

ВИМЕНТИНОВЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ И ИХ РОЛЬ ВО ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ РАСПРЕДЕЛЕНИИ ОРГАНЕЛЛ

©2008 г. А. А. МИНИН, М. В. МОЛДАВЕР

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область;
Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН,
Москва*

I. Введение. II. Структура промежуточных филаментов. III. Функции промежуточных филаментов. IV. Фосфорилирование ПФ как способ регуляции их функций. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Промежуточные филаменты (ПФ) – один из трех основных компонентов цитоскелета в эукариотических клетках. Они называются промежуточными, поскольку их диаметр (8–12 нм) имеет промежуточное значение по сравнению с микротрубочками (25 нм) и актиновыми микрофиламентами (5–8 нм) [1–4]. На разных этапах эмбрионального развития, на разных стадиях дифференцировки, в разных типах клеток экспрессируются ПФ, состоящие из разных белков. В неко-

Принятые сокращения: ПФ – промежуточные филаменты; GFAP – кислый глиальный белок; NF-L, NF-M, NF-H – легкий, средний и тяжелый белки нейрофиламентов; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; SAXS – метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей; IFAP – белки, ассоциированные с ПФ; ВРАG1 – первый антиген булезного пемфигоида; Bcl-2 – онкоген 2 лимфомы В-клеток, ПКС – протеин киназа С; LAMP-2 – мембранный белок, связанный с лизосомами; ЭР – эндоплазматический ретикулум; SUN и KASH – интегральные белки ядерной мембраны; ПКА – протеинкиназа А; cdc2 – протеин киназа, мутация которой нарушает клеточный цикл; СаМКП – Са-кальмодулин-чувствительная протеин киназа; РАК – протеин киназа, активируемая белком p21; GSK3 – киназа синтазы гликогена.

Адрес для корреспонденции: alexminin@gmail.com

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (грант № 06-04-48452-а).

торых типах клеток одновременно присутствуют несколько различных ПФ [1, 3, 5]. Всего в геноме человека обнаружено около 70 генов, кодирующих различные белки ПФ, которые образуют одно из самых многочисленных белковых семейств [6].

В отличие от актина и тубулина, которые обладают высококонсервативной структурой, гомология последовательностей белков ПФ иногда составляет не более 20% [1, 4]. Тем не менее, основываясь на биохимическом, иммунологическом и структурном сходстве, выделяют пять различных типов промежуточных филаментов [1, 3, 4]. Наиболее многочисленной и наиболее сложной по составу группой белков ПФ являются кератины, они представляют два типа белков – I и II тип [7]. Кислые кератины относятся к типу I, а основные – к типу II. Для сборки кератиновых ПФ необходимы белки обоих типов – они образуют гетерополимеры [1, 8]. Известны эпидермальные кератины, простые эпителиальные кератины и кератины, которые экспрессируются в волосах, шерсти и ногтях [3]. К белкам ПФ III типа относятся четыре белка: десмин, виментин, периферин и кислый глиальный белок (GFAP – glial filament acidic protein). Десмин экспрессируется во всех типах мышечных клеток; виментин обнаружен в фибробластах, лимфоцитах, эндотелиальных клетках и некоторых других мезенхимальных тканях; периферин присутствует, в основном, в периферических нейронах, где он участвует в сборке ПФ вместе с белками IV типа; GFAP экспрессируется в глиальных клетках [3, 9–11]. В отличие от кератиновых белков ПФ III типа могут формировать гомополимеры, однако они могут образовывать и гетерополимеры с другими белками III типа и с белком NF-L [1, 12, 13]. Белки ПФ IV типа экспрессируются, главным образом, в нервных клетках, где они участвуют в радиальном росте аксонов. К ним относится α -интернексин и триплет белков нейрофиламентов: NF-L, NF-M, NF-H (neurofilament light, medium, and heavy proteins) [1, 3, 14–16]. Еще один белок, нестин, впервые обнаруженный в предшественниках нервных клеток, иногда относят к особому типу белков ПФ – VI. Однако исходя из его структурных особенностей, нестин можно отнести к IV типу [4]. Кроме вышперечисленных белков, которые входят в состав цитоплазматических ПФ, и которым, в основном, посвящен данный обзор, существуют еще два типа, сильно от них отличающихся, – это ядерные ламины, образующие V тип, и два белка VI типа, найденные в хрусталике глаза [1, 17, 18].

Пять типов белков ПФ, выделенных на основе гомологии последовательностей, разделяют на три группы, различающихся принципами сборки. К первой группе относят кератины, ко второй – ПФ

III и IV типа, а третью группу сборки образуют ламины. Эти три группы могут сосуществовать как 3 независимые системы ПФ внутри одной и той же клетки [19]. Цитоплазматические ПФ могут собираться *in vitro* в отсутствие вспомогательных белков [1]. Члены первой группы являются облигатными гетерополимерами, то есть для сборки кератиновых филаментов необходимо соединение ПФ I и II типов. Белки ПФ III типа и NF-L, относящиеся ко второй группе сборки, образуют гомополимеры *in vitro*, однако в клетке они очень часто обнаруживаются в виде сополимеров. Ламины не способны образовывать сополимеры с белками цитоплазматических ПФ [20].

Основной функцией ПФ в клетках, основанной на их механических свойствах и способности к самосборке, является поддержание клеточной и тканевой целостности [1]. Кроме этой «традиционной» функции, они играют важную роль во внутриклеточном распределении органелл и белков [3, 21], что, в свою очередь, влияет на функции этих органелл. Так, в ряде исследований показано, что функции митохондрий в разных клетках зависят от десмининовых, виментиновых, кератиновых ПФ и нейрофиламентов [4, 22]. Роль ПФ в локализации таких органелл, как аппарат Гольджи, эндосомы, лизосомы, а также ядер, хорошо документирована во многих работах [3, 21, 23, 24].

Особенности строения различных ПФ, многие из которых хорошо изучены к настоящему времени, позволяют предположить, что их взаимодействия с различными клеточными органеллами определяются как общими для всех ПФ структурными чертами, так и особенностями отдельных представителей этого большого семейства. Так, высококонсервативная центральная часть всех молекул белков ПФ, представляющая собой альфа-спираль и являющаяся структурной единицей филаментов, может участвовать во взаимодействиях, одинаковых для всех ПФ. Вместе с тем участки, расположенные на концах молекул и сильно отличающиеся в разных белках, могут быть ответственными за взаимодействия, характерные только для данных типов ПФ.

В этом обзоре мы рассматриваем результаты исследований, посвященных структуре ПФ, обращая особое внимание на то, как с ней связаны различные функции ПФ и, в особенности, их взаимодействия с различными органеллами. Значительное место в обзоре уделено виментиновым ПФ, как наиболее хорошо изученным.

II. СТРУКТУРА ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ ПФ

Анализ первичной последовательности белков ПФ показал, что, несмотря на большое разнообразие, все они имеют общий план строения (рис. 1) [1, 25]. У всех белков ПФ есть центральный α -спиральный домен, который фланкирован неспиральными N-концевым («голова») и C-концевым («хвост») доменами. Концевые домены разных типов ПФ сильно различаются по размерам и первичной аминокислотной последовательности [1].

Строение центрального домена, наоборот, чрезвычайно консервативно. Он содержит четыре спиральных сегмента 1A, 1B, 2A, 2B, прерывающихся в трех местах короткими неспиральными участками-линкерами L1, L1-2 и L2, которые часто содержат остатки пролина и глицина. Аминокислотная последовательность α -спиральных участков центрального домена состоит из повторов, представляющих собой гептады вида (abcdefg)_n, где положения a и d предпочтительно занимают небольшие гидрофобные остатки – лейцин, изолейцин, метионин и валин [25]. Такой повторяющийся мотив из 7 а.о. характерен для белков, способных к образованию скрученной α -спирали (coiled-coil) или по-другому суперспирали, состоящей из двух α -спиралей [26].

Поверхность α -спирального домена белков ПФ сильно заряжена. Например, у виментина из 310 аминокислот, образующих центральный домен, заряженными являются 116 – 70 кислых и 46 основных аминокислот. Таким образом, на одну субъединицу виментина приходится избыток отрицательного заряда – 24 кислых аминокислотных остатка [20]. В отличие от центрального домена, «голова» многих белков ПФ заряжена положительно. У виментина в N-концевом домене содержится 12 аргининов, а у ламина В2 – 3. При этом количество положительно заряженных аминокислотных остатков коррелирует с длиной N-концевого домена (у виментина он состоит из 102 остатков, а у ламина В2 – из 25). Даже кислый глиальный белок GFAP, с коротким N-концевым доменом из 68 аминокислот, содержит 9 основных остатков. Считают, что положительно заряженные аминокислотные остатки «головы» взаимодействуют с отрицательно заряженными аминокислотами центрального домена. Кроме того, эти заряженные кластеры на поверхности филаментов могут являться потенциальными участками связывания с различными клеточными компонентами [19].

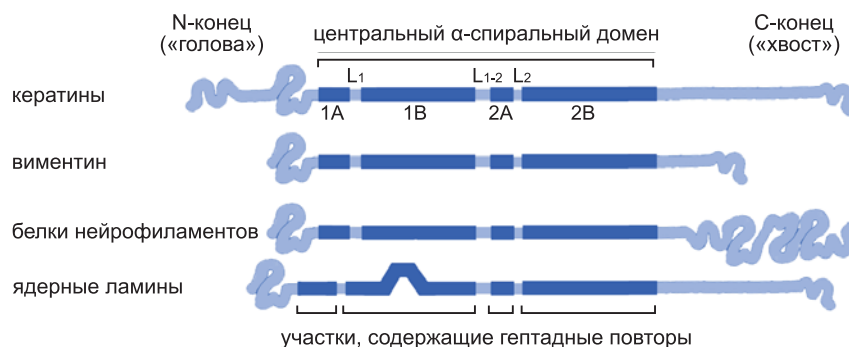


Рис. 1. Схематическое изображение молекул некоторых белков ПФ (основано на схеме, приведенной в [136]).

Центральный домен цитоплазматических ПФ длиной приблизительно 45 нм состоит из 310 аминокислот. У ядерных ламин из-за наличия дополнительных 42 аминокислот в сегменте 1B, центральный домен содержит 356 аминокислотных остатков, и его длина составляет 53 нм. Размеры сегментов, образующих α -спиральный домен ПФ, высоко консервативны: 1A – 35 аминокислот, 1B – 101 аминокислота, 2A – 19 аминокислот и 2B – 115 аминокислот [1]. Оказалось, что у различных по аминокислотной последовательности ПФ есть две области, расположенные на концах α -спирального домена, неизменные по своему составу. Одна из них – участок из 26 а.о., первые две трети сегмента 1A, 8 из которых абсолютно консервативны; другая – участок из 32 остатков на самом конце сегмента 2B, содержащий 13 абсолютно консервативных остатков [27]. С помощью метода поперечных сшивок (подробнее об этом методе см. ниже) установлено, что обе эти области участвуют во взаимодействии соседних димеров белков ПФ в зрелых филаментах [26, 28]. Еще одной характерной особенностью строения сегмента 2B является небольшое нарушение гептадной структуры. После 8 полных гептад у всех белков ПФ обнаружена вставка из 4 дополнительных остатков [29]. Это нарушение структуры также важно для сборки ПФ. Линкер L1 сильно варьирует по размеру и последовательности, в то время как последовательность линкера L2 высоко консервативна и состоит из 8 аминокислот у всех пяти типов ПФ [20].

Сильнее всего различаются по длине и аминокислотному составу неспиральные концевые домены белков ПФ – «голова» и «хвост». Например, длина «хвоста» у кератина K19 всего 9 остатков, а длина «хвоста» нестина – 1491 остатков [1, 30].

Таким образом, все белки ПФ имеют похожий по структуре и размеру центральный домен, несущий суммарный отрицательный заряд, и сильно варьирующие по длине и аминокислотному составу концевые домены, несущие суммарный положительный заряд.

НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ СБОРКИ: ОБРАЗОВАНИЕ ДИМЕРОВ

ПФ – это полимеры, которые обладают уникальной способностью к самосборке без участия дополнительных белков и, в отличие от микротрубочек и актиновых микрофиламентов, без дополнительной энергии в виде молекул АТФ или ГТФ. На основе данных о структуре белков ПФ был предсказан возможный механизм их сборки, который затем был в основном подтвержден электронно-микроскопическими наблюдениями, а также с помощью рентгеноструктурного анализа и ЭПР-спектроскопии.

Сборка ПФ происходит в несколько этапов (см. схему на рис.2). Сначала образуются димеры, – центральные домены двух полипептидных цепочек обвиваются друг относительно друга, образуя скрученную спираль с шагом 14 нм [31–33]. Димеры получаются в результате гидрофобных взаимодействий между аминокислотными остатками, расположенными в положениях *a* и *d* гептадных повторов взаимодействующих белковых молекул [34].

Предсказанная на основе первичной последовательности структура центрального домена и взаимодействие центральных доменов в димере были подтверждены и исследованы с помощью рентгеноструктурного анализа. Большой размер надмолекулярных структур ПФ затрудняет получение 3-мерных кристаллов, поэтому были закристаллизованы отдельные небольшие фрагменты белков ПФ [35]. Оказалось, что, вопреки ожиданиям, сегменты 1А виментина внутри димера расположены параллельно, то есть являются одиночными α -спиралями. Предполагается, что мономерные спирали сегмента 1А служат мобильными «соединителями» обращенной назад «головы» одной цепочки и сегментом 1А другой цепочки димера [35].

Нарушение гептадной структуры в сегменте 2В центрального домена также оказалось важной для сборки филаментов особенностью. Это нарушение приводит к локальному разматыванию скрученной спирали примерно на 28°. Следствием частичного раскручивания является другая взаимная ориентация функционально важных групп на N- и C-концах центрального домена виментина. Нарушение этой взаимной ориентации может приводить к неправильным внутримолекулярным взаимодействиям при сборке [35]. Действительно, было показано, что вставка трех аминокислотных остатков для восстановления гептадной

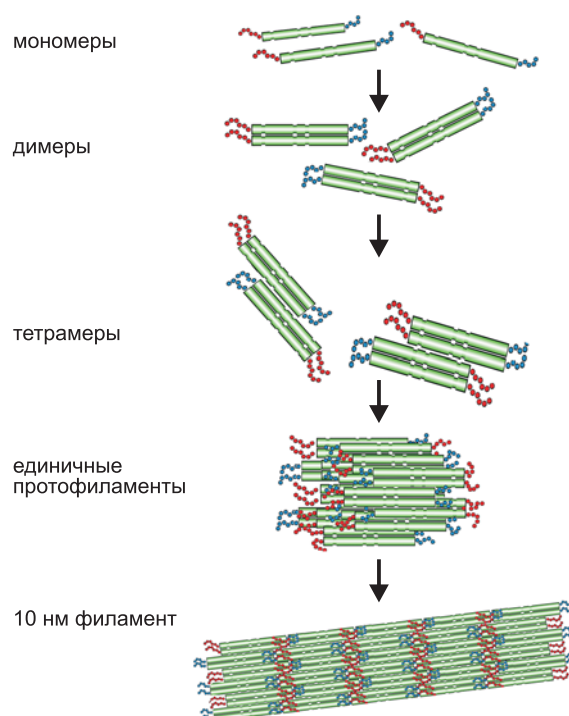


Рис. 2. Схема, показывающая отдельные этапы самосборки ПФ (показана половина единичного протофиламента, состоящая из двух октамеров).

структуры хотя и не затрудняет образование субъединиц филаментов, однако препятствует их сборке в зрелые филаменты [36].

Особую роль в сборке ПФ играют концевые участки центрального домена. Исследования формирования филаментов *in vitro* показали, что даже точечная замена аминокислоты на N-конце сегмента 1A или на C-конце сегмента 2B приводит к серьезным нарушениям их структуры [37].

Данные, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа, были подтверждены еще одним методом – ЭПР спектроскопией. Этот метод позволяет получить информацию о структурных элементах и механизме сборки. Он основан на использовании спиновых меток, представляющих собой химические группы, содержащие неспаренный электрон (например, оксида азота), которые ковалентно присоединяют к определенным участкам белка. Благодаря неспаренному электрону, такие группы обнаруживаются в магнитном поле, как имеющие магнитный момент с характерным спектром.

Ширина линии спектра отражает наличие определенной вторичной структуры и степень взаимодействия участков в третичной структуре. Величина (амплитуда) уширения линии спектра определяется магнитным взаимодействием меток, и может быть оценена в терминах межспиновых расстояний, которые могут быть использованы для определения расположения субъединиц в процессе сборки. Спектры чувствительны к ре-ориентации молекул, их локальной структуре и динамике боковых цепей белковых молекул, которые содержат ЭПР-метку. Для виментина было получено более 100 вариантов белка, содержащих спиновую метку в различных положениях. Исследования с помощью ЭПР спектроскопии показали, что центральный домен ПФ представляет собой скрученную спираль, за исключением отдельных участков, и подтвердили принципы сборки димеров в тетрамеры, ранее полученные на основе метода поперечных сшивок [38].

РОЛЬ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА («ГОЛОВЫ»)

Когда исследования структуры ПФ только начинались, казалось, что для сборки ПФ необходим только центральный домен, а концевые домены участвуют во взаимодействии с соседними димерами и с другими компонентами клетки [31]. Однако позже выяснилось, что N-концевой домен играет важную роль в образовании и стабилизации ПФ. Молекулы виментина и кератинов, лишенные этого домена, не собираются в филаменты. Взаимодействие положительно заряженного N-концевого домена и кислого центрального домена является, по-видимому, решающим для первой фазы сборки [39]. Это было детально исследовано в экспериментах с постепенным укорачиванием полипептидной цепи на N-конце виментина. Наиболее важной оказалась аминокислотная последовательность на самом конце «головы» виментина. Эта часть молекулы включает в себя нонапептид, последовательность которого SSYRRIFGG высоко консервативна среди всех ПФ III типа [40]. Делеция или модификация этой последовательности у виментина из *Xenopus laevis*, так же как и добавление пептидов с аналогичной или идентичной последовательностью во время сборки *in vitro*, нарушала образование ПФ. Однако при удалении первых четырех аминокислотных остатков нонапептида видимого эффекта не наблюдалось [40].

Анализ мутантов виментина мыши с делециями различных участков на N-конце позволил выявить наиболее существенные для полимеризации виментина остатки [41]. Оказалось, что важны первые 24 аминокислотные остатка. Их удаление, также как и всей «головы», делает сборку ПФ абсолютно невозможной. Удаление с 25

по 38 аминокислоту не влияет на способность белка к полимеризации как *in vitro*, так и *in vivo*. В то же время, удаление остатков с 25 по 63 приводит к тому, что ПФ не собираются *in vitro*, хотя могут образовываться *in vivo*. Удаление фрагмента, который еще на 5 остатков длиннее (с 25 по 68), приводит к образованию мутантного белка, не способного к полимеризации. Неожиданным оказалось, что в результате небольшой делеции внутри этой области (с 44 по 69 а.о.) белок образовал ПФ *in vivo*, но не *in vitro*. Удивительно, но если дальше удалять остатки, начиная с 44, то получается белок, который либо полностью способен полимеризоваться (Δ44–95), либо совершенно не способен к этому (Δ44–103). Это привело к предположению, что, возможно, специфические остатки в С-концевой части «головы» могут играть решающую роль в сборке ПФ, что подтвердилось, когда обнаружили, что виментин Δ88–103 также не способен к сборке (*in vivo* и *in vitro*), в то время как виментин Δ40–95 способен образовывать ПФ [41]. По всей видимости, абсолютный размер делеции середины головного домена менее важен, чем расположение делетируемого участка. Из этих данных можно заключить, что для сборки ПФ *in vivo* необходимы аминокислотные остатки с 64 по 69. Кроме того, не считая последовательности на самом N-конце молекулы, для полимеризации виментина наиболее важны остатки с 97 по 103.

Средняя часть «головы» не столь существенна для сборки. Полагают, что эта часть N-концевой последовательности выступает из тетрамерного комплекса виментина, образуя петлю, и приближает нонапептидный участок SSYRRIFGG к центральному домену соседней белковой субъединицы, тем самым способствуя их связыванию [41].

На участие N-конца виментина в процессе сборки ПФ также косвенно указывают данные, полученные другой группой исследователей, показавших, что многочисленные участки внутри головного домена виментина могут быть фосфорилированы, если белок находится в растворе, и становятся недоступными для протеинкиназ, если он входит в состав ПФ [42].

С-КОНЦЕВОЙ ДОМЕН («ХВОСТ»)

Роль С-концевого домена виментина не так велика. Его удаление не приводит к нарушению сборки ПФ. Зато диаметр таких ПФ, построенных из виментина, лишённого «хвоста», оказывается на 3 нм больше, чем в случае использования молекул дикого типа. Иными словами, удаление С-концевого домена приводит к нарушению контроля толщины собирающегося филамента [43].

ОБРАЗОВАНИЕ ТЕТРАМЕРОВ

Следующий этап сборки – соединение димеров в более крупные комплексы. В случае цитоплазматических ПФ – это объединение димеров в тетрамеры (рис. 2), что отличает их от ламинов, которые при сборке соединяются по механизму «голова-к-хвосту» образуя линейные полимеры [1, 44]. В образовании тетрамеров участвуют электростатические взаимодействия чередующихся зон положительного заряда, избыток которых имеется в N-концевом домене виментина, и отрицательных, преобладающих в центральном домене молекулы [34].

Существует несколько моделей соединения димеров в тетрамеры, предложенных на основе результатов, полученных методом поперечных сшивок (рис. 3). Этот метод заключается в образовании ковалентной связи между определенными остатками аминокислот соседних молекул с помощью специальных реагентов, имеющих две реакционные группы, взаимодействующие с этими остатками. Чаще других используются реагенты, которые реагируют с лизином или цистеином. Полученные комплексы выделяют, очищают, расщепляют протеазами и анализируют при помощи хроматографии. Сравнение хроматографических профилей образцов, полученных до и после расщепления сшивок периодатом натрия, позволяет обнаружить

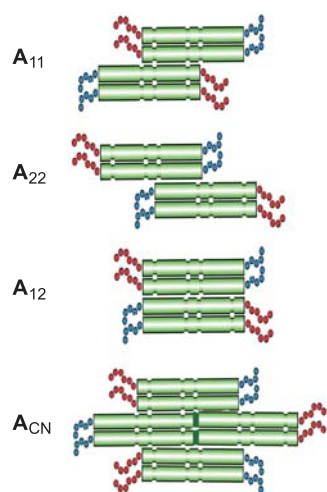


Рис. 3. Схема, показывающая три возможных модели образования тетрамеров при сборке ПФ.

несколько возможных вариантов поперечных сшивок между молекулами или внутри одной молекулы. Пики на хроматограммах, которые исчезают после обработки периодатом натрия, соответствуют молекулам, которые образовались в результате поперечных сшивок между разными молекулами или внутри одной молекулы белка. Таким образом, этот метод позволяет обнаружить участки белка(ов), расположенные в непосредственной близости друг от друга, т.е. выяснить взаимное расположение субъединиц в филаментах. Большинство пептидов, полученных в результате протеолитического расщепления виментиновых ПФ, оказались довольно короткими (меньше 10 остатков), так что их аминокислотный состав позволил однозначно определить

расположение пептида внутри последовательности виментина [26]. В некоторых случаях, когда обнаруживался только один пептид после обработки периодатом, это означало, что поперечная сшивка образовалась внутри цепи. Многие остатки лизина образовывали поперечные сшивки в нескольких различных реакциях.

Для виментина были найдены 16 уникальных поперечных сшивок, 5 из которых возникают между двумя параллельными цепочками, находящимися «в регистре» и образующими двухцепочечную скрученную гомодимерную молекулу виментина. 11 поперечных сшивок могут быть отнесены к трем возможным моделям межмолекулярного взаимодействия, изображенным на рис. 3. Модель A_{11} (6 поперечных сшивок) предполагает, что два антипараллельных димера взаимодействуют таким образом, что 1В сегменты их центральных доменов значительно перекрываются [26]. Согласно другой модели, A_{22} (3 поперечные сшивки), два антипараллельных димера перекрываются в области сегментов 2В. В третьей модели A_{12} (2 поперечных сшивки) два димера антипараллельны и полностью перекрываются (расположены «в регистре»).

Существование этих трех типов взаимодействия димерных молекул было подтверждено для кератинов. Для виментина предложена еще и четвертая модель взаимодействия между димерными комплексами в составе филаментов – A_{CN} . Если два тетрамера, образованные согласно моделям A_{11} и A_{22} , оказываются рядом, то по одному димеру из каждого тетрамера будут взаимодействовать по принципу «голова-хвост». В этом случае 5–10 N-концевых остатков сегмента 1А одного димера будут перекрываться с 5–10 С-концевыми остатками сегмента 2В другого димера (рис. 3) [26]. Сходные данные были получены и для структуры десминовых ПФ [45, 46].

ДАЛЬНЕЙШИЕ ЭТАПЫ СБОРКИ

До недавнего времени структурную информацию о сборке ПФ можно было получить, только наблюдая препараты, зафиксированные через определенные промежутки времени, при помощи электронного микроскопа. Позднее для наблюдения за ходом процесса сборки был применен метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (small angle x-ray scattering – SAXS), который используется для исследования макромолекул в растворе [47, 48]. Оказалось, что сборка виментиновых ПФ *in vitro* происходит с последовательным образованием различных олигомеров, включающих тетрамеры, октамеры и единственный протофиламент, состоящий из четырех октамеров (рис. 2). Измерения, проведенные с помощью этого метода,

указывают на то, что димеры в тетрамере находятся на расстоянии 3,4 нм друг от друга, в то время как расстояние между скрученными спиралями – 1,5 нм. Возможно, такое разъединение связано с тем, что непосредственный контакт кислых центральных доменов электростатически неблагоприятен. Также оказалось, что соединение димеров в тетрамер в соответствии с моделью A_{11} происходит во многом благодаря второй половине головного домена (35–70 остатков), то есть электростатическое притяжение положительно заряженной «головы» и кислого центрального домена, по-видимому, является движущей силой [34, 49].

Конечная субъединица ПФ – протофиламент единичной длины (65 нм) в среднем состоит из четырех октамеров. В поперечном сечении протофиламент единичной длины скорее овальный, чем круглый. Согласно измерениям, полученным с помощью сканирующего электронного микроскопа, отдельные протофиламенты могут значительно различаться по количеству образующих его виментиновых цепочек.

На последнем этапе сборки происходит уплотнение субъединиц филаментов до толщины 10–12 нм. Возможно, этот этап также сопровождается перестройкой внутри филаментов, потому что варианты сборки тетрамеров A_{22} и A_{12} обнаруживаются только в зрелых структурах [49].

Существование тетрамеров виментина *in vivo* уже доказано, а вот вопрос о присутствии других промежуточных компонентов сборки, таких как октамеры или единичные филаменты, требует дальнейших исследований [49, 50].

Количество протофибрилл (октамеров), приходящихся на поперечный срез ПФ, варьирует от двух до шести, в зависимости от типа ПФ и условий сборки [51]. Предполагается, что каждая протофибрилла состоит из двух протофиламентов, а каждый протофиламент, в свою очередь, состоит из тетрамеров, соединенных конец-к-концу. Таким образом, по ширине один филамент может состоять из 24–40 полипептидов (обычно из 32 – 8 тетрамеров), как показано для виментина [20]. Толщина может меняться не только от одного филамента к другому, но даже в пределах одного филамента. [51]

ПФ В КЛЕТКЕ

Зрелые ПФ и их предшественники динамичны и подвижны внутри клеток. Сборка, разборка и перемещение ПФ в клетках происходят непрерывно. Образование внутриклеточной сети различных типов ПФ в разных типах клеток происходит по-разному. Это может быть связано

с тем, что ПФ взаимодействуют с разными типами молекулярных моторов и другими факторами [52].

Субъединицы ПФ и зрелые полимеры находятся в цитоплазме в равновесии, и включение новой субъединицы может происходить в любом месте зрелого филамента. Однако образование сети ПФ начинается около ядра. Перемещаются в клетках не только отдельные субъединицы, но и зрелые фибриллы. Для виментиновых ПФ было показано, что они могут перемещаться в цитоплазме как по

направлению к клеточной поверхности, так и по направлению к ядру. Средняя скорость перемещения длинных ПФ составляет 0,2–0,3 мкм/мин, субъединицы ПФ двигаются быстрее (1–2 мкм/сек), в основном вдоль микротрубочек [53, 54]. Большинство из них (65–70%) перемещается к периферии клетки. Способность виментиновых субъединиц двигаться вдоль микротрубочек в разном направлении объясняется их ассоциацией с моторными белками кинезином и динеином. Связывание с кинезином обуславливает движение виментиновых филаментов и их субъединиц к плюс-концу микротрубочек и к поверхности клетки [55]. Движение к минус-концу микротрубочек, к ядру, обусловлено взаимодействием с моторным комплексом, состоящим из динеина и динактина [56]. По-видимому, эти взаимодействия необходимы для формирования и поддержания сети ПФ (рис. 4). Длинные виментиновые ПФ связываются с ПФ-ассоциированными белками (IFAP – intermediate filament associated proteins), например, с плектином, который образует поперечные связи между отдельными ПФ и другими структурами цитоскелета, тем самым препятствуя их движению. По-видимому, такое взаимодействие необходимо для стабилизации ПФ в особых областях цитоплазмы, подвергающихся механическому стрессу или деформации [52].

В отличие от виментиновых ПФ, состоящих из одного белка, кератиновые ПФ всегда являются гетерополимерами. Поэтому для поддержания стабильной сети кератиновых филаментов необходим баланс между кератинами I и II типа, – избыток кератина одного из типов приводит к нарушению сети ПФ. Интересно, что в клетках,

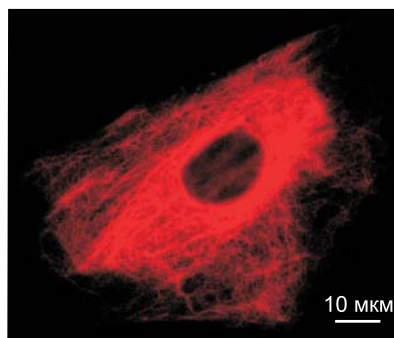


Рис. 4. Сеть виментиновых ПФ в мышечном фибробласте, выявленная при помощи иммуно-флуоресценции.

одновременно экспрессирующих кератин и виментин, длинные кератиновые филаменты двигаются в 3 раза медленнее виментиновых (0,06 мкм/мин), а кератиновые субъединицы в 15 раз медленнее виментиновых субъединиц. Кроме того, транспорт кератиновых субъединиц в основном направлен к ядру (84%). Возможно, причина этих различий заключается в разной способности кератинов и виментина связываться с микротрубочками и моторными белками [57]. Действительно, большая часть кератиновых субъединиц ассоциирована с сетью актиновых микрофиламентов, и динамические свойства кератиновых ПФ обусловлены взаимодействием с миозином. А поскольку миозин перемещается медленнее моторных белков, ассоциированных с микротрубочками, этим, возможно, и объясняются различия в скорости перемещения кератинов и виментина внутри одного типа клеток [52].

Особый интерес представляет формирование системы ПФ в нейронах, называемых нейрофиламентами. Отростки этих клеток могут достигать длины порядка метра. Если бы транспорт ПФ происходил с той же скоростью, что и медленный транспорт других структур цитоскелета (0,3–8 мм/день), то понадобились бы годы, чтобы они могли достичь дистальных областей отростков [58]. Однако субъединицы нейрофиламентов перемещаются вдоль аксона со скоростью, равной 1,8 мкм/сек [59], так как они транспортируются по микротрубочкам при помощи кинезина и динеина [52, 58]. Правда, движение этих структур прерывается долгими паузами, так что движутся они только 27% времени, а в зрелых сенсорных аксонах нейрофиламенты находятся в покое около 99% времени [58].

В заключение можно сказать, что различные типы ПФ имеют значительно различающиеся N- и C-концевые домены, которые участвуют в их сборке. Они также принимают участие и во взаимодействии ПФ с различными белками, такими, например, как молекулярные моторы или IFAP, которые, в свою очередь, помогают им в распределении и формировании внутриклеточных сетей ПФ. Более подробно механизмы регуляции сборки ПФ и их взаимодействие с различными белками мы рассмотрим в следующих разделах.

III. ФУНКЦИИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ

По сложившимся представлениям, основной функцией ПФ является поддержание клеточной и тканевой целостности, основанной на их механических свойствах и способности к самосборке [1]. Повышенный интерес к их механической роли связан с тем, что известны нас-

ледственные заболевания, вызванные нарушениями структуры ПФ в тканях, подверженных механическому стрессу, таких как кожа, мышцы и кровеносные сосуды. Однако ПФ имеются во всех типах клеток, в том числе и не подверженных механическому стрессу, а нарушение их сетей также приводит к патологическим последствиям. Существуют, например, серьезные болезни, связанные с нарушением функций ПФ в нервной системе [60]. Этот факт, а также динамическая природа ПФ и наличие большого количества связанных с ними сигнальных белков, указывает на то, что ПФ не только обеспечивают устойчивость к внешним воздействиям, но также выполняют другие специализированные функции в клетках. Хотя эти функции в различных типах клеток пока недостаточно изучены, уже сейчас видно, как велико их значение. По-видимому, немеханическая функция ПФ связана с их участием во внутриклеточном распределении органелл и белков, а также в транспорте липидов [61].

Функции ПФ обусловлены их взаимодействием с многообразными клеточными компонентами. Так, механическую целостность клеток ПФ обеспечивают, связываясь с другими компонентами цитоскелета – микротрубочками, микрофиламентами и плазматической мембраной, взаимодействие с которой происходит в особых участках прикрепления: в десмосомах и полудесмосомах эпителиальных клеток и в местах фокальных контактов фибробластов [19]. Для взаимодействия с такими органеллами, как митохондрии, аппарат Гольджи, эндосомы и лизосомы ПФ связываются с различными компонентами мембран этих органелл. Это связывание обеспечивается большим семейством белков FAP (белки, ассоциированные с ПФ) [62], но, по-видимому, может происходить и непосредственно. Ниже мы рассмотрим некоторые примеры таких взаимодействий более подробно.

МЕХАНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

Взаимодействие с цитоскелетом и плазматической мембраной

Как показывают электронно-микроскопические исследования, различные структуры цитоскелета связаны между собой и с мембранными органеллами. Различимые на электронных микрофотографиях «мостики» долгое время считались связующими структурами неизвестной природы. Позже выяснилось, что за связь многих клеточных органелл с микротрубочками отвечают молекулярные моторы – кинезины и динеины. Роль кинезина для взаимодействия ПФ с микротрубочками была продемонстрирована с помощью антител, блокирующих работу этого моторного белка [55]. Оказалось, что радиальное распределение ПФ вдоль микротрубочек осуществляется благодаря кинезин-зависимому транспорту.

Но основную роль во взаимодействии ПФ со многими клеточными компонентами играют IFAP, которые соединяют их и с органеллами, микрофиламентами и микротрубочками, и с межклеточными контактами [19]. Такие белки, как десмоплакин, BPAG1 (bullouse pemphigoid antigen 1) и плектин относятся к семейству плакинов. Все они содержат очень длинный центральный α -спиральный домен, который образует скрученную спираль при образовании димерного комплекса. Центральный домен фланкирован неспиральным N-концевым доменом, который может содержать места связывания с актином (actin binding domain – ABD) и/или места связывания с микротрубочками (microtubule binding domain – MBD), и C-концевым доменом, который, помимо участков связывания с ПФ, может содержать различное количество повторяющихся доменов А, В, С, типичных для десмоплакина [64].

Наиболее хорошо изучен белок плектин, который может соединять три различные цитоскелетные системы и взаимодействовать с различными белками (рис. 5). Мутации в этом белке приводят к серьезным заболеваниям, таким как буллезный эпидермолиз, сопровождающийся появлением волдырей на коже, и мышечная дистрофия [65]. При помощи электронной микроскопии можно увидеть, что плектин образует боковые отростки, отходящие от ПФ, длиной примерно 200 нм и толщиной 2–3 нм [63]. Способность плектина связываться с ПФ обоими концами навела на мысль, что концы его цепи одинаковы по своим свойствам, и его молекулы являются гомотетрамерами. Количественный анализ комплексов виментин-плектин показал, что на участок ПФ длиной 1 мкм приходится 10 молекул плектина [63]. В мышцах плектин колокализуется с десминовыми ПФ около Z-дисков и структур, образующих внутриклеточный миофибриллярный каркас [66]. У мышей, лишенных плектина, наблюдались серьезные нарушения структуры мышц [67], а в культивируемых фибробластах и клетках астроглии, полученных из таких мышей, были обнаружены значительные изменения архитектуры и динамики актинового цитоскелета [68].

Десмоплакин, другой белок семейства плакинов, соединяет различные ПФ с десмосомами, при участии плакоглобулина и плакофилинов, семейство которых непрерывно растет. Экспрессия плакофилинов тщательно регулируется в клетках; например, ген плакофилина-2 экспрессируется одновременно с генами, кодирующими кератины 8, 18, и 19, что указывает на регуляцию экспрессии, специфичную для определенного типа клеток. У пациентов, имеющих наследственные заболевания, характеризующиеся непрочностью кожи и эпидермальной дисплазией, были обнаружены мутации в гене этого белка. Поскольку

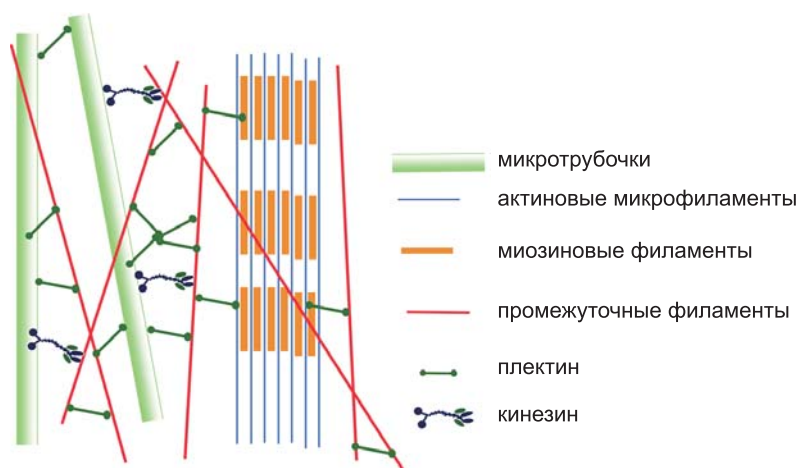


Рис. 5. Схематическое изображение различных взаимодействий структур цитоскелета с участием плектина и кинезина (основано на данных из [63]).

ген плакофилина-2 экспрессируется во всех внутренних органах, мутации в нем могут приводить к очень тяжелым последствиям [19].

И плектин, и белок BRAG1 представлены несколькими изоформами, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга их мРНК [69, 70]. Различие в структуре этих изоформ обусловлено, по-видимому, их способностью взаимодействовать в разных типах клеток с разными компонентами [70].

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНЕЛЛ

Вплоть до недавнего времени никто не предполагал, что ПФ могут участвовать в мембранном транспорте, однако недавно было показано, что ПФ играют важную роль не только в транспорте мембранных органелл, но и в их функционировании [60].

Митохондрии и ПФ

Одним из наиболее важных для физиологии клеток типом мембранных органелл являются митохондрии. Они располагаются около ПФ в различных типах клеток, и это, по-видимому, играет важную роль. Так оказалось, что у митохондрий в сердечных и скелетных мышцах мышей, лишенных десмина, изменяется морфология и внутриклеточная локализация. Кроме того, в таких митохондриях наблюдается прогрессирующее разрушение матрикса, а сами они

собираются в группы около сарколеммы [71, 72]. Все эти изменения приводят к нарушению функций митохондрий: снижается максимальная скорость дыхания, АДФ-стимулируемое потребление кислорода, исчезает креатинкиназа, падает уровень цитохрома с. Кроме того, антиапоптотический белок Bcl-2 (B-Cell Lymphoma oncogene) перемещается с внутренней мембраны митохондрий на наружную [72].

Взаимодействие митохондрий и ПФ происходит не только в мышцах, но и в других типах клеток. В нашей лаборатории было показано, что подвижность митохондрий в культивируемых фибробластах ингибируется их взаимодействием с виментиновыми ПФ [73], и это взаимодействие находится под контролем протеинкиназы С (ПКС). Другая группа исследователей показала, что фосфорилированные белки нейрофиламентов селективно связываются *in vitro* с митохондриями, и это связывание, как показали опыты с потенциалзависимыми красителями, зависит от уровня мембранного потенциала митохондрий [74]. Недавно была найдена одна из возможных причин тяжелого наследственного заболевания, нейропатии Шарко-Мари-Тус, которой оказались мутации в белке нейрофиламентов NF-L, приводящие к скоплению митохондрий в теле нейрона, уменьшению количества митохондрий в аксоне и снижению аксонального транспорта нейрофиламентов [75]. Нарушения в распределении митохондрий в клетках отмечено также и у больных буллезным эпидермолизом, который вызывается мутациями в кератинах K5 или K14 [76].

Таким образом, влияние ПФ на функции митохондрий не вызывает сомнений, однако многие детали этого взаимодействия пока не ясны. Как осуществляется функциональная связь и какие дополнительные белки принимают участие во взаимодействии ПФ и митохондрий еще предстоит выяснить [61].

Аппарат Гольджи и ПФ

Аппарат Гольджи располагается вдоль ПФ около центра организации микротрубочек. Взаимодействие аппарата Гольджи и виментиновых ПФ хорошо изучено, и найдены белки, с помощью которых происходит их связывание. Один из них – форм-имино-трансфераза циклодеаминаза (FTCD), белок, расщепляющий гистидин. Ген этого белка экспрессируется в клетках всех типов, но особенно высок уровень его экспрессии в клетках печени. Как показали эксперименты, с виментином может связываться мутантная форма этого белка, не обладающая ферментативной активностью [77, 78].

Другой белок аппарата Гольджи GM130 при разрушении микротрубочек нокодазолом, приводящем к нарушению распределения аппарата Гольджи, также локализуется вдоль виментиновых филаментов [77]. Третий белок, MICAL (molecule interacting with CasL), непосредственно связывает виментин и ГТФазу Rab1, которая является главным участником везикулярного транспорта от ЭР к аппарату Гольджи [79].

Таким образом, связь между ПФ и аппаратом Гольджи, изученная на культуре клеток, играет, по-видимому, важную физиологическую роль. Однако пока остается загадкой почему на животных моделях, *ex vivo*, не удалось показать, что отсутствие ПФ приводит к какому-либо серьезному нарушению функции аппарата Гольджи [61].

Эндосомы, лизосомы и ПФ

Другим примером участия ПФ в функциях мембранных органелл является их роль в транспорте эндосом и лизосом. Установлено, что виментин, периферин и α -интернексин связываются с адаптерным белком AP-3 [60, 80]. Белок AP-3 – это гетеротетрамерный адаптерный комплекс, который участвует в транспорте везикул между эндосомальным и лизосомальным компартментами и регулирует поступление белков в лизосомы и тканеспецифичные органеллы – меланосомы, гематопозитические гранулы и синаптические везикулы. Мутации в этом белке приводят к альбинизму, продолжительным кровотечениям и легочному фиброзу – болезни, известной как синдром Германски-Пудлак [80]. С ПФ белок AP-3 взаимодействует при помощи специализированного домена субъединиц β 3A и β 3B, который также необходим для выполнения AP-3 функции, связанной с сортировкой белков, и это единственный его участок, взаимодействующий с виментином [80].

Отсутствие в клетках AP-3 или виментина приводит к появлению одинакового фенотипа, – в обоих случаях нарушается распределения ионов цинка. В фибробластах, лишенных AP-3 или виментина, снижается его уровень. Внутриклеточный цинк в основном локализуется в эндоцитарных везикулах и в эндосомах, а его запасание зависит от тока ионов хлора через их мембраны. Каналы, через которые поступает хлор, регулируют и pH в эндосомах, и запасание в них ионов цинка. Белки, образующие эти каналы, переносятся мембранными везикулами, с которыми связан адаптерный комплекс AP-3. Предполагается, что отсутствие комплекса AP-3 в клетках приводит к нарушению pH внутри эндосом, который определяется транспортом ионов хлора. У клеток, лишенных виментина, содержание цинка в везикулах падает в 40 раз [80].

Другой груз, за транспорт которого отвечает комплекс AP-3, это молекула LAMP-2 (lysosome associated membrane protein). Она представляет собой резидентный белок эндосом и лизосом, который нужен для их слияния с вакуолями автофагосом, которые образуются из эндоплазматического ретикулума, охватывают органеллу, предназначенную для расщепления, и доставляют ее к лизосомам или эндосомам [81]. Показано, что нарушение сборки ПФ приводит к нарушению образования вакуолей автофагосом, однако механизм их взаимодействия пока не известен [82]. Существует предположение, что совместное действие ПФ и AP-3 связано с транспортом белка LAMP-2. Важно отметить, тем не менее, что локализация эндосом и лизосом от ПФ не зависит.

Ядро и ПФ

Одной из важных функций ПФ является локализация ядер. Ядро в клетке имеет определенное положение, которое обусловлено его взаимодействием с различными компонентами цитоскелета. Оболочка ядра представляет собой специализированное продолжение эндоплазматического ретикулума (ЭР), имеющее две мембраны и перинуклеарное пространство между ними, отделяющее ядро от цитоплазмы. Наружная ядерная мембрана соединяется с ЭР, а в внутренней прилегает ламина, специальная структура, представляющая собой сеть белковых фибрилл, состоящих из белков ПФ V типа. Наружная и внутренняя мембраны соединяются между собой в местах ядерных пор. Структура оболочки ядра ставит два вопроса, связанные с расположением ядра в клетке: во-первых, должны существовать белки, которые бы связывали цитоскелет с ядерным матриксом, то есть, осуществляющие связь через две мембраны и межмембранное пространство, и, во-вторых, должны существовать белки, которые позволяли бы отличать наружную оболочку ядра от ЭР.

В эукариотических клетках были найдены такие белки. Они образуют два семейства KASH и SUN, которые соединяют наружную и внутреннюю мембрану ядра и связывают цитоскелет и ядерные ламины [83]. Белки SUN имеют консервативный домен на С-конце и, по крайней мере, один трансмембранный домен. Предполагается, что эти белки располагаются на внутренней мембране ядра и взаимодействуют своим С-концом с белками KASH, а их N-конец взаимодействует с ламинами и может служить линкером для хромосом во время мейоза. Белки семейства KASH имеют несколько различных функций. На С-конце они содержат трансмембранный домен, который необходим для локализации в оболочке ядра; N-концевой домен этих

белков выходит наружу в цитоплазму и может взаимодействовать с актиновыми филаментами, центросомами и ПФ [83].

Роль ПФ в локализации ядра изучена пока недостаточно. Скорее всего, она заключается в удержании ядра на месте и в привлечении белков, которые могли бы взаимодействовать с остальными компонентами цитоскелета [83]. Влияние цитоплазматических ПФ на локализацию и форму ядра было исследовано на примере культивируемых клеток, лишенных виментина, – в таких клетках наблюдалось впячивание ядерной мембраны и другие нарушения [84]. В других работах было показано, что в миоцитах, лишенных десмина, ядра располагаются неравномерно и образуют агрегаты [85], а в клетках мышшиного эпидермиса мутация в кератине K10 или его отсутствие приводит к изменениям размера и формы ядер [86]. Впечатляющие результаты недавно были получены на мышцах, лишенных десмина в результате нокаута его гена. Если в нормальных клетках скелетных мышц сотни ядер расположены равномерно и отдельно друг от друга, то в мышцах животных, лишенных десмина, ядра собирались в плотные кластеры. Кроме того, они имели овальную форму и не могли выстроиться вдоль длинной оси клеток. Такой же фенотип имели клетки с мутантным белком Syne-1 из семейства белков KASH [87], что свидетельствовало об участии обоих белков в локализации ядер в мышечных клетках.

Недавно обнаруженный белок несприн-3 из семейства KASH, также, по-видимому, соединяет наружную мембрану ядра и ПФ [88]. Известно, что этот белок локализуется на наружной ядерной мембране и в межмембранном пространстве взаимодействует с белком SUN, локализованным во внутренней ядерной мембране (рис. 6). Кроме того, он взаимодействует с плектином, который, как упоминалось выше, может быть связан с ПФ и актином. Поскольку несприн-3 связывается с актинсвязывающим доменом плектина, этот белок обеспечивает его взаимодействие с ПФ.

Другие функции ПФ

К другим известным функциям ПФ можно отнести их участие в поддержании липидного состава мембран. Так, в преадипоцитах отсутствие или нарушение структуры виментиновых ПФ вызывало снижение стабильности триглицеридов, а в фибробластах и клетках надпочечников приводило к нарушению метаболизма холестерина [89]. Целый ряд данных указывает на то, что изменения в липидном составе мембран возникают в результате повреждений, происходящих на поздних стадиях эндосомального пути. Оказалось,

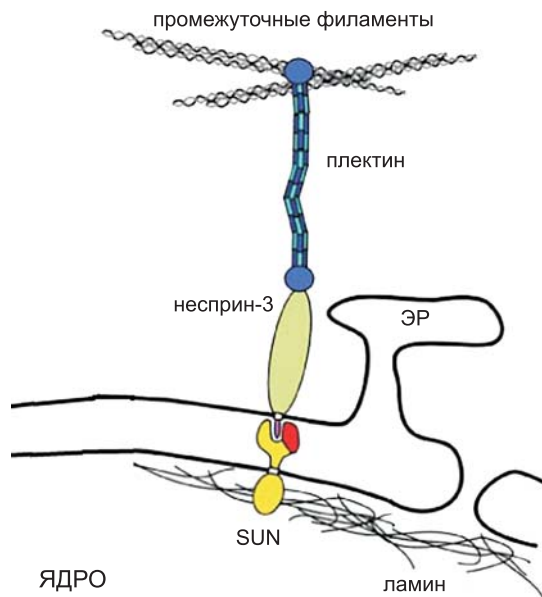


Рис. 6. Схема, показывающая предполагаемое участие несприна-3 во взаимодействии ядерной оболочки с сетью ПФ (основано на схеме из [83]).

ЭР – эндоплазматический ретикулум, SUN – интегральный белок ядерной мембраны.

что с виментиновыми ПФ взаимодействует один из ключевых ферментов холестеринового обмена – оксистеролсвязывающий белок [90]. В клетках, лишенных ПФ, наблюдается повышение синтеза холестерина, и снижение образования из него сложного эфира. Предполагают, что это также связано с нарушениями перехода холестерина в эндосомальные и лизосомальные мембраны. Также замедляется созревание гликофинголипидов в клетках, лишенных ПФ, потому что затруднен их транспорт из аппарата Гольджи в эндосомальную систему. Нарушения транспорта липидов говорят о том, что, по-видимому, роль взаимодействия транспортных везикул с ПФ чрезвычайно важна.

В заключение можно отметить многообразие функций ПФ в клетке. Наряду с другими компонентами цитоскелета они обеспечивают механическую прочность клетки, участвуют в правильном расположении внутриклеточных органелл и ядра и в транспорте белков. Однако некоторые детали и тонкие механизмы этих взаимодействий пока остаются невыясненными, как и роли многих участников.

IV. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ ИХ ФУНКЦИЙ

Как видно из вышесказанного, основой разнообразных функций ПФ в клетках является их взаимодействие со многими структурами и отдельными белками. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что эти взаимодействия находятся под строгим контролем внешних факторов и быстро перестраиваются в ответ на различные сигналы [91–93]. Одним из наиболее хорошо изученных способов регуляции функций ПФ является фосфорилирование белков ПФ различными протеинкиназами. Так, фосфорилирование играет основную роль в регуляции структуры ПФ и процесса их сборки [94, 95]. Кроме того, при помощи фосфорилирования могут контролироваться и такие функции, как связь с IFAP и тканеспецифические взаимодействия ПФ [96, 97], а также изменения структуры ПФ при стрессе [98–100]. В ряде исследований было продемонстрировано непосредственное участие самих ПФ в проведении сигналов, поскольку активность многих регуляторных белков оказалась зависимой от взаимодействия с ними. Равновесие между полимерным и деполимеризованным виментином, контролируемое фосфорилированием, регулирует активность и локализацию Rho-киназы [101, 102]. Чтобы дать представление о различных способах регуляции функций ПФ путем фосфорилирования, остановимся более подробно на некоторых примерах.

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПФ *IN VITRO*

В ранних работах, посвященных исследованию структуры и функций ПФ, было установлено, что фосфорилирование *in vitro* немедленно вызывает их деполимеризацию [103]. Тогда же, путем анализа фосфопептидов, полученных из фосфорилированного виментина, выяснилось, что протеинкиназа А (ПКА) и протеинкиназа С (ПКС) имеют различные участки фосфорилирования этого белка [103]. Дальнейшие исследования показали, что и другие ПФ разрушаются вследствие сайт-специфического фосфорилирования *in vitro* целым рядом протеинкиназ. В таблице представлены данные разных авторов, показывающие, что практически все белки ПФ фосфорилируются основными протеинкиназами, результатом чего в большинстве случаев является их деполимеризация *in vitro*. Из таблицы также видно, что участки фосфорилирования располагаются главным образом на N-концевых доменах белков, которые, как было сказано выше, важны для процесса сборки ПФ. В связи с этим уже в ранних работах высказывались предположения, что фосфорилирование белков ПФ в клетках является одним из механизмов регуляции их структуры [103].

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПФ *IN VIVO*

Первым подтверждением того, что в результате фосфорилирования сеть ПФ претерпевает в клетках значительные изменения, явились данные, полученные на клетках, входящих в митоз [104–106]. Оказалось, что протеинкиназа cdc2 (cell division cycle) активируется на ранних стадиях митоза, и фосфорилирование этой киназой виментина приводит к фрагментации и коллапсу сети ПФ во многих типах клеток. Кроме того, выяснилось, что вместе с киназой cdc2 в фосфорилировании виментина в митотических клетках может участвовать и ПКС [107]. Следует отметить, что из многочисленных участков фосфорилирования виментина, найденных в опытах *in vitro* для целого ряда протеинкиназ, далеко не все были обнаружены в опытах *in vivo*. Так активация ПКС форболовым эфиром не приводила к фосфорилированию виментина в интерфазных клетках по участкам, характерным для этого фермента [107]. В то же время, если клетки инъецировали конститутивно-активированным мутантом ПКС, фосфорилирование виментина наблюдалось. На основании этих данных авторы сделали вывод, что участие ПКС в фосфорилировании виментиновых ПФ зависит от локализации самой киназы, и в интерфазных клетках сеть ПФ для нее недоступна.

Другие протеинкиназы, вводимые в клетки, также вызывали нарушение или коллапс сети ПФ. Так, коллапс и фрагментация ПФ наблюдались после микроинъекции конститутивно-активированного мутанта ПКА в фибробласты [125] или экспрессии чужеродной СаМКП в астроцитах [91]. Сходные изменения наблюдались и в клетках, обработанных ингибиторами фосфатаз, что вызывало повышение уровня фосфорилирования белков ПФ [126]. Однако пока остается неясным, какую роль в физиологии клеток играет фосфорилирование белков ПФ многими протеинкиназами, поскольку перечисленные изменения ПФ обычно в интерфазных клетках не наблюдаются. Возможно, эти реакции участвуют в небольших перестройках сетей ПФ и носят локальный характер.

Значительный прогресс в изучении регуляторной роли протеинкиназ в реорганизации ПФ, достигнутый за последние годы, связан с использованием специфических антител, узнающих различные участки виментина и некоторых других белков ПФ, фосфорилированные известными протеинкиназами. Используя такие антитела, М.Инагаки с соавторами [127] показали, что после того, как киназа cdc2 фосфорилирует Ser55 виментина, с этим сайтом связывается и активируется протеинкиназа Polo 1, которая, в свою очередь, фосфорилирует Ser82. Другим примером успешного использования

Таблица.
**Фосфорилирование белков ПФ некоторыми
 протеинкиназами *in vitro***

ПФ	Протеинкиназа	Сайты фосфорилирования	Разборка филаментов <i>in vitro</i>	Литература
Виментин	РКА	Ser6, Ser24, Ser38, Ser46, Ser50, Ser65	+	[42, 108]
	РКС	Ser6, Ser8, Ser9, Ser20, Ser24, Ser25, Ser33, Ser38, Ser41, Ser50, Ser65	+	[42, 108]
	CaMKII	Ser38, Ser82	+	[109]
	Киназа cdc2	Ser41, Ser55	+	[110, 111]
	Киназа РАК	Ser25, Ser38, Ser50, Ser65, Ser72	+	[112]
GFAP	РКА	Ser7, Ser8, Ser13, Ser34	+	[113, 114]
	РКС	Ser8, Ser13, Ser34	+	[114]
	CaMKII	Ser13, Ser17, Ser34, Ser389	+	[106]
	Киназа cdc2	Ser8	-	[106]
	CF kinase	Ser13, Ser34		[115]
Десмин	РКА	Ser29, Ser35, Ser50	+	[116, 117]
	РКС	Ser12, Ser29, Ser38, Ser56	+	[117]
	Киназа cdc2	Ser6, Ser22, Thr64	+	[118]

фосфо-специфических антител в этой же лаборатории можно назвать обнаружение двух участков фосфорилирования виментина в процессе цитокинеза [127]. Было установлено, что для успешного разделения двух дочерних клеток необходимо участие Rho-киназы, фосфорилирующей Ser38 и Ser71 виментина [128], и киназы Avroga B, которая фосфорилирует Ser72 [129].

Другим очень плодотворным подходом в изучении фосфорилирования белков ПФ, которое происходит в клетках, оказалось применение масс-спектропии. Анализ фосфо-пептидов, которые образуются при расщеплении виментина, дает возможность очень точно определить уровень фосфорилирования этого белка по участкам, специфичным для известных протеинкиназ. При помощи масс-спект-

роскопического анализа в лаборатории Р.Голдмана была изучена роль фосфорилирования виментина по остаткам Ser38 и Ser72 ПКА для поддержания равновесия между полимерным и растворимым виментином [93].

Важно отметить, что один и тот же аминокислотный остаток виментина может фосфорилироваться разными протеинкиназами. Это хорошо видно из данных опытов *in vitro*, приведенных в таблице. Примером участия одного и того же аминокислотного остатка в разных сигнальных цепочках из работ, в которых изучалось фосфорилирование виментина *in vivo*, является участие протеинкиназы PAK в регуляции сокращения гладкомышечных клеток [92]. Оказалось, что эта киназа фосфорилирует Ser56 виментина в этих клетках (соответствует Ser55 виментина человека), и это приводит к частичной разборке ПФ и их ре-ориентации в клетках. Предполагается, что частичная разборка виментиновых ПФ вызывает перераспределение связанных с ними белков, участвующих в регуляции сокращения, таких как Rho-киназа и адапторный белок p-130 [92]. Таким образом, фосфорилирование этого аминокислотного остатка является ключевым для перестройки ПФ в митозе, но может участвовать и в других не менее важных процессах.

Итак, к настоящему времени известны в основном примеры фосфорилирования белков ПФ, связанные с процессами сборки-разборки этих цитоскелетных структур. Однако гораздо менее изучено участие фосфорилирования ПФ в регуляции их взаимодействий с различными компонентами клеток. Прогресс в этой области следует ожидать в недалеком будущем.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость более глубокого изучения принципов и механизмов функционирования ПФ в различных типах клеток диктуется, прежде всего тем, что нарушения, связанные с этими структурами цитоскелета являются причиной многих патологических состояний. К настоящему времени установлены мутации генов белков ПФ, лежащих в основе тяжелых наследственных заболеваний. Среди них есть такие, как наследственный буллезный эпидермолиз, связанный с мутациями кератин 5 и 14; миопатия и кардиомиопатия, вызванные нарушениями десмина; такие тяжелые неврологические заболевания, как амиотрофический латеральный склероз и болезнь Александра, связанные с мутациями периферина и GFAP, соответственно; болезнь Паркинсона и некоторые другие тяжелые нервные патологии, причи-

ной которых являются нарушения нейрофиламентов. (Подробные сведения можно найти на сайте Общества исследователей ПФ по адресу: www.interfil.org). Активные исследования, проводимые в этой области, имеют перед собой цель помочь или облегчить жизнь таким больным. В связи с этим большие надежды возлагаются на недавно предложенные методы генной терапии, которые могли бы скомпенсировать поврежденный ген.

Другим приложением фундаментальных знаний о ПФ явилось успешное использование образующих их белков в качестве маркеров различных злокачественных опухолей. До сих пор в раковой диагностике применяется иммуноцитохимический анализ ПФ, предложенный впервые К. Вебером в 1981 году [130]. Он основан на том, что в нормальных дифференцированных клетках содержатся определенные типы ПФ, характерные для данной ткани, а при ее злокачественном перерождении в опухолевых клетках начинают экспрессироваться гены других белков ПФ. Для многих видов опухолей тип «неправильного» белка ПФ может служить диагностическим маркером. В последнее время в связи с повышенным интересом к проблеме использования стволовых клеток многие исследователи обратили внимание на ПФ как удобный маркер клеточной дифференцировки. Действительно, выяснив, какой белок ПФ экспрессируется в клетках, можно легко и быстро определить их тип.

Таким образом, ПФ представляют собой важный компонент цитоскелета, который обладает многими уникальными свойствами и играет важную роль в физиологии клеток. Парадоксальным является тот факт, что в то время как без большинства белков ПФ животные не выживают, нокаут таких белков, как виментин [131] и GFAP [132], не приводит к летальному исходу. Полученные без этих генов мыши не только доживают до половой зрелости, но и дают потомство, причем в клетках, которые обычно содержат виментиновые или кислые глиальные филаменты, у этих животных вообще нет никаких ПФ. И если у животных, лишенных виментина, найдено довольно много различных патологий [133–135], то у мышей без GFAP не найдено никаких отличий от животных исходного дикого типа [132]. Это позволяет предположить, что в отсутствие этих белков некоторые их функции выполняются другими компонентами клетки. Тем не менее сама возможность получить полноценное животное, лишенное одного из компонентов цитоскелета в одной из жизненно-важных тканей, представляется удивительной и делает исследование ПФ еще более интригующим.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fuchs, E. and Weber, K.* (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 345–382.
2. *Kreplak, L. and Fudge, D.* (2007) *Bioessays*, **29**, 26–35.
3. *Toivola, D.M., Tao, G.Z., Habtezion, A., Liao, J. and Omary, M.B.* (2005) *Trends Cell Biol.*, **15**, 608–617.
4. *Herrmann, H. and Aebi, U.* (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 79–90.
5. *Coulombe, P.A. and Wong, P.* (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 699–706.
6. *Hesse, M., Magin, T.M. and Weber, K.* (2001) *J. Cell Sci.*, **114**, 2569–2575.
7. *Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R.* (1982) *Cell*, **31**, 11–24.
8. *Steinert, P.M., Idler, W.W. and Zimmerman, S.B.* (1976) *J. Mol. Biol.*, **108**, 547–567.
9. *Lazarides, E.* (1982) *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 219–250.
10. *Osborn, M.* (1983) *J. Invest. Dermatol.*, **81**, 104s–109s.
11. *Portier, M.M., de Nechaud, B. and Gros, F.* (1983) *Dev. Neurosci.*, **6**, 335–344.
12. *Monteiro, M.J. and Cleveland, D.W.* (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 579–593.
13. *Steinert, P.M., Idler, W.W., Cabral, F., Gottesman, M.M. and Goldman, R.D.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3692–3696.
14. *Lewis, S.A. and Cowan, N.J.* (1985) *J. Cell Biol.*, **100**, 843–850.
15. *Pachter, J.S. and Liem, R.K.* (1985) *J. Cell Biol.*, **101**, 1316–1322.
16. *Levy, E., Liem, R.K., D'Eustachio, P. and Cowan, N.J.* (1987) *Eur. J. Biochem.*, **166**, 71–77.
17. *Gerace, L. and Burke, B.* (1988) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **4**, 335–374.
18. *Perng, M.D., Zhang, Q. and Quinlan, R.A.* (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 2180–2188.
19. *Herrmann, H. and Aebi, U.* (2000) *Current Opinion in Cell Biology*, **12**, 79–90.
20. *Herrmann, H. and Aebi, U.* (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 749–789.
21. *Styers, M.L., Salazar, G., Love, R., Peden, A.A., Kowalczyk, A.P. and Faundez, V.* (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5369–5382.
22. *Tang, H.L., Lung, H.L., Wu, K.C., Le, A.H., Tang, H.M. and Fung, M.C.* (2007) *Biochem. J.*, **410**, 141–146.
23. *Gao, Y. and Sztul, E.* (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 877–894.
24. *Styers, M.L., Kowalczyk, A.P. and Faundez, V.* (2005) *Traffic*, **6**, 359–365.
25. *Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V. and Aebi, U.* (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 562–573.
26. *Steinert, P.M., Marekov, L.N. and Parry, D.A.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 24916–24925.
27. *Herrmann, H., Strelkov, S.V., Feja, B., Rogers, K.R., Brettel, M., Lustig, A., Haner, M., Parry, D.A., Steinert, P.M., Burkhard, P. and Aebi, U.* (2000) *J. Mol. Biol.*, **298**, 817–832.
28. *Wu, K.C., Bryan, J.T., Morasso, M.I., Jang, S.I., Lee, J.H., Yang, J.M., Marekov, L.N., Parry, D.A. and Steinert, P.M.* (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3539–3558.
29. *Brown, J.H., Cohen, C. and Parry, D.A.* (1996) *Proteins*, **26**, 134–145.
30. *Michalczyk, K. and Ziman, M.* (2005) *Histol. Histopathol.*, **20**, 665–671.
31. *Parry, D.A., Steven, A.C. and Steinert, P.M.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 1012–1018.

32. Geisler, N. and Weber, K. (1982) *EMBO J.*, **1**, 1649–1656.
33. Phillips, G.N., Jr. (1992) *Proteins*, **14**, 425–429.
34. Meng, J.J., Khan, S. and Ip, W. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 18679–18685.
35. Strelkov, S.V., Herrmann, H., Geisler, N., Wedig, T., Zimbelmann, R., Aebi, U. and Burkhard, P. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1255–1266.
36. Herrmann, H. and Aebi, U. (1999) *Cell Mol. Life Sci.*, **55**, 1416–1431.
37. Letai, A., Coulombe, P.A. and Fuchs, E. (1992) *J. Cell Biol.*, **116**, 1181–1195.
38. Budamagunta, M.S., Hess, J.F., Fitzgerald, P.G., Voss, J.C. (2007) *Cell Biochem. Biophys.*, **48**, 45–53.
39. Traub, P., Scherbarth, A., Wieggers, W. and Shoeman, R.L. (1992) *J. Cell Sci.*, **101** (Pt 2), 363–381.
40. Herrmann, H., Hofmann, I. and Franke, W.W. (1992) *J. Mol. Biol.*, **223**, 637–650.
41. Shoeman, R. L., Hartig, R., Berthel, M. and Traub, P. (2002) *Exp. Cell Res.*, **279**, 344–353.
42. Geisler, N., Hatzfeld, M. and Weber, K. (1989) *Eur J Biochem*, **183**, 441–447.
43. Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S. A., Goldie, K. N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W.W. and Aebi, U. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 933–953.
44. Heitlinger, E., Peter, M., Haner, M., Lustig, A., Aebi, U. and Nigg, E.A. (1991) *J. Cell Biol.*, **113**, 485–495.
45. Geisler, N., Schunemann, J. and Weber, K. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **206**, 841–852.
46. Geisler, N. (1993) *FEBS Lett.*, **323**, 63–67.
47. Svergun, D.I. and Koch, M.H. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 654–660.
48. Koch, M.H., Vachette, P. and Svergun, D.I. (2003) *Q Rev. Biophys.*, **36**, 147–227.
49. Sokolova, A.V., Kreplak, L., Wedig, T., Mucke, N., Svergun, D.I., Herrmann, H., Aebi, U. and Strelkov, S.V. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16206–16211.
50. Soellner, P., Quinlan, R.A. and Franke, W.W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7929–7933.
51. Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Ku, N.O. and Aebi, U. (1999) *J. Mol. Biol.*, **286**, 1403–1420.
52. Helfand, B. T., Chang, L. and Goldman, R. D. (2004) *J Cell Sci*, **117**, 133–141.
53. Prahlad, V., Yoon, M., Moir, R.D., Vale, R.D. and Goldman, R.D. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 159–170.
54. Yoon, M., Moir, R.D., Prahlad, V. and Goldman, R.D. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 147–157.
55. Gyoeva, F.K. and Gelfand, V.I. (1991) *Nature*, **353**, 445–448.
56. Helfand, B.T., Mikami, A., Vallee, R.B. and Goldman, R.D. (2002) *J. Cell Biol.*, **157**, 795–806.
57. Yoon, K.H., Yoon, M., Moir, R.D., Khuon, S., Flitney, F.W. and Goldman, R.D. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 503–516.
58. Brown, A. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 153–156.
59. Roy, S., Coffee, P., Smith, G., Liem, R.K., Brady, S.T. and Black, M.M. (2000) *J. Neurosci.*, **20**, 6849–6861.
60. Styers, M.L., Kowalczyk, A.P., Faundez, V. (2005) *Traffic*, **6**, 359–365.
61. Toivola, D.M., Tao, G.Z., Habtezion, A., Liao, J., Omary, M.B. (2005) *Trends Cell Biol.*, **15**, 608–617.
62. Goldman, R.D., Chou, Y.H., Prahlad, V. and Yoon, M. (1999) *FASEB J.*, **13** Suppl 2, S261–265.

63. Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B. and Borisy, G.G. (1996) *J. Cell Biol.*, **135**, 991–1007.
64. Ruhrberg, C. and Watt, F.M. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**, 392–397.
65. Wiche, G. (1998) *J. Cell Sci.*, **111 (Pt 17)**, 2477–2486.
66. Hijikata, T., Murakami, T., Imamura, M., Fujimaki, N. and Ishikawa, H. (1999) *J. Cell Sci.*, **112 (Pt 6)**, 867–876.
67. Andra, K., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fassler, R., Propst, F. and Wiche, G. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 3143–3156.
68. Andra, K., Nikolic, B., Stocher, M., Drenckhahn, D. and Wiche, G. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 3442–3451.
69. Yang, Y., Bauer, C., Strasser, G., Wollman, R., Julien, J. P. and Fuchs, E. (1999) *Cell*, **98**, 229–238.
70. Elliott, C.E., Becker, B., Oehler, S., Castanon, M.J., Hauptmann, R. and Wiche, G. (1997) *Genomics*, **42**, 115–125.
71. Paulin, D. and Li, Z. (2004) *Exp. Cell Res.*, **301**, 1–7.
72. Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N. and Capetanaki, Y. (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, 1283–1298.
73. Nekrasova, O., Kulik, A. and Minin, A. (2007) *Biochemistry (Membrane and Cell Biology)*, **1**, 108–113.
74. Wagner, O.I., Lifshitz, J., Janmey, P.A., Linden, M., McIntosh, T.K. and Letierrier, J.F. (2003) *J. Neurosci.*, **23**, 9046–9058.
75. Brownlee, J., Ackerley, S., Grierson, A.J., Jacobsen, N.J., Shea, K., Anderson, B.H., Leigh, P.N., Shaw, C.E. and Miller, C.C. (2002) *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2837–2844.
76. Bonifas, J.M., Rothman, A.L. and Epstein, E.H., Jr. (1991) *Science*, **254**, 1202–1205.
77. Gao, Y. and Sztul, E. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 877–893.
78. Gao, Y.S., Vrieland, A., MacKenzie, R. and Sztul, E. (2002) *Eur. J. Cell Biol.*, **81**, 391–401.
79. Suzuki, T., Nakamoto, T., Ogawa, S., Seo, S., Matsumura, T., Tachibana, K., Morimoto, C. and Hirai, H. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 14933–14941.
80. Styers, M.L., Salazar, G., Love, R., Peden, A.A., Kowalczyk, A.P., Faundez V. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5369–5382.
81. Shintani, T. and Klionsky, D.J. (2004) *Science*, **306**, 990–995.
82. Blankson, H., Holten, T., Oksendal, A. N. and Jynge, P. (1995) *Acta Radiol. Suppl.*, **399**, 135–141.
83. Starr, D.A. (2007) *Mol. Biosyst.*, **3**, 583–589.
84. Sarria, A.J., Lieber, J.G., Nordeen, S.K. and Evans, R.M. (1994) *J. Cell Sci.*, **107 (Pt 6)**, 1593–1607.
85. Shah, S.B., Davis, J., Weisleder, N., Kostavassili, I., McCulloch, A.D., Ralston, E., Capetanaki, Y. and Lieber, R.L. (2004) *Biophys. J.*, **86**, 2993–3008.
86. Fuchs, E., Esteves, R.A. and Coulombe, P.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6906–6910.
87. Ralston, E., Lu, Z., Biscocho, N., Soumaka, E., Mavroidis, M., Prats, C., Lomo, T., Capetanaki, Y. and Ploug, T. (2006) *J. Cell Physiol.*, **209**, 874–882.
88. Wilhelmsen, K., Litjens, S.H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., Raymond, K. and Sonnenberg, A. (2005) *J. Cell Biol.*, **171**, 799–810.
89. Schweitzer, S.C. and Evans, R.M. (1998) *Subcell. Biochem.*, **31**, 437–462.

90. Wang, C., JeBailey, L. and Ridgway, N.D. (2002) *Biochem. J.*, **361**, 461–472.
91. Ogawara, M., Inagaki, N., Tsujimura, K., Takai, Y., Sekimata, M., Ha, M. H., Imajoh-Ohmi, S., Hirai, S., Ohno, S., Sugiura, H. and et al. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 1055–1066.
92. Li, Q.F., Spinelli, A.M., Wang, R., Anfinogenova, Y., Singer, H.A. and Tang, D.D. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 34716–34724.
93. Eriksson, J.E., He, T., Trejo-Skalli, A.V., Harmala-Brasken, A.S., Hellman, J., Chou, Y.H. and Goldman, R.D. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 919–932.
94. Eriksson, J.E., Opal, P. and Goldman, R.D. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 99–104.
95. Ku, N.O., Liao, J., Chou, C.F. and Omary, M.B. (1996) *Cancer Metastasis Rev.*, **15**, 429–444.
96. Foisner, R., Traub, P. and Wiche, G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3812–3816.
97. Liao, J. and Omary, M.B. (1996) *J. Cell Biol.*, **133**, 345–357.
98. Caulin, C., Ware, C.F., Magin, T.M. and Oshima, R.G. (2000) *J. Cell Biol.*, **149**, 17–22.
99. Feng, L., Zhou, X., Liao, J. and Omary, M.B. (1999) *J. Cell Sci.*, **112** (Pt 13), 2081–2090.
100. Giasson, B.I. and Mushynski, W.E. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30404–30409.
101. Goto, H., Kosako, H., Tanabe, K., Yanagida, M., Sakurai, M., Amano, M., Kaibuchi, K. and Inagaki, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11728–11736.
102. Sin, W.C., Chen, X.Q., Leung, T. and Lim, L. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6325–6339.
103. Inagaki, M., Nishi, Y., Nishizawa, K., Matsuyama, M. and Sato, C. (1987) *Nature*, **328**, 649–652.
104. Chou, Y.H., Bischoff, J.R., Beach, D. and Goldman, R.D. (1990) *Cell*, **62**, 1063–1071.
105. Chou, Y.H., Rosevear, E. and Goldman, R.D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1885–1889.
106. Tsujimura, K., Tanaka, J., Ando, S., Matsuoka, Y., Kusubata, M., Sugiura, H., Yamauchi, T. and Inagaki, M. (1994) *J. Biochem.*, **116**, 426–434.
107. Takai, Y., Ogawara, M., Tomono, Y., Moritoh, C., Imajoh-Ohmi, S., Tsutsumi, O., Taketani, Y. and Inagaki, M. (1996) *J. Cell Biol.*, **133**, 141–149.
108. Ando, S., Tanabe, K., Gonda, Y., Sato, C. and Inagaki, M. (1989) *Biochemistry*, **28**, 2974–2979.
109. Ando, S., Tokui, T., Yamauchi, T., Sugiura, H., Tanabe, K. and Inagaki, M. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 955–962.
110. Kusubata, M., Tokui, T., Matsuoka, Y., Okumura, E., Tachibana, K., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Yasuda, H., Kamijo, M., Ohba, Y. and et al. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 20937–20942.
111. Chou, Y.H., Ngai, K.L. and Goldman, R. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 7325–7328.
112. Goto, H., Tanabe, K., Manser, E., Lim, L., Yasui, Y. and Inagaki, M. (2002) *Genes Cells*, **7**, 91–97.
113. Nakamura, Y., Takeda, M., Aimoto, S., Hojo, H., Takao, T., Shimonishi, Y., Hariguchi, S. and Nishimura, T. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23269–23274.
114. Inagaki, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., Ando, S., Tanabe, K., Kikuchi, K., Tsuiki, S.

- and Nishi, Y. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 4722–4729.
115. Sekimata, M., Tsujimura, K., Tanaka, J., Takeuchi, Y., Inagaki, N. and Inagaki, M. (1996) *J. Cell Biol.*, **132**, 635–641.
116. Geisler, N. and Weber, K. (1988) *EMBO J.*, **7**, 15–20.
117. Kitamura, S., Ando, S., Shibata, M., Tanabe, K., Sato, C. and Inagaki, M. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 5674–5678.
118. Kusubata, M., Matsuoka, Y., Tsujimura, K., Ito, H., Ando, S., Kamijo, M., Yasuda, H., Ohba, Y., Okumura, E., Kishimoto, T. and et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 927–934.
119. Sihag, R.K. and Nixon, R.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 18861–18867.
120. Gonda, Y., Nishizawa, K., Ando, S., Kitamura, S., Minoura, Y., Nishi, Y. and Inagaki, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 1316–1325.
121. Vallano, M.L., Buckholz, T.M. and DeLorenzo, R.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 957–963.
122. Link, W.T., Dosemeci, A., Floyd, C.C. and Pant, H.C. (1993) *Neurosci. Lett.*, **151**, 89–93.
123. Guan, R.J., Khatra, B.S. and Cohlberg, J.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 8262–8267.
124. Hocevar, B.A., Burns, D.J. and Fields, A.P. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 7545–7552.
125. Lamb, N.J., Fernandez, A., Feramisco, J.R. and Welch, W.J. (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 2409–2422.
126. Eriksson, J.E., Brautigan, D.L., Vallee, R., Olmsted, J., Fujiki, H. and Goldman, R.D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11093–11097.
127. Izawa, I. and Inagaki, M. (2006) *Cancer Sci.*, **97**, 167–174.
128. Kosako, H., Goto, H., Yanagida, M., Matsuzawa, K., Fujita, M., Tomono, Y., Okigaki, T., Odai, H., Kaibuchi, K. and Inagaki, M. (1999) *Oncogene*, **18**, 2783–2788.
129. Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E. A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K. and Inagaki, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 8526–8530.
130. Altmannsberger, M., Osborn, M., Holscher, A., Schauer, A. and Weber, K. (1981) *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **37**, 277–284.
131. Holwell, T.A., Schweitzer, S.C. and Evans, R.M. (1997) *J. Cell Sci.*, **110** (Pt 16), 1947–1956.
132. Pekny, M., Leveen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C. H., Westermarck, B. and Betsholtz, C. (1995) *EMBO J.*, **14**, 1590–1598.
133. Colucci-Guyon, E., Portier, M.M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S. and Babinet, C. (1994) *Cell*, **79**, 679–694.
134. Schiffers, P.M., Henrion, D., Boulanger, C.M., Colucci-Guyon, E., Langa-Vives, F., van Essen, H., Fazzi, G.E., Levy, B.I. and De Mey, J. G. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 611–616.
135. Terzi, F., Henrion, D., Colucci-Guyon, E., Federici, P., Babinet, C., Levy, B.I., Briand, P. and Friedlander, G. (1997) *J. Clin. Invest.*, **100**, 1520–1528.
136. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К. Уотсон Дж. Д. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд. перераб. и доп. Т. 2.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1993. – 539 с.