matsumura, F. (2004) J. Cell Biol., **164**, 427–439.
99. Post, P.L., DeBiasio, R.L., Taylor, D.L. (1995) Mol. Biol. Cell, **6**, 1755–1768.
100. Eddy, R.J., Pierini, L.M., Matsumura, F., Maxfield, F.R. (2000) J. Cell Sci., **113**, 1287–1298.
101. Lammernann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R., Sixt, M. (2008) Nature, **453**, 51–55.
102. Renkawitz, J., Schumann, K., Weber, M., Lammernann, T., Pflücke, H., Piel, M., Polleux, J., Spatz, J.P., Sixt, M. (2009) Nat. Cell Biol., **11**, 1438–1443.
103. Yoshida, K., Soldati, T. (2006) J. Cell Sci., **119**, 3833–3844.
104. Huxley, A.F. (2000) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci., **355**, 433–440.
105. Huxley, H.E. (2004) Eur. J. Biochem., **271**, 1403–1415.
106. Danuser, G. (2009) J. Cell Sci., **122**, 1959–1962.
107. Vallotton, P., Small, J.V. (2009) J. Cell Sci., **122**, 1955–1958.

108. Cai, Y., Biais, N., Giannone, G., Tanase, M., Jiang, G., Hofman, J.M., Wiggins, C.H., Silberzan, P., Buguin, A., Ladoux, B., Sheetz, M.P. (2006) *Biophys. J.*, **91**, 3907–3920.
109. Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., Yamada, K.M. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 299–309.
110. Kolega, J. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 4745–4757.
111. Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C.K., Horwitz, A.F. (2007) *J. Cell Biol.*, **176**, 573–580.
112. Sellers, J.R., Knight, P.J. (2007) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **28**, 363–370.
113. Bosgraaf, L., van Haastert, P.J. (2006) *Eur. J. Cell Biol.*, **85**, 969–979.
114. Craig, R., Woodhead, J.L. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 204–212.
115. Verkhovskiy, A.B., Borisy, G.G. (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 637–652.
116. Verkhovskiy, A.B., Svitkina, T.M., Borisy, G.G. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 989–1002.
117. Hotulainen, P., Lappalainen, P. (2006) *J. Cell Biol.*, **173**, 383–394.
118. Lo, C.M., Buxton, D.B., Chua, G.C., Dembo, M., Adelstein, R.S., Wang Y.L. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 982–989.
119. Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clement, S., Chaponnier, C. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 2980–2988.
120. Huvneers, S., Danen, E.H. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 1059–1069.
121. Franco, S.J., Huttenlocher, A. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 3829–3838.
122. Jay, P.Y., Pham, P.A., Wong, S.A., Elson, E.L. (1995) *J. Cell Sci.*, **108** (Pt 1), 387–393.
123. Andrew, N., Insall, R.H. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 193–200.
124. Bosgraaf, L., Van Haastert, P.J. (2009) *PLoS ONE*, **4**, e5253.
125. Van Haastert, P.J. (2011) *Sci. Signal*, **4**, pe6.
126. Kay, R.R., Langridge, P., Traynor, D., Hoeller, O. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 455–463.
127. Iglesias, P.A., Devreotes, P.N. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 35–40.
128. Meinhardt, H., Gierer, A. (2000) *Bioessays*, **22**, 753–760.
129. Bosgraaf, L., Van Haastert, P.J. (2009) *PLoS ONE*, **4**, e6842.
130. Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L., Firtel, R.A. (2002) *Cell*, **109**, 611–623.
131. Merlot, S., Firtel, R.A. (2003) *J. Cell Sci.*, **116**, 3471–3478.
132. Takeda, K., Sasaki, A.T., Ha, H., Seung, H.A., Firtel, R.A. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 11874–11884.
133. Ward, S.G. (2004) *Trends Immunol.*, **25**, 67–74.
134. Cai, H., Das, S., Kamimura, Y., Long, Y., Parent, C.A., Devreotes, P.N. (2010) *J. Cell Biol.*, **190**, 233–245.
135. Chen, L., Iijima, M., Tang, M., Landree, M.A., Huang, Y.E., Xiong, Y., Iglesias, P.A., Devreotes, P.N. (2007) *Dev. Cell*, **12**, 603–614.
136. Otsuji, M., Terashima, Y., Ishihara, S., Kuroda, S., Matsushima, K. (2010) *Sci. Signal*, **3**, ra89.
137. Van Haastert, P.J. (2010) *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000874.
138. Charest, P.G., Firtel, R.A. (2007) *Biochem. J.* **401**, 377–390.
139. Kolsch, V., Charest, P.G., Firtel, R.A. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 551–559.
140. Heasman, S.J., Ridley, A.J. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 690–701.
141. Alam, N., Goel, H.L., Zarif, M.J., Butterfield, J.E., Perkins, H.M., Sansoucy, B.G., Sawyer, T.K., Languino, L.R. (2007) *J. Cell Physiol.*, **213**, 649–653.
142. Wells, A., Ware, M.F., Allen, F.D., Lauffenburger, D.A. (1999) *Cell Motil. Cytoskeleton*, **44**, 227–233.
143. Haugh, J.M. (2002) *Mol. Interv.*, **2**, 292–307.
144. Welf, E.S., Haugh, J.M. (2011) *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **3**, 231–240.
145. Anand-Apte, B., Zetter, B. (1997) *Stem. Cells*, **15**, 259–267.
146. Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., Bourne, H.R. (2003) *Cell*, **114**, 201–214.

147. Jin, T., Zhang, N., Long, Y., Parent, C.A., Devreotes, P.N. (2000) *Science*, **287**, 1034–1036.
148. Xiao, Z., Zhang, N., Murphy, D.B., Devreotes, P.N. (1997) *J. Cell Biol.*, **139**, 365–374.
149. Servant, G., Weiner, O.D., Neptune, E.R., Sedat, J.W., Bourne, H.R. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1163–1178.
150. Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P., Yanagida, T. (2001) *Science*, **294**, 864–867.
151. Janetopoulos, C., Jin, T., Devreotes, P. (2001) *Science*, **291**, 2408–2411.
152. Xu, X., Meier-Schellersheim, M., Jiao, X., Nelson, L.E., Jin, T. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 676–688.
153. Hawkins, P.T., Anderson, K.E., Davidson, K., Stephens, L.R. (2006) *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 647–662.
154. Kundra, V., Escobedo, J.A., Kazlauskas, A., Kim, H.K., Rhee, S.G., Williams, L.T., Zetter, B.R. (1994) *Nature*, **367**, 474–476.
155. Bailly, M., Wyckoff, J., Bouzahzah, B., Hammerman, R., Sylvestre, V., Cammer, M., Pestell, R., Segall, J.E. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3873–3883.
156. Wennerberg, K., Rossman, K.L., Der, C.J. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 843–846.
157. Sasaki, A.T., Chun, C., Takeda, K., Firtel, R.A. (2004) *J. Cell Biol.*, **167**, 505–518.
158. Kundra, V., Anand-Apte, B., Feig, L.A., Zetter, B.R. (1995) *J. Cell Biol.*, **130**, 725–731.
159. Janetopoulos, C., Ma, L., Devreotes, P.N., Iglesias, P.A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8951–8956.
160. Meili, R., Ellsworth, C., Lee, S., Reddy, T.B., Ma, H., Firtel, R.A. (1999) *Embo J.*, **18**, 2092–2105.
161. Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., Wymann, M.P. (2000) *Science*, **287**, 1049–1053.
162. Rickert, P., Weiner, O.D., Wang, F., Bourne, H.R., Servant, G. (2000) *Trends Cell Biol.*, **10**, 466–473.
163. Weiner, O.D., Neilsen, P.O., Prestwich, G.D., Kirschner, M.W., Cantley, L.C., Bourne, H.R. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 509–513.
164. Parent, C.A., Blacklock, B.J., Froehlich, W.M., Murphy, D.B., Devreotes, P.N. (1998) *Cell*, **95**, 81–91.
165. Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W., Bourne, H.R. (2000) *Science*, **287**, 1037–1040.
166. Iijima, M., Devreotes, P. (2002) *Cell*, **109**, 599–610.
167. Iijima, M., Huang, Y.E., Luo, H.R., Vazquez, F., Devreotes, P.N. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 16606–16613.
168. Liliental, J., Moon, S.Y., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H., Wu, H. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 401–404.
169. Nishio, M., Watanabe, K., Sasaki, J., Taya, C., Takasuga, S., et al. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 36–44.
170. Cantley, L.C., Neel, B.G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4240–4245.
171. Sasaki, A.T., Janetopoulos, C., Lee, S., Charest, P.G., Takeda, K., Sundheimer, L.W., Meili, R., Devreotes, P.N., Firtel, R.A. (2007) *J. Cell Biol.*, **178**, 185–191.
172. van Haastert, P.J., Keizer-Gunnink, I., Kortholt, A. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 809–816.
173. Hoeller, O., Kay, R.R. (2007) *Curr. Biol.*, **17**, 813–817.
174. Cathcart, M.K. (2009) *J. Lipid Res.*, **50 Suppl**, S231–236.
175. Mishra, R.S., Carnevale, K.A., Cathcart, M.K. (2008) *J. Exp. Med.*, **205**, 347–359.
176. Moolenaar, W.H. (1999) *Exp. Cell Res.*, **253**, 230–238.
177. Kim, J.H., Adelstein, R.S. (2011) *J. Cell Physiol.*, epub ahead of print, DOI 10.1002/jcp.22631.
178. Simons, K., Gerl, M.J. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 688–699.
179. Shmelzer, Z., Haddad, N., Admon, E., Pessach, I., Leto, T.L., Eitan-Hazan, Z., Hershfinkel, M., Levy, R. (2003) *J. Cell Biol.*, **162**, 683–692.

180. Veltman, D.M., Keizer-Gunnik, I., Van Haastert, P.J. (2008) *J. Cell Biol.*, **180**, 747–753.
181. Lemmon, M.A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 99–111.
182. Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C.K., Wu, D. (2003) *Cell*, **114**, 215–227.
183. Welch, H.C., Coadwell, W.J., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. (2003) *FEBS Lett.*, **546**, 93–97.
184. Monypenny, J., Zicha, D., Higashida, C., Oceguera-Yanez, F., Narumiya, S., Watanabe, N. (2009) *Mol. Cell Biol.*, **29**, 2730–2747.
185. Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., Yamada, K.M. (2005) *J. Cell Biol.*, **170**, 793–802.
186. Kravnov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S., Hahn, K.M. (2000) *Science*, **290**, 333–337.
187. Vidali, L., Chen, F., Cicchetti, G., Ohta, Y., Kwiatkowski, D.J. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 2377–2390.
188. Chen, L., Janetopoulos, C., Huang, Y.E., Iijima, M., Borleis, J., Devreotes, P.N. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 5028–5037.
189. Higuchi, M., Masuyama, N., Fukui, Y., Suzuki, A., Gotoh, Y. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1958–1962.
190. Postma, M., Roelofs, J., Goedhart, J., Loovers, H.M., Visser, A.J., Van Haastert, P.J. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 2925–2935.
191. Manning, B.D., Cantley, L.C. (2007) *Cell*, **129**, 1261–1274.
192. Bozulis, L., Hemmings, B.A. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 256–261.
193. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M. (2005) *Science*, **307**, 1098–1101.
194. Zdychova, J., Komers, R. (2005) *Physiol. Res.*, **54**, 1–16.
195. Zhang, B., Ma, Y., Guo, H., Sun, B., Niu, R., Ying, G., Zhang, N. (2009) *Eur. J. Immunol.*, **39**, 894–901.
196. Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L.R., Fujio, Y., Walsh, K., Sessa, W.C. (2000) *Circ. Res.*, **86**, 892–896.
197. Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K., Takahashi, M. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 389–402.
198. Lee, S., Comer, F.I., Sasaki, A., McLeod, I.X., Duong, Y., Okumura, K., Yates, J.R., 3rd, Parent, C.A., Firtel, R.A. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 4572–4583.
199. Kamimura, Y., Xiong, Y., Iglesias, P.A., Hoeller, O., Bolourani, P., Devreotes, P.N. (2008) *Curr. Biol.*, **18**, 1034–1043.
200. Bosgraaf, L., Van Haastert, P.J. (2002) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 781–791.
201. Kjoller, L., Hall, A. (1999) *Exp. Cell Res.*, **253**, 166–179.
202. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschlegel, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., Hall, M.N. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 457–468.
203. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 1296–1302.
204. Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., Hall, M.N. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1122–1128.
205. Grandoch, M., Roscioni, S.S., Schmidt, M. (2010) *Br. J. Pharmacol.*, **159**, 265–284.
206. Jeon, T.J., Lee, D.J., Merlot, S., Weeks, G., Firtel, R.A. (2007) *J. Cell Biol.*, **176**, 1021–1033.
207. Yokoyama, U., Minamisawa, S., Quan, H., Akaike, T., Jin, M., Otsu, K., Ulucan, C., Wang, X., Baljinnyam, E., Takaoka, M., Sata, M., Ishikawa, Y. (2008) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **295**, H1547–1555.
208. Bolourani, P., Spiegelman, G.B., Weeks, G. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 10232–10240.
209. Bosgraaf, L., Russcher, H., Smith, J.L., Wessels, D., Soll, D.R., Van

- Haastert, P.J. (2002) *Embo. J.*, **21**, 4560–4570.
210. Veltman, D.M., Van Haastert, P.J. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3921–3929.
211. de la Roche, M.A., Cote, G.P. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1525**, 245–261.
212. Fincham, V.J., James, M., Frame, M.C., Winder, S.J. (2000) *Embo J.*, **19**, 2911–2923.
213. Yang, C., Kazanietz, M.G. (2007) *Biochem. J.* **403**, 1–12.
214. Vicente-Manzanares, M., Newell-Litwa, K., Bachir, A.I., Whitmore, L.A., Horwitz, A.R. (2011) *J. Cell Biol.*, **193**, 381–396.
215. Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., Bourne, H.R. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 375–385.
216. Wang, F., Herzmark, P., Weiner, O.D., Srinivasan, S., Servant, G., Bourne, H.R. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 513–518.
217. Weiger, M.C., Wang, C.C., Krajcovic, M., Melvin, A.T., Rhoden, J.J., Haugh, J.M. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 313–323.
218. Arriumerlou, C., Meyer, T. (2005) *Dev. Cell*, **8**, 215–227.
219. Weiger, M.C., Ahmed, S., Welf, E.S., Haugh, J.M. (2010) *Biophys. J.*, **98**, 67–75.
220. Sorkin, A., von Zastrow, M. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 609–622.
221. Park, H.S., Lee, S.H., Park, D., Lee, J.S., Ryu, S.H., Lee, W.J., Rhee, S.G., Bae, Y.S. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 4384–4394.
222. Jones, M.C., Caswell, P.T., Norman, J.C. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 549–557.
223. Rappoport, J.Z., Simon, S.M. (2003) *J. Cell Sci.*, **116**, 847–855.
224. Rhee, S.G. (2006) *Science*, **312**, 1882–1883.
225. Ushio-Fukai, M. (2006) *Sci. STKE*, **2006**, re8.
226. Bedard, K., Krause, K.H. (2007) *Physiol. Rev.*, **87**, 245–313.
227. Droge, W., (2002) *Physiol. Rev.*, **82**, 47–95.
228. Winterbourn, C.C., Hampton, M.B. (2008) *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 549–561.
229. Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Sulciner, D.J., Gutkind, J.S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J., Finkel, T. (1996) *Biochem. J.* **318**, 379–382.
230. Brown, D.I., Griending, K.K. (2009) *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1239–1253.
231. Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R., Rhee, S.G. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 15366–15372.
232. Kwon, J., Lee, S.R., Yang, K.S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., Rhee, S.G. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16419–16424.
233. Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 20336–20342.
234. Kim, J.S., Huang, T.Y., Bokoch, G.M. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2650–2660.
235. Sroka, J., Madeja, Z. (2009) *Postepy Biochem.*, **55**, 145–152 [in polish].
236. Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., Mitchison, T.J. (2009) *Nature*, **459**, 996–999.
237. Li, Q., Harraz, M.M., Zhou, W., Zhang, L.N., Ding, W., Zhang, Y., Eggleston, T., Yeaman, C., Banfi, B., Engelhardt, J.F. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 140–154.
238. Mishina, N.M., Tyurin-Kuzmin, P.A., Markvicheva, K.N., Vorotnikov, A.V., Tkachuk, V.A., Laketa, V., Schultz, C., Lukyanov, S., Belousov, V.V. (2011) *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 1–7.