

Московский Государственный Университет
им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет

Дипломная работа

**Изучение взаимодействия
промежуточных филаментов с митохондриями**

Работа выполнена
в группе клеточной биологии
Института белка РАН
студентом кафедры биохимии
П. А. Тюриным-Кузьминым

Научный руководитель:
канд. биол. наук **А. А. Минин**

Москва, 2008 г

Содержание

Список сокращений.....	3
Литобзор	4
Цитоскелет	5
Промежуточные филаменты	6
Общие свойства ПФ	6
Классификация ПФ	6
Физико-химические свойства ПФ.....	7
Структура ПФ	8
Функции ПФ.....	10
Взаимодействие ПФ с клеточными органеллами.....	11
Взаимодействие ПФ с митохондриями.....	13
Материалы и методы.....	15
Культура клеток.....	15
Иммунофлуоресценция.....	15
Плазмиды.....	16
Трансфекция клеток.....	17
Видеомикроскопия.....	18
Обработка данных	19
Результаты.....	21
Выявление ПФ в живой клетке	22
Мутанты виментина собираются в ПФ в клетках MFT-16.....	24
Подвижность митохондрий в клетках с восстановленными ПФ.....	26
Обсуждение результатов.....	29
Выводы.....	31
Список литературы.....	32

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода;

ПФ – промежуточные филаменты;

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота;

DMEM – сухая среда для клеток (Dulbecco`s modified Eagle`s medium);

DpnI – рестриктаза, разрезающая метилированную ДНК (по 5-mC); получена из

Diplococcus pneumoniae;

EcoRI, XhoI – рестриктазы;

F-актин – фибриллярный актин;

GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein);

GFAP – (glial filament acidic protein) кислый глиальный белок;

IFAP – (intermediate filaments associated protein) белки, ассоциированные с ПФ;

MAP2 – (microtubule-associated protein 2) белок, ассоциированный с микротрубочками;

mCherry – красный флуоресцентный белок;

NF-H – большая субъединица нейрофиламентов (heavy molecular mass subunits);

NF-L – малая субъединица нейрофиламентов (low molecular mass subunits);

NF-M – средняя субъединица нейрофиламентов (mid-sized molecular mass subunits);

PCR – полимеразная цепная реакция;

PNK – киназа полинуклеотидов (Polynucleotide Kinase);

ROK α – RhoA-связывающая киназа α ;

SEM – (standart error of the mean) стандартная ошибка среднего;

VAMs – (vimentin associated matrix adhesions) клеточные адгезивные контакты, ассоциированные с виментином.

Литобзор

Митохондрии занимают особое место в физиологии клетки. Они обеспечивают клетку энергией в форме молекул АТФ, являются местом пересечения многих регуляторных цепей [Wagner, et al., 2003], в первую очередь связанных с регуляцией концентрации внутриклеточного Ca^{2+} [Bahler., et al. 1994]. Также они являются важнейшим звеном в процессе апоптоза, программируемой клеточной смерти. Для нормального функционирования митохондрий большое значение имеет их внутриклеточное распределение [Capetanaki, 2002]. Во многих типах клеток митохондрии локализируются вблизи мест высокого потребления энергии [Chada and Hollenbeck, 2003; Li et al., 2004; Morris and Hollenbeck 1993]. В скелетных мышцах, например, они располагаются вблизи миофибрилл; в сперматозоидах образуют спиральный футляр вокруг оси жгутика; у простейших и в других клетках, снабженных ресничками, локализируются непосредственно под клеточной мембраной, у основания ресничек. В аксонах нервных клеток основная масса митохондрий находится около синапсов, в местах передачи нервного импульса [Morris and Hollenbeck 1993]. Расположение митохондрий вблизи плазматической мембраны позволяет контролировать уровень кальция внутри клетки [Noth et al., 1997]. Таким образом, внутриклеточная локализация митохондрий важна для их функционирования и тесно связана с физиологией клеток.

Правильное распределение митохондрий достигается при помощи их транспорта вдоль микротрубочек и актиновых филаментов моторными белками. По-видимому, транспорт митохондрий, как и других органелл, происходит в две стадии: на большие расстояния они переносятся по микротрубочкам, а по актиновым филаментам происходит их перемещение на небольшие расстояния и локализация [Chada and Hollenbeck, 2004]. Многими авторами было замечено, что особенностью поведения митохондрий является то, что большую часть времени они пребывают в состоянии относительного покоя [Allen et al., 1982; Brady et al., 1982; Morris and Hollenbeck, 1993]. Наличие в клетке неподвижных митохондрий объясняется связью с различными системами цитоскелета. Например, на клетках морского ежа было показано, что при разборке актиновых филаментов скорость транспорта митохондрий в клетках возрастает в 1,5 раза [Krendel et al., 1998]. В нашей лаборатории недавно было показано на фибробластах, что при индукции полимеризации актиновых

филаментов в стресс-фибриллы подвижность митохондрий в клетке снижается [Minin et al. 2006]. В аксонах нейронов в закреплении митохондрий принимают участие все три системы цитоскелета: актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты (ПФ). Например, если в аксонах разрушить F-актин, то скорость транспорта митохондрий возрастает [Morris and Hollenbeck, 1995]; на микротрубочках в аксонах нейронов митохондрии закрепляются посредством белка синтафина [Kang et al., 2008]. Важная роль в локализации митохондрий в аксонах нейронов принадлежит также промежуточным филаментам (ПФ). Показана непосредственная связь нейрофиламентов с митохондриями *in situ* [Wagner et al., 2003]. Таким образом, распределение митохондрий обеспечивается благодаря их регулируемому транспорту вдоль микротрубочек и актиновых филаментов моторными белками и прикреплению их к различным структурам цитоскелета при помощи малоизученных пока механизмов.

Цитоскелет

Для клеток высших эукариот характерной чертой является наличие цитоскелета, который состоит из трех основных компонентов: микротрубочек, актиновых микрофиламентов и промежуточных филаментов. Они взаимодействуют между собой и с другими клеточными структурами, что придаёт цитоплазме механическую прочность и эластичность, определяет форму клетки, является необходимым для выполнения многих клеточных функций (например, клеточной подвижности).

Микротрубочки и актиновые филаменты представляют собой полимерные фибриллы, состоящие из глобулярных белков. Микротрубочки собираются из димеров α - и β -тубулина, микрофиламенты – из актина. Эти цитоскелетные структуры постоянно находятся в состоянии полимеризации-деполимеризации, причём обмен мономеров происходит на концах филаментов. Важным свойством микротрубочек и актиновых филаментов является их полярность. Она возникает из-за того, что протомеры выстраиваются вдоль длинной оси филамента «голова к хвосту». Противоположные концы микротрубочек и актиновых филаментов отличаются по структуре, и по скоростям полимеризации и деполимеризации [Hotani, Nogio, 1988; Wegner, 1976].

ПФ, в отличие от микротрубочек и актиновых филаментов, состоят из фибриллярных белков, они не обладают полярностью. Обмен мономеров происходит по всей длине филамента.

ПФ участвуют в адаптации клеток к стрессорным воздействиям, исполняют цитоархитектурную функцию, играют значительную роль во внутриклеточном распределении органелл и белков [Toivola, et al., 2005], что в свою очередь влияет на функции этих органелл.

На описании ПФ остановимся подробнее.

Промежуточные филаменты

Общие свойства ПФ

ПФ организуются в филаменты диаметром ~ 10 нм (при помощи электронного микроскопа выявляются филаменты от 7 до 12 нм), что является промежуточным значением по сравнению с 5-8 нм у микрофиламентов и 25 нм у микротрубочек [Fuchs and Weber, 1994; Ku et al., 1999]. ПФ являются важными структурными элементами как клеточного ядра, так и цитоплазмы [Hermann et al., 2004]. Ядерные ПФ встречаются у всех животных, а цитоплазматические ПФ найдены у нематод, моллюсков и позвоночных. Без цитоплазматических ПФ, по-видимому, обходятся животные, у которых есть экзоскелет [Alberts, et. al., 2002]. В разных типах клеток позвоночных экспрессируются разные белки цитоплазматических ПФ [Toivola, et al., 2005]. Состав ПФ может меняться и на разных стадиях дифференцировки клеток. У позвоночных в некоторых клетках (например, в глиальных клетках олигодендроцитах) цитоплазматических ПФ нет [Alberts et. al., 2002].

Классификация ПФ

Семейство ПФ содержит много различных белков, кодируемых почти 70 генами [Hesse et al., 2001]. Гомология аминокислотных последовательностей некоторых белков ПФ составляет всего 20% [Herrmann, Aebi, 2000], однако, благодаря биохимическому и структурному сходству, белки ПФ относят к одному семейству. Белки, образующие ПФ разделяются на ядерные и цитоплазматические. Ядерные ПФ – ламины – считаются эволюционными предшественниками всех ПФ. Их центральный α -спиральный домен содержит вставки, отсутствующие у цитоплазматических, среди которых сигнал ядерной локализации [Hermann et al., 2004].

Цитоплазматические ПФ представлены четырьмя типами белков: виментиноподобными, двумя группами эпителиальных белков ПФ и белками нейрофиламентов. К виментиноподобным относится виментин, который встречается во многих клетках мезенхимального происхождения; десмин, который экспрессируется во всех типах мышечных клеток; периферин, который в

периферических нейронах, наряду с нейрофиламентами, участвует в сборке ПФ и кислый глиальный белок (GFAP – glial filament acidic protein) [Toivola et al., 2005]. Виментиноподобные белки образуют, в зависимости от типа клеток, как гомополимеры, так и гетерополимеры с другими белками ПФ [Fuchs and Weber, 1994]. Эпителиальные белки кератины – наиболее многочисленное семейство ПФ. Они содержатся в эпителиальных клетках и их производных [Moll et al., 1982]. Кератиновые ПФ представлены только гетерополимерами. Они состоят из равного количества кислых (I тип белков ПФ) и основных (II тип) субъединиц кератина [Alberts et. al., 2002]. Нейрофиламенты найдены в аксонах нейронов позвоночных. К ним относятся α -интернексин [Pachter, Liem, 1985] и три белка нейрофиламентов: NF-L, NF-M, NF-H [Angelides et al., 1989]. Белки нейрофиламентов имеют длинный С-концевой домен, выступающий за пределы сформировавшегося волокна и связывающийся с соседними филаментами. В результате образуется структура, скрепленная множественными боковыми контактами, располагающаяся вдоль аксона [Alberts et. al., 2002]. Некоторые авторы относят к ним также белок нестин. Он локализуется с виментином в клетках-предшественниках нейронов в центральной нервной системе и с десмином в Z-дисках ранних постнатальных скелетных мышечных клеток. Нестин находят и в фибробластах. Самостоятельно формировать ПФ нестин не способен, но он может встраиваться в виментиновые, десминовые ПФ и нейрофиламенты [Steinert et al., 1999].

Физико-химические свойства ПФ

Исследования *in vitro* показали очень высокую устойчивость ПФ к механическим нагрузкам. Большое число полипептидов на поперечном сечении филамента, сильные боковые гидрофобные взаимодействия, характерные для белков, содержащих скрученную суперспираль, и электростатические взаимодействия, возникающие при образовании тетрамеров, придают промежуточным филаментам свойства каната: они легко гнутся, но крайне трудно рвутся [Alberts et. al., 2002].

При обработке клетки детергентами, растворами с высокой ионной силой ПФ последними из клеточных структур переходят в раствор, то есть проявляют очень высокую стабильность [Helfand, et al., 2004]. ПФ могут собираться *in vitro* в физиологическом буфере без каких-либо кофакторов после полной денатурации белка в мочеvine [Renner et al., 1981].

Как показали недавние исследования, ПФ проявляют высокую динамичность и подвижность *in vivo*. Экзогенный виментин, инъецированный в клетку, быстро

встраивается в уже сформированные филаменты. Это показывает, что структура ПФ регулируется равновесием между протофиламентами и полимерами и что обмен субъединицами происходит по всей длине филамента [Vikstrom et al., 1989].

Структура ПФ

Несмотря на большое разнообразие первичной структуры белков ПФ, все они имеют общий план строения. В центре молекулы расположен консервативный α -спиральный домен. Он ограничен N-концевым («голова») и C-концевым («хвост») доменами с неопределённой структурой [Hermann et al., 2004]. Размеры и последовательности концевых доменов сильно варьируют среди разных белков ПФ.

Строение центрального домена очень консервативно. Он содержит четыре спиральных сегмента 1A, 1B, 2A, 2B, которые отделяются друг от друга короткими неспиральными участками-линкерами L₁, L₁₋₂ и L₂. Линкеры часто содержат остатки пролина и глицина. α -спиральные сегменты центрального домена формируют параллельную левовращающую скрученную спираль (coiled-coil) с аналогичными участками другой молекулы [Steinert et al., 1993]. Белки, способные к образованию скрученной спирали, содержат в аминокислотной последовательности повторы из 7 аминокислот – гептады вида (abcdefg)_n. В гептадах положения a и d занимают небольшие гидрофобные остатки - лейцин, изолейцин, метионин и валин [Herrmann et al., 2007]. Таким образом, скрученная спираль образована за счёт гидрофобных контактов.

α -спиральный домен цитоплазматических ПФ сильно заряжен. Например, α -спиральный домен виментина человека, длиной 310 аминокислот, содержит 116 заряженных, из них 70 кислых и 46 основных. Таким образом, преобладание кислых аминокислот составляет 24 на субъединицу или 48 на димер. Кислотность центрального домена контрастирует с высокой основностью «головного» N-концевого. Например, виментин содержит 12 остатков аргинина в этом домене. α -спиральный и «головной» домены принимают участие в сборке филаментных структур [Hermann et al., 2004].

N-концевой домен играет важную роль в формировании и стабилизации структуры виментиновых и кератиновых ПФ, однако о строении этого домена в составе ПФ практически ничего не известно. Молекулы виментина и кератинов, лишённые N-концевого домена, не собираются в филаменты. По-видимому, в процессе сборки ПФ положительно заряженная «голова» взаимодействует с кислым α -спиральным доменом

[Traub et al., 1992]. Было показано, что для сборки виментина в ПФ важен нонапептид SSYRRIFGG на самом конце головного домена виментина. Он очень высококонсервативен среди всех ПФ III типа [Herrmann et al., 1992]. Удаление первых 24 аминокислот виментина, включающих в себя этот нонапептид, делает сборку ПФ полностью невозможной. Удаление 25-38 аминокислот 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*. При удалении аминокислот с 44 по 69, с 44 по 95 или с 40 по 95 виментин может полимеризоваться *in vivo*. Оказалось, что виментин с делецией аминокислот 25-68 и 44-103 полностью не способен к сборке ПФ. Необходимость аминокислот 95-103, а также первых 25 аминокислот виментина для сборки филаментов привела к предположению, что несколько остатков в С-концевой части головного домена, наряду с нонапептидом в начале «головы», играют решающую роль в сборке виментина в ПФ [Shoeman et al., 2002]. Полагают, что при образовании тетрамера виментина участок, расположенный на N-конце головного домена, приближается к центральному домену соседней белковой субъединицы и связывается с ним [Shoeman, et al 2002]. При этом участок, расположенный в середине N-концевого домена, образует петлю. Она может выходить за пределы филамента и становиться доступными для взаимодействия с клеточными структурами. Например, на N-концевом домене найден участок связывания нуклеиновых кислот [Wang et al., 2000]. Сосредоточение наибольшего числа сайтов пост-трансляционной модификации именно в N-концевом домене косвенно указывает на важность этого домена для сборки и стабильности филаментов, регулируемого взаимодействия с клеточными органеллами. Самая важная модификация для ПФ – это фосфорилирование. Например, фосфорилирование головного домена виментина протеинкиназой А ингибирует его взаимодействие с участком на α -спиральном домене [Gohara et al., 2001]. В гладкомышечных клетках в регуляции сокращения принимает участие протеинкиназа РАК (p21-активируемая киназа) [Li et al., 2006]. Она фосфорилирует Ser56 виментина, и это приводит к частичной разборке ПФ и их ре-ориентации в клетках. Предполагают, что в результате перераспределяются белки, участвующие в регуляции сокращения, такие как Rho-киназа [Sin et al., 1998] и адапторный белок p-130.

Таким образом, в N-концевом домене виментина сосредоточено большое число участков, регулирующих структуру и функции ПФ.

С-концевой домен виментина, “хвост”, не обязателен для сборки филаментов. Однако, ПФ, состоящие из виментина без С-концевого домена, оказываются более толстыми и рыхлыми [Herrmann et al., 1996]. В С-концевом домене виментина содержатся участки связывания с актином [Esue et al., 2006].

Пара димеров белков ПФ объединяется в антипараллельную структуру, образуя тетрамер. Тетрамер является единицей полимеризации ПФ и структурой, составляющей растворимый пул белков ПФ, аналогичную в этом отношении $\alpha\beta$ -димеру тубулина или мономеру актина [Alberts et. al., 2002]. Растворимая фракция белков ПФ находится в динамическом равновесии с нерастворимой – филаментами.

Протомеры объединяются по 6 – 10 в ряд с образованием структуры филамента. Подсчёт массовой плотности в поперечном сечении с помощью электронной микроскопии показал, что кератиновые ПФ содержат 16 – 21 белков в сечении; виментиновые филаменты: 30 – 37; десмин, несмотря на большое сходство в последовательности с виментином, содержит около 47 субъединиц в поперечном сечении филамента [Herrmann et al., 1999]. Такой полиморфизм наблюдается не только среди разных ПФ, но и внутри одного типа [Herrmann et al., 1996, Herrmann et al., 2004]

ПФ встречаются как в форме гомополимеров, так и в форме гетерополимеров. Как уже было сказано, кератин и нейрофиламенты – гетерополимеры. Виментин и десмин в клетках находятся в форме гомополимеров, однако в филаменты могут встраиваться другие белки. В опытах *in vitro* показано, что виментин может собираться в единую сеть вместе с десмином, глиальным фибриллярным кислым белком, периферином (виментиноподобные белки), а также с нейрофиламентным белком NF-L [Monteiro and Cleveland, 1989, Fuchs and Weber, 1994, Herrmann, Aebi, 2000].

Функции ПФ

К важным функциям ПФ относится обеспечение механической прочности клеток и цитоархитектурная функция, основанные на механических свойствах ПФ и их способности к самосборке [Fuchs and Weber, 1994]. Известны наследственные заболевания, вызванные нарушениями структуры ПФ в тканях, подверженных механическому стрессу, таких как кожа, мышцы и кровеносные сосуды. До недавнего времени о других функциях ПФ не было известно.

Традиционно, большую информацию о функциях индивидуального белка получали в результате изучения животных, нокаутных по гену этого белка. Мыши, нокаутные по гену виментина, не только способны выживать и оставлять потомство, но и их фенотип практически не отличается от контрольных линий мышей [Colucci-Guyon et

al., 1994]. Это наталкивало на мысль, что виментин не играет существенной физиологической роли. Более подробный анализ мышей, нокаутных по гену виментина показал, что значительное число отклонений от нормы проявляются при помещении их в условия стресса. Среди таких отклонений, например, нарушение целостности эндотелия кровеносных сосудов [Nieminen et al., 2006], ухудшение процесса заживления ран [Eckes et al., 2000], отклонения от нормы в циркуляции лимфоцитов по кровяному руслу [Nieminen et al., 2006]. Также у мышей, нокаутных по гену виментина, наблюдается морфологическое изменение глиальных клеток [Colucci-Guyon et al., 1999]. У фибробластов, выделенных из таких мышей, снижена подвижность, сократительная способность и способность к направленной миграции, нарушены фокальные контакты [Eckes et al., 1998], они сильнее подвержены окислительному стрессу [Tolstonog, Shoeman et al., 2001].

Найденные отклонения линий клеток и целых мышей, лишённых гена белка ПФ, определяются функциями ПФ, отличными от обеспечения механической прочности клеток. ПФ участвуют в организации функционирования белков, вовлечённых в клеточную адгезию, миграцию и сигналинг, во внутриклеточном распределении органелл, а также в транспорте липидов [Toivola et al., 2005]. Например, участие ПФ в организации функционирования белков было показано на примере RhoA-связывающей киназы α (ROK α). В неактивированном состоянии киназа связана с ПФ и экранируется ими от взаимодействия с другими белками. Активация киназы ведет к фосфорилированию N-концевого домена виментина в составе ПФ, что в свою очередь приводит к локальной разборке ПФ и освобождению киназы на периферию клетки. [Sin et al., 1998]. В ряде исследований было показано, что функции митохондрий в разных клетках зависят от десминовых, виментиновых, кератиновых ПФ и нейрофиламентов [Herrmann, Aebi, 2000]. Также ПФ участвуют в локализации аппарата Гольджи, эндосом, лизосом и ядер [Toivola et al., 2005, Styers et al., 2004, Styers et al., 2005], взаимодействуют с клеточной мембраной [Gonzales et al., 2001, Jones et al., 1998].

Взаимодействие ПФ с клеточными органеллами

ПФ взаимодействуют с различными клеточными структурами, к которым относятся плазматическая мембрана, микротрубочки, пучки актиновых филаментов и большинство мембранных органелл клетки. Для взаимодействия с такими органеллами как митохондрии, аппарат Гольджи, эндосомы и лизосомы ПФ связываются с различными компонентами мембран этих органелл. Взаимодействие с клеточными

структурами обеспечивается большой группой белков IFAP (белки, ассоциированные с ПФ) [Goldman et al., 1999], но, вероятно, может происходить и непосредственно. По-видимому, в клетке существует несколько дублирующих друг друга способов взаимодействия ПФ с органеллами.

Например, взаимодействие кератиновых ПФ с плазматической мембраной и, через неё, с другими клетками и внеклеточным матриксом осуществляется в специальных структурах – десмосомах и полудесмосомах. Эти контакты обеспечивают механическую прочность соединения эпителиальных клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом. Они отличаются значительной стабильностью и низкой динамичностью [Jones et al., 1998]. В клетках эндотелия были найдены другие структуры, в построении которых участвуют ПФ. Виментиновые ПФ с участием актиновых филаментов образуют клеточные контакты под названием VAMs (vimentin associated matrix adhesions). По своим динамическим свойствам они отличаются от полудесмосом, а больше похожи на фокальные контакты [Gonzales et al., 2001] (в построении классических фокальных контактов из цитоскелетных структур участвует только F-актин). В этих взаимодействиях участвуют белки IFAP, относящиеся к семейству плакинов, в которое входят десмоплакин, буллёзный пемфигоидный антиген (BPAG1 – bullouse pemphigoid antigen 1) и плектин [Green et al., 1992].

Плектин является наиболее изученным среди белков, ассоциированных с ПФ. Молекулярная масса различных изоформ плектина – более 500 кДа. Плектин содержит длинный центральный α -спиральный домен, способный образовывать скрученную спираль при димеризации. Он ограничен 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 содержит участки связывания с ПФ. Плектин имеет несколько изоформ, что, по-видимому, обуславливает его способность взаимодействовать в разных типах клеток с разными компонентами [Elliott et al., 1997]. Например, изоформа плектина 1b в мышечных фибробластах специфически связывается с митохондриями и ко-локализуется с виментиновыми ПФ. Таким образом, возможно, она отвечает за взаимодействие ПФ с митохондриями. [Reznicek et al., 2003]. Были получены данные, указывающие на возможную роль плектина в связывании митохондрий с десминовыми ПФ в мышечных клетках [Reipert et al., 1999]. Мутации в плектине приводят к таким заболеваниям, как буллезный эпидермолиз и мышечная дистрофия [Wiche, 1998]. Было показано, что у мышей, лишенных плектина, наблюдаются серьезные нарушения структуры мышц [Andrä et al., 1997], а в

культивируемых фибробластах, полученных из таких мышей, были обнаружены значительные изменения архитектуры и динамики актинового цитоскелета [Andrä et al., 1998].

Распределение ПФ в клетках зависит от системы микротрубочек [Hollenbeck et al., 1989]. Деполимеризация микротрубочек ведёт к коллапсу виментиновых ПФ к ядру. Взаимодействие осуществляется не только посредством плектина, но и моторных белков микротрубочек. Например, показано, что виментиновые ПФ взаимодействуют с микротрубочками посредством кинезина [Gyoeva, Gelfand, 1991].

Были получены данные и о непосредственном взаимодействии ПФ с актиновыми микрофиламентами. Оказалось, что ПФ, состоящие из виментина, лишённого С-концевого домена, не связываются с актиновыми микрофиламентами *in vitro*, как это происходит в случае с виментином дикого типа [Esue et al., 2006].

Таким образом, ПФ взаимодействуют с различными клеточными структурами как непосредственно, так и с участием плектина.

Взаимодействие ПФ с митохондриями

ПФ во многих типах клеток взаимодействуют с митохондриями, в результате чего обеспечивается нормальное функционирование этих органелл. Например, в сердечных и скелетных мышцах мышей, лишённых гена десмина, изменяется морфология и внутриклеточная локализация митохондрий, наблюдается прогрессирующее разрушение матрикса митохондрий, а сами они собираются в группы около сарколеммы [Milner et al., 2000]. Такие клетки раньше вступают в апоптоз [Thornell et al., 1997]. Все эти изменения приводят к нарушению функций митохондрий: снижается максимальная скорость дыхания, АДФ-стимулируемое потребление кислорода. Таким образом, ПФ посредством взаимодействия с митохондриями определяют их правильное распределение в клетке.

Участие виментиновых ПФ в ингибировании подвижности митохондрий в фибробластах было обнаружено недавно в нашей лаборатории [Некрасова и др., 2007]. Было показано, что наличие ПФ в клетках снижает подвижность митохондрий в них. Если разрушить или убрать виментиновые ПФ из цитоплазмы, митохондрии становятся подвижнее. Чтобы разрушить ПФ в клетке, использовали мутантную молекулу виментина (N-концевая часть белка, аминокислоты 1-138), которая конкурирует с эндогенным виментином в процессе сборки ПФ, но сама не способна образовывать филаментов. В результате экспрессии мутанта виментина в клетках, ПФ разрушались, и подвижность митохондрий возрастала. Другой подход заключался в

использовании линий фибробластов, лишённых гена виментина. В клетках без виментина подвижность митохондрий была выше, чем в контрольных клетках, которые содержали виментин дикого типа [Некрасова и др., 2007]. При помощи экспрессии экзогенного виментина в клетках, лишённых гена этого белка, можно восстановить сеть ПФ. При этом подвижность митохондрий снижалась до уровня, характерного для контрольных клеток, которые содержали эндогенный виментин. Также было показано, что ПФ выступают посредником во взаимодействии митохондрий с актиновыми филаментами. Как уже было сказано выше, индукция полимеризации актиновых филаментов в стресс-фибриллы в фибробластах с виментиновыми ПФ приводит к снижению подвижности митохондрий [Minin et al. 2006]. Если же активировать образование стресс-фибрилл в клетках, которые не содержат виментина, то, по предварительным данным нашей лаборатории, подвижность митохондрий в них не изменяется. Таким образом, влияние актиновых микрофиламентов на подвижность митохондрий осуществляется при участии ПФ. Связь ПФ с митохондриями в фибробластах регулируется протеинкиназой С. Активация протеинкиназы С приводит к повышению подвижности митохондрий [Некрасова и др., 2007].

Таким образом, ПФ влияют на функции митохондрий, однако детали их взаимодействия пока не ясны. Ещё предстоит изучить, какие белки и какие структуры на этих белках участвуют в этом взаимодействии, и как оно регулируется.

В настоящей работе мы решили поставить перед собой следующую цель: определить, какая часть молекулы виментина участвует в ингибировании подвижности митохондрий промежуточными филаментами.

Для достижения поставленной цели нам нужно было выполнить несколько задач:

1. Получить плазмиду, кодирующую кДНК виментина с делецией в N-концевом домене (аминокислоты с 44 по 68);
2. Научиться выявлять в живой клетке промежуточные филаменты, восстановленные из мутантных форм виментина;
3. Определить относительную подвижность митохондрий в фибробластах с восстановленными ПФ, построенными из мутантных форм виментина.

Материалы и методы

Культура клеток

В работе использовались две линии мышинных фибробластов: клетки MFT-16, которые не содержат ген виментина, и MFT-6 – с геном виментина дикого типа, любезно предоставленные доктором Р. Эвансом (Университет Колорадо, США) [Holwell T.A., 1997]. Клетки выращивались в среде DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium) (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Биолот», Россия) и антибиотиков: 100 мкг/мл пеницилина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США). Для приготовления растворов и сред использовали дистиллированную воду, очищенную на системе Milli-Q (Millipore, США). Клетки инкубировались при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для экспериментов перед трансфекцией клетки выращивали в стерильных чашках Петри в течение 16-20 часов и через 5 часов после трансфекции рассаживали на стерильные покровные стекла.

Для снятия клеток с подложки при пересаживании культуру обрабатывали раствором, содержащим 0,68 mM Na-ЭДТА и 0,125% трипсина в PBS (8,1 mM Na₂HPO₄; 1,45 mM KH₂PO₄; 0,11 M NaCl; 3,42 mM KCl, pH 7.4) 2-3 минуты, затем добавляли 5 мл стерильной среды DMEM. Клетки суспендировали пипетированием. 1 мл суспензии клеток переносили в чашки Петри с 4 мл среды DMEM.

Иммуофлуоресценция

Для анализа промежуточных филаментов клетки промывали раствором PBS, а затем фиксировали в течение 10 мин. в 4% растворе параформальдегида в PBS. После такой фиксации стекла помещали на 15 минут в PBS, содержащий 1 мг/мл БСА и 0,1% Triton X100. После инкубации в PBS, содержащим 1 мг/мл БСА и 0,1% Triton X100, клетки инкубировали с раствором первых антител (коммерческие моноклональные мышинные антитела V9 (Sigma, США), которые связывают виментин человека, не узнают виментин мыши). Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации в растворе первых антител стекла промывали буфером, содержащим 1 мг/мл БСА и 0,01% Triton X100, 3 раза по 10 минут, и помещали в раствор вторых антител (козьи антитела, специфичные к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с FITC (Jackson, США)) на 1 час. После этого препараты промывали и заключали в Mowiol-488.

Плазмиды

Для выявления митохондрий в живых клетках использовали плазмиду pEGFP-Mito, полученную из pEYFP-Mito («Clontech», США). Плазида pEGFP-Vim, кодирующая виментин человека (№ P08670 в базе данных NCBI), слитый с зеленым флуоресцентным белком, была любезно предоставлена профессором Р. Голдманом (Чикаго, США) [Yoon, Moir et al. 1998]. Из неё были получены плазмиды, кодирующие виментин человека (pVim), и его мутанты. Схемы белков, кодируемых этими плазидами, приведены на Рис. 1.

Плазмиды pVim-dN56, pVim-dN14, pVim-dN26 кодируют мутантные молекулы виментина Vim-Δ56 (делеция 40 – 95 а.о.), Vim-Δ14 (делеция 25 – 38 а.о.) и Vim-Δ26 (делеция 44 – 69 а.о.), соответственно. Плазида pVim-P56R кодирует виментин Vim-P56R, который содержит точечную мутацию, приводящую к аминокислотной замене пролина(56) на аргинин. Плазида pVim-dCT кодирует виментин Vim-ΔC без C-концевого домена (делеция аминокислот 412 – 465). Также в работе мы использовали плазмиду pmCherry-Vim, кодирующую виментин дикого типа, слитый с красным флуоресцентным белком mCherry.

Для восстановления ПФ в клетках при помощи виментина Vim-Δ26, у которого удалены аминокислоты с 44 по 69, мы получили плазмиду pVim-dN26. Для внесения делеции провели полимеразную цепную реакцию (PCR) с плазмидой, кодирующей N-концевой фрагмент виментина. Для PCR использовали праймеры, которые фланкируют делетируемый участок (нуклеотиды 133 – 209) и направлены в разные стороны от него. В результате амплифицировались линейные молекулы, содержащие всю плазмиду, за исключением делетируемого участка. После лигирования получались последовательности, кодирующие виментин с делецией.

Для того чтобы получить плазмиду небольшого размера, которая могла бы амплифицироваться целиком, мы переклонировали кДНК, кодирующую N-концевой фрагмент виментина (аминокислоты 1-136) из плазмиды pVim в небольшой (1800 bp) вектор pOTB7 (по сайтам рестрикции XhoI и EcoRI). Для внесения делеции проводили PCR со следующими праймерами: прямым – 5'-CGGAGCAGCGTGCCCGGGGT-3', обратным – 5'-CAGCGCGCTGCCCAGGCTGTAGGT-3'. Для разрушения ДНК, которая служила матрицей для PCR, смесь обрабатывали рестриктазой Dpn I, узнающей метилированную ДНК. Неспаренные «А» на 3'-конце, добавленные Taq-полимеразой, удаляли при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Затем фосфорилировали 5'-концы при помощи полинуклеотидкиназы фага T4 и лигировали PCR-продукты T4-ДНК-лигазой. Правильность плазмиды проверили, определив её

последовательность. Чтобы получить полноразмерную кДНК виментина, несущую делецию, мы заменили N-концевой фрагмент виментина в векторе pVim мутантным, переклонировав его по сайтам XhoI и EcoRI. Полученную в результате плазмиду pVim-dN26 использовали для экспрессии в эукариотических клетках.

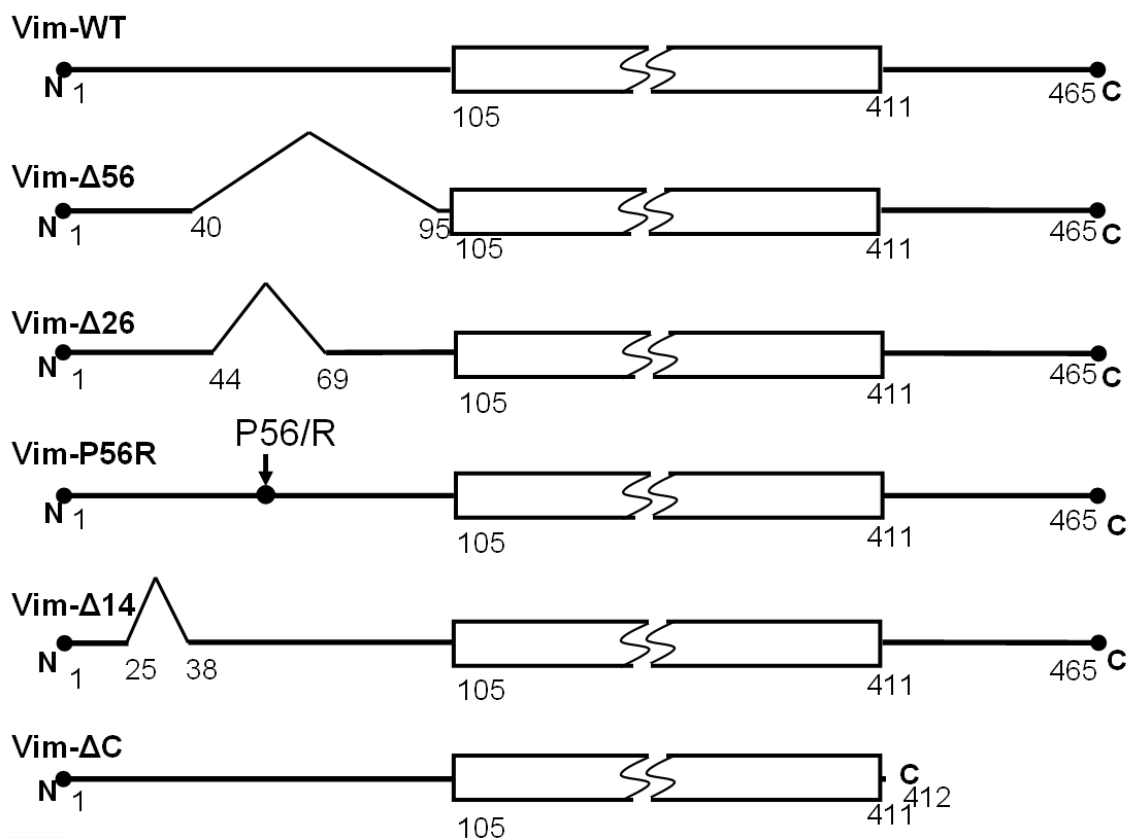


Рис. 1. Схематические изображения молекулы виментина человека и его мутантов, использованных в работе. Прямоугольниками показаны центральные α -спиральные домены, прямыми линиями – N- и C-концевые домены. Числа под изображениями молекул обозначают номера аминокислот, с которых начинаются и заканчиваются: молекулы виментина, центральные α -спиральные домены молекул, делетированные участки. Точечная аминокислотная замена пролина(56) на аргинин отмечена стрелкой.

Трансфекция клеток

Трансфекцию клеток проводили при помощи липидного реагента Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Количество липидного реагента брали из расчёта 5 мкл, а ДНК – 2 мкг на чашку диаметром 35 мм с 2 мл среды. Клетки через 5 часов после трансфекции рассаживали на стерильные покровные стёкла и наблюдали спустя 15-20 часов.

Видеомикроскопия

Для анализа движения митохондрий мы использовали клетки, ко-трансфицированные плазмидами pEGFP-Mito, pmCherry-Vim и плазмидой, кодирующей мутантный виментин. В таких клетках митохондрии были флуоресцентно-мечеными. Клетки выращивали на покровных стеклах и затем помещали в герметичную камеру с культуральной средой. Чтобы изготовить камеру, мы прикрепляли к покровному стеклу рамку из лабораторной плёнки Parafilm. Камеру заполняли культуральной средой и накрывали покровным стеклом с клетками. Герметизировали камеру воском. Клетки наблюдали под микроскопом AxioPhot (Opton) с объективами Plan-Apochromat 63x («Zeiss», Германия). Для снижения фототоксического эффекта флуоресценцию возбуждали при помощи 100-ваттной галогеновой лампы с переменным сопротивлением. Температура поддерживалась 36 ± 2 °C регулируемым воздушным потоком. Изображение получали с помощью 12-битной цифровой CCD камеры 1MHz Micromax (Roper Scientific) и программного обеспечения WinView32 (Princeton Instruments). При съемке для получения каждого кадра было выбрано время экспозиции 1 секунда, интервал между кадрами – 3 секунды, количество кадров в каждом фильме – около 30.

Обработка данных

Типичная картина распределения митохондрий, полученная при помощи цифровой камеры, представлена на Рис. 2,а.

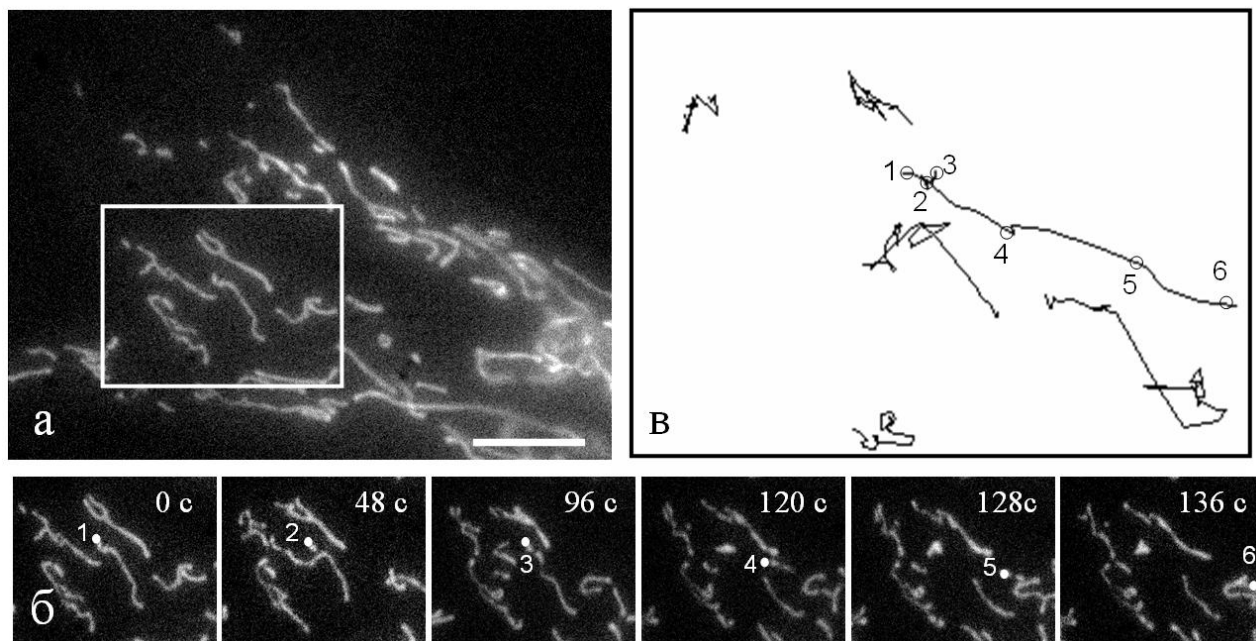


Рис. 2. Движение митохондрий в клетках MFT-6 Mito. (а) Первый из последовательности кадров, полученных при помощи флуоресцентной микроскопии. (б) Динамика распределения митохондрий в участке, выделенном на Рис. 2,а. Точками с цифрами отмечено положение одной митохондрии в ряде кадров. В углу каждого кадра показано время, которое прошло от начала фильма. Для наглядности временные интервалы между кадрами взяли различные. (в) Траектории перемещений митохондрий из Рис. 2,б за 136 сек. На одной из траекторий цифрами показано положение отмеченной на Рис. 2,б митохондрии в соответствующий цифре момент времени.. Масштаб 5 мкм.

На Рис. 2,б показано, как меняется положение митохондрий в серии кадров в течение 136 сек. За митохондриями наблюдали, отмечая точками их положение в каждом кадре: геометрического центра для митохондрий малого размера или одного из концов митохондрии для длинных органелл. На Рис. 2,б для примера выделена одна митохондрия. Видно, что большую часть фильма она практически не двигалась, после чего совершила быстрое перемещение. Наблюдая за перемещением точки в серии кадров, можно получить траекторию движения митохондрии. На Рис. 2,в показаны траектории движения некоторых митохондрий в последовательности кадров, представленной на Рис. 2,б. Видно, что движение митохондрий неравномерное и представляет собой перемещения, прерываемые длительными остановками. Многие органеллы не перемещались на значительные расстояния, а находились в относительном покое на протяжении всего времени наблюдения.

Для представления подвижности митохондрий в численном виде было введено понятие относительной подвижности митохондрий. Для определения этого параметра сначала определяли координаты точек, которыми отмечали положение митохондрий в

каждом кадре. Для этого использовали программу ImageJ (НИН, США). Затем мы определяли среднюю скорость движения каждой митохондрии за промежуток времени между последовательными кадрами. Среднюю скорость мы рассчитывали, разделяя величину перемещения митохондрии на постоянную величину интервала между кадрами 4с. Значение относительной подвижности митохондрий в клетке, определяли как отношение числа перемещений митохондрий со скоростью больше 0.2 мкм/с к общему числу всех зарегистрированных перемещений митохондрий в данной клетке. Для подсчета относительной подвижности митохондрий мы учитывали движения всех митохондрий на периферии клетки, которые присутствовали в поле микроскопа в течение съемки. Результаты определения относительной подвижности митохондрий представлены в виде средних значений \pm SEM. В каждом опыте наблюдали за 10-15 клетками, в клетке - за 20-40 митохондриями. Каждый опыт проводили как минимум в трёх повторностях.

Результаты

Во внутриклеточной локализации митохондрий и в их функционировании важную роль играют виментиновые ПФ. Это было показано, в частности, на фибробластах мышц, у которых отсутствовал ген виментина [Tolstonog et al., 2001]. В нашей лаборатории было установлено, что виментиновые ПФ участвуют в ингибировании подвижности митохондрий в фибробластах. Было показано, что в клетках линии MFT-16 подвижность митохондрий выше, чем в клетках MFT-6 [Некрасова, 2007]. В клетках MFT-16 можно восстанавливать систему ПФ, если экспрессировать в клетках экзогенный виментин [Shoeman, et al 2002]. На Рис. 3 видно, что после трансфекции клеток MFT-16 плазмидой, кодирующей виментин человека, в клетках выявляются ПФ.

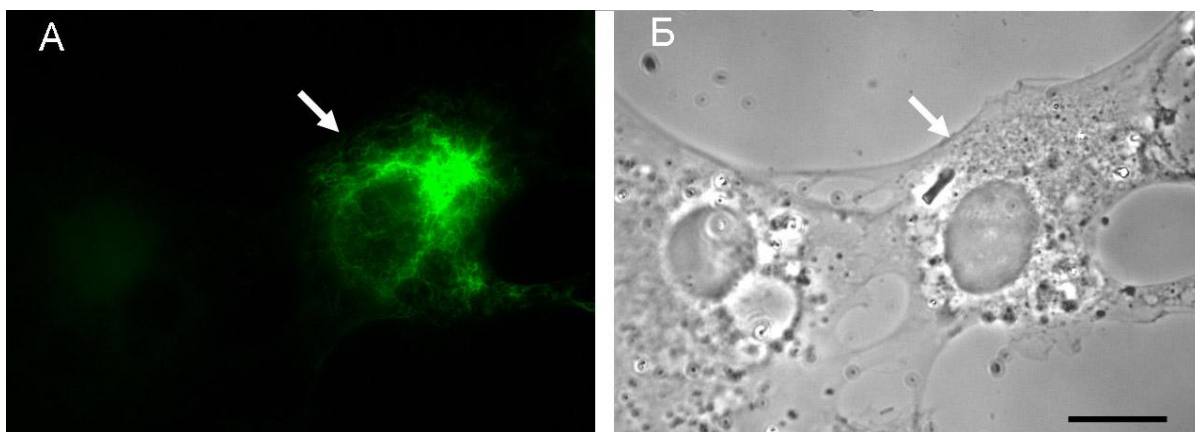


Рис 3. А. Иммунофлуоресценция клеток MFT-16, трансфицированных плазмидой, содержащей кДНК виментина. Клетки окрашены антителами V9. Стрелкой отмечена клетка, в которой прошла трансфекция. Б. Фазово-контрастное изображение клеток. Масштаб 10 мкм.

Как видно, ПФ представляют собой сеть филаментов, распределённую по всей цитоплазме, имеющую радиальное расположение и повышенную плотность в районе ядра, т. е. имеют нормальный вид.

По предварительным данным нашей лаборатории, после восстановления ПФ в клетках MFT-16 подвижность митохондрий снижалась до уровня, характерного для клеток MFT-6, которые содержат виментин. Таким образом, было показано, что ПФ ингибируют подвижность митохондрий.

В настоящей работе мы предположили, что ингибирование подвижности митохондрий происходит в результате взаимодействия с ними ПФ. Мы решили выявить участок молекулы виментина, важный для взаимодействия с митохондриями. В молекуле виментина содержатся участки, имеющие различное значение для сборки

ПФ. Некоторые участки можно удалять, при этом сборка ПФ не нарушается [Shoeman, et al 2002]. Мы решили проверить, не важны ли такие участки молекулы виментина для ингибирования подвижности митохондрий. Для этого мы, экспрессируя мутантные формы виментина, восстанавливали ПФ в клетках MFT-16 и анализировали в них подвижность митохондрий.

Выявление ПФ в живой клетке.

В фибробластах, у которых отсутствует ген виментина, можно восстанавливать систему ПФ, если экспрессировать в клетках экзогенный виментин [Shoeman et al., 2002]. Поскольку эффективность трансфекции оказывается ниже 100% и не во всех клетках экзогенный виментин собирается в ПФ, нам было важно ещё в живых клетках выявлять ПФ. Для этого мы использовали виментин, слитый с красным флуоресцентным белком mCherry. Химерный белок обычно экспрессируют в клетках с эндогенными ПФ [Martys et al., 1999]. По-видимому, он встраивается в ПФ и окрашивает их. Мы решили проверить, может ли сам виментин, меченый mCherry, собираться в ПФ. Для этого трансфицировали клетки линии MFT-16 плазмидой pmCherry-Vim, содержащей кДНК химерного белка. На Рис. 3, А,Б показаны микрофотографии клеток после трансфекции. Химерный белок собирается в агрегаты. Клеток с развитыми ПФ найдено не было. По-видимому, это связано с тем, что прикрепленный к виментину флуоресцентный белок мешает полимеризации виментина. Таким образом, виментин, меченый флуоресцентным белком, сам не может образовывать ПФ.

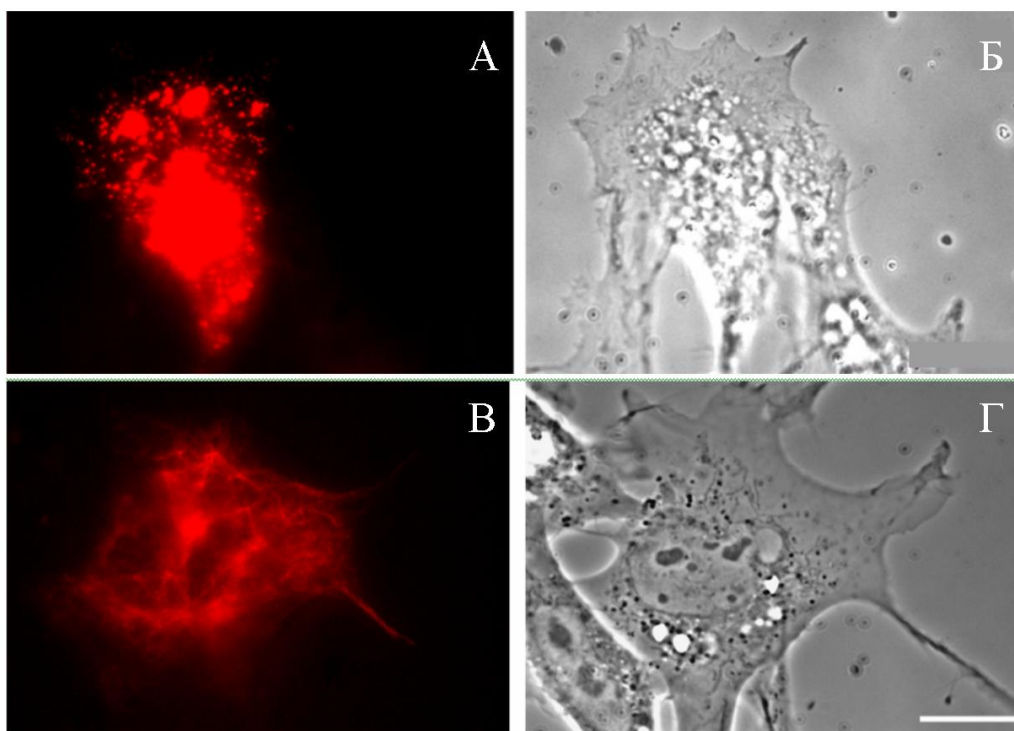


Рис 3. Микрофотографии, полученные при помощи флуоресцентной микроскопии (А, В) и фазового контраста (Б, Г). При экспрессии в клетках MFT-16 mCherry-виментин не собирается в ПФ (А). При ко-экспрессии mCherry-виментина и виментина дикого типа, ПФ восстанавливаются. Масштаб 10 мкм.

Для того чтобы восстановить сеть ПФ, состоящую, в основном, из немеченого виментина, но выявляемую в живых клетках, мы решили ко-экспрессировать в клетках виментин, меченый mCherry, и немеченый виментин. В таком случае во многих клетках выявляются ПФ в виде сети филаментов, распределённой по всей цитоплазме (Рис. 3, В, Г). Соотношение плазмид, кодирующих меченый виментин и немеченый, мы брали 1:10 по количеству ДНК, соответственно. Во многих клетках ПФ не было, а выявлялись агрегаты, короткие толстые нити, пучки или другие структуры. Встречались клетки, в которых были как ПФ, так и флуоресцирующие агрегаты. Вероятно, ПФ восстанавливались в клетках с определённым соотношением виментина, меченого mCherry, и немеченого. Таким образом, нам удалось подобрать условия транзитной трансфекции клеток MFT-16, при которых ПФ восстанавливаются, и их можно выявлять в живой клетке.

Мутанты виментина собираются в ПФ в клетках MFT-16

В N- и C-концевых доменах молекулы виментина существуют участки, не важные для сборки ПФ [Shoeman, 2002]. Если в молекуле виментина удалить участки полипептидной цепи с 25 по 38 аминокислоту, с 40 по 95, или весь C-концевой домен, то виментин сохраняет способность к сборке в ПФ. В нашей лаборатории были получены плазмиды, кодирующие мутанты виментина, лишённые аминокислот с 25 по 38, с 40 по 95, с 44 по 69, с 412 по 465, а также плазида, кодирующая виментин с аминокислотной заменой пролина(56) на аргинин (схемы мутантов виментина см. в таблице 1, раздел Материалы и методы). Мы решили проверить, можно ли из полученных нами мутантных форм виментина так восстановить ПФ, чтобы их можно было выявлять в живой клетке. Для этого мы ко-трансфицировали клетки MFT-16 плазмидами, кодирующими мутанты виментина и меченый mCherry виментин.

На Рис 4 (А-Е) показаны микрофотографии клеток, которые содержат ПФ, построенные из мутантов виментина Vim-Δ56, Vim -Δ26 и Vim -P56R. На фотографиях видно, что эти мутанты виментина собирались в клетке в ПФ. Получившиеся филаменты были похожи на ПФ, состоящие из виментина дикого типа: систему тонких нитей, располагающуюся в клетке более или менее радиально и имеющую повышенную плотность в районе ядра.

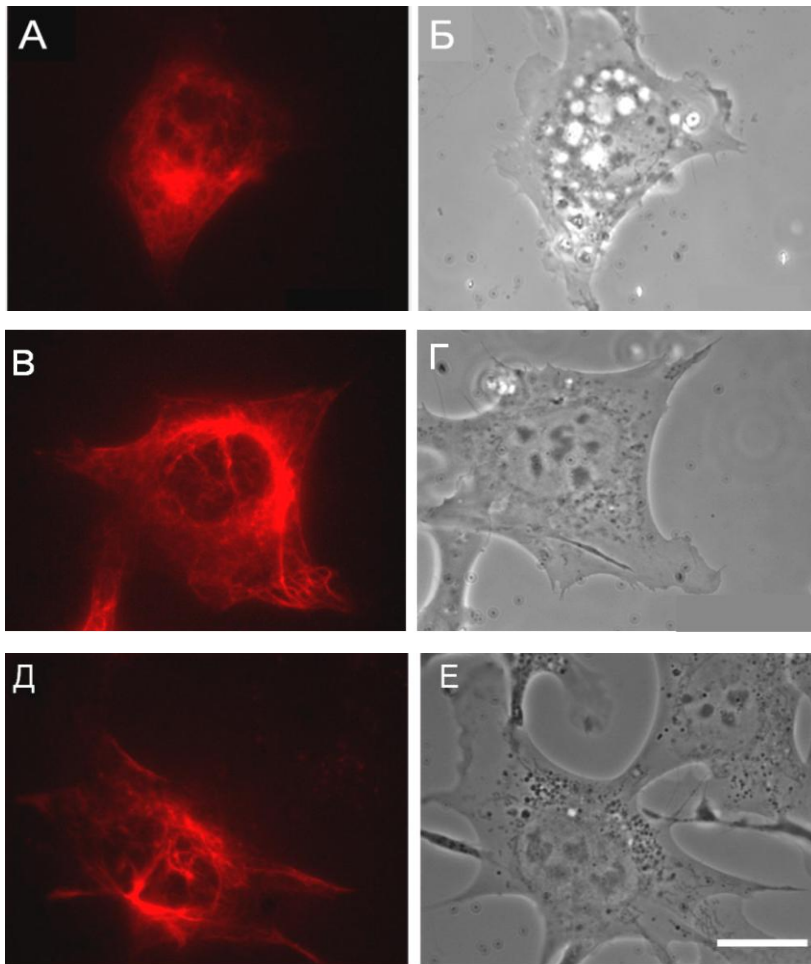


Рис. 4. Микрофотографии клеток MFT-16, экспрессирующих Vim- Δ 56 (А, Б), Vim - Δ 26 (В, Г) и Vim - P56R (Д, Е), полученные при помощи флуоресцентной (А, В, Д) и фазово-контрастной (Б, Г, Е) микроскопии. Масштаб 10 мкм.

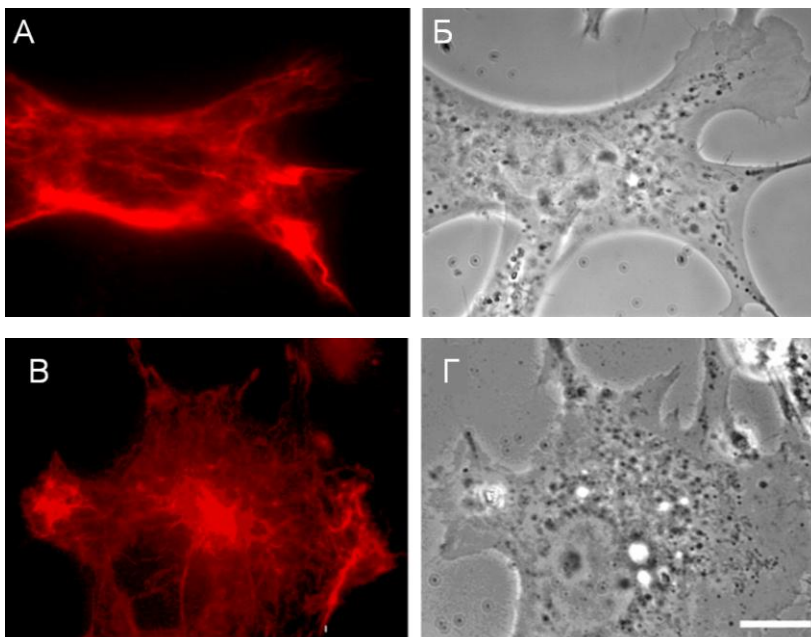


Рис. 5. Микрофотографии клеток MFT-16, экспрессирующих Vim- Δ 14 (А, Б) и Vim- Δ C, полученные при помощи флуоресцентной микроскопии (А, В) и фазового контраста (Б, Г). Масштаб 10 мкм.

На Рис. 5 (А-Г) показаны микрофотографии клеток с ПФ, состоящими из Vim-Δ14 и Vim-ΔС. В отличие от клеток, показанных на Рис. 4, в клетках с мутантами Vim-Δ14 и Vim-ΔС ПФ обычно имели повышенную плотность не только около ядра, но и по периферии клетки. Виментин собирался в ПФ далеко не во всех трансфицированных клетках. Во многих клетках выявлялись короткие нити, агрегаты меченого белка.

Заметим, что с плазмидами, содержащими кДНК мутантного виментина, можно ко-трансфицировать плазмиды, кодирующие как виментин дикого типа, меченый mCherry, так и мутантный виментин, соединённый с mCherry. В обоих случаях ПФ восстанавливались и имели нормальную, характерную для данного мутанта морфологию.

Таким образом, ПФ, состоящие из мутантов виментина Vim-Δ56, Vim-Δ26, Vim-P56R, Vim-Δ14 и Vim-ΔС можно выявлять в живой клетке.

Подвижность митохондрий в клетках с восстановленными ПФ

Ранее в нашей лаборатории было показано, что в клетках линии MFT-16 митохондрии более подвижны (относительная подвижность митохондрий 9%), чем в клетках MFT-6 с виментином дикого типа (4%) [Некрасова, 2007]. При восстановлении ПФ в клетках MFT-16 при помощи экспрессии виментина дикого типа, относительная подвижность митохондрий снижалась до 5%. Таким образом, различие в подвижности митохондрий между линиями клеток MFT-6 и MFT-16 определяется наличием ПФ.

В клетках MFT-16 с ПФ, восстановленными из мутантов виментина, мы определяли относительную подвижность митохондрий.

Как говорилось выше, ПФ восстанавливались не во всех трансфицированных клетках. Для анализа подвижности митохондрий мы находили клетки, которые отвечали определённым требованиям. Клетка должна была быть хорошо распластана, в ней должны были быть достаточно развитые ПФ. Только в таких клетках мы определяли относительную подвижность митохондрий.

Результаты анализа подвижности митохондрий в клетках представлены на Рис. 6. Оказалось, что в клетках с ПФ, которые состоят из разных мутантов виментина, относительная подвижность митохондрий различна.

На Рис. 6 (столбцы I, IV, V) видно, что если ПФ в клетке восстановлены из мутантов виментина Vim-Δ56, Vim-Δ26 или Vim-P56R, то подвижность митохондрий

высокая. В таких клетках она приближается к значению, характерному для клеток MFT-16 без виментина (9%). ПФ, построенные из таких мутантов виментина, практически не влияют на подвижность митохондрий, как будто ПФ в клетке нет.

Если ПФ состоят из виментина Vim- Δ 14 (Рис. 6, столбец III), то подвижность митохондрий оказывается такой же, как в клетках с виментином дикого типа (подвижность митохондрий в клетках MFT-16 с ПФ из виментина дикого типа 5%).

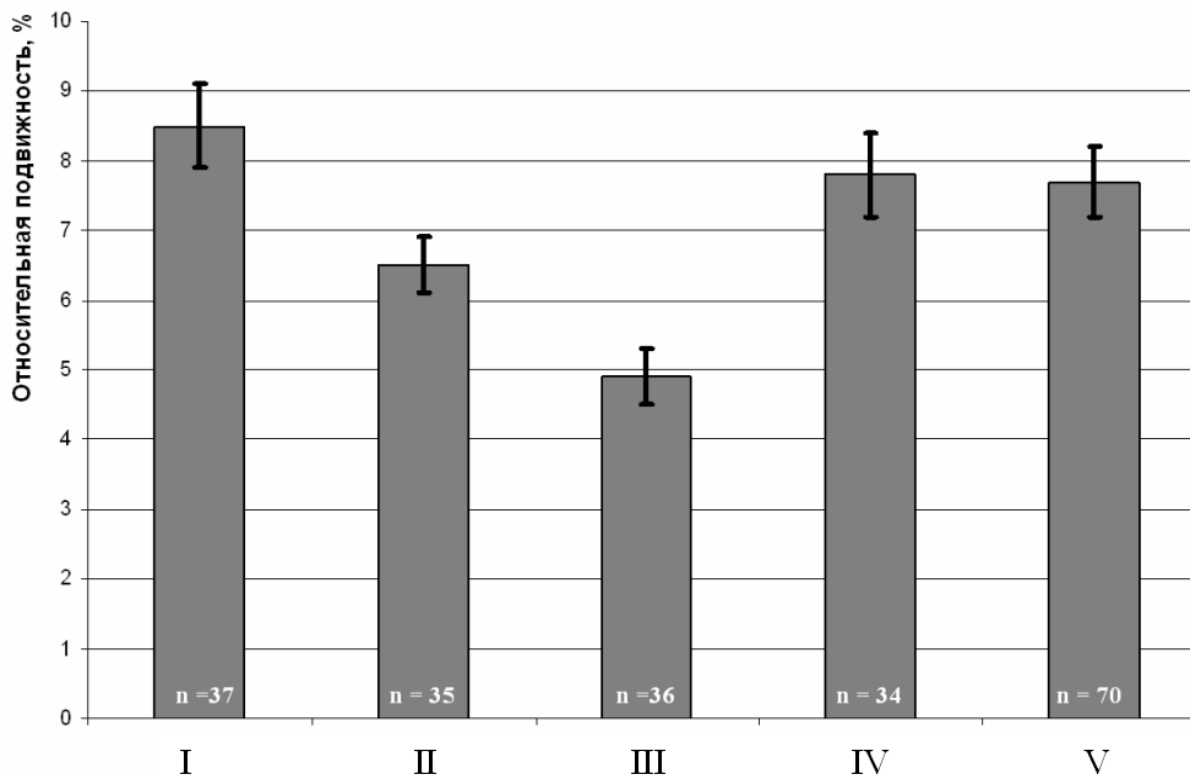


Рис. 6. Результаты определения относительной подвижности митохондрий в клетках MFT-16, ПФ в которых восстановлены при помощи: Vim- Δ 56 (I), Vim- Δ C (II), Vim- Δ 14 (III), Vim- Δ 26 (IV) и Vim-P56R (V). Погрешность представлена в виде стандартной ошибки (SEM), n – число проанализированных клеток.

В клетках MFT-16 с ПФ, построенными из виментина Vim- Δ C, (Рис. 6, столбец II) относительная подвижность митохондрий оказывалась ниже величины, характерной для клеток, в которых ПФ нет (коэффициент Стьюдента $p_t = 1.7E-6$), но выше, чем в клетках с виментином дикого типа ($p_t = 0,01$). Можно предположить, что в этом случае ПФ не теряют связи с митохондриями. Подвижность митохондрий выше, чем в клетках с виментином дикого типа, вероятно, из-за общего нарушения структуры ПФ [Kouklis et al., 1993]. Таким образом, С-концевой домен виментина, по-видимому, не участвует в связывании митохондрий.

Ингибирование подвижности митохондрий при восстановлении ПФ из мутанта виментина Vim- Δ 14, а также из виментина дикого типа, можно объяснить повышением

вязкости цитоплазмы в результате образования новой филаментной структуры. Однако, из мутантов Vim-Δ56 и Vim-Δ26 ПФ восстанавливаются, но ингибирование движения митохондрий не происходит. Таким образом, по-видимому, повышение вязкости в связи с восстановлением ПФ не играет существенной роли в снижении подвижности митохондрий. Вероятно, в случае мутантов Vim-Δ56 и Vim-Δ26 был удалён или повреждён участок взаимодействия виментина с митохондриями, а в виментине Vim-Δ14 он сохранился. В молекулах белков Vim-Δ56 и Vim-Δ26 удалён один и тот же участок N-концевого домена, включающий в себя 26 аминокислот. Точечная мутация Arg56/Pro содержится внутри этого же участка и, по-видимому, меняет его структуру. Таким образом, аминокислоты 44 – 69, удалённые в мутанте Vim-Δ26, играют важную роль в ингибировании подвижности митохондрий ПФ. Заметим, что для выявления ПФ в качестве меченого виментина брали как mCherry-виментин мутантный, так и mCherry-виментин дикого типа. На результат анализа подвижности митохондрий это не влияло. В химерных белках, используемых нами, mCherry присоединен к N-концу виментина. По-видимому, большой флуоресцентный белок лишал головной домен виментина возможности взаимодействовать с митохондриями.

Таким образом, участок виментина, важный для ингибирования подвижности митохондрий ПФ, расположен около аминокислот с 44 по 69.

Обсуждение результатов

В данной работе был найден участок молекулы виментина, который важен для ингибирования подвижности митохондрий ПФ в фибробластах.

Обнаруженные ранее различия в подвижности митохондрий между фибробластами, которые не содержали виментин, и клетками с виментином [Некрасова и др., 2007] можно было объяснить повышением вязкости цитоплазмы в результате образования новой филаментной структуры - ПФ. В данной работе мы показали, что ингибирование подвижности митохондрий происходит не из-за этого. Согласно полученным результатам из некоторых мутантов виментина ПФ восстанавливались, а подвижность митохондрий оставалась высокой, ПФ не ингибировали подвижность митохондрий. Вероятно, у этих мутантов виментина был удалён участок, важный для какого-то специфического взаимодействия, определяющего связывание виментина с митохондриями. Таким образом, по-видимому, виментиновые ПФ взаимодействуют с митохондриями в фибробластах.

Такое взаимодействие может осуществляться как непосредственно, так и при участии белка-посредника.

В качестве наиболее вероятного белка-посредника во взаимодействии виментина и митохондрий может выступать плектин. Например, показано, что изоформа плектина 1b в мышечных фибробластах специфически связывается с митохондриями и локализуется с виментиновыми ПФ [Rezniczek et al., 2003]. Эта изоформа плектина может связывать ПФ и митохондрии. Как мы показали, часть молекулы виментина, важная для ингибирования подвижности митохондрий ПФ, расположена в головном домене молекулы. Однако, согласно литературным данным, плектин взаимодействует с участком на центральном α -спиральном домене молекулы белка ПФ [Sevcik, et al., 2004]. По-видимому, если в клетке и осуществляется взаимодействие виментиновых ПФ с митохондриями при участии плектина, то оно не играет роли в ингибировании подвижности митохондрий.

Виментиновые ПФ могут взаимодействовать с митохондриями и непосредственно. Например, прямое взаимодействие с митохондриями было показано *in vitro* для нейрофиламентов [Wagner et al., 2003].

Наиболее вероятный способ непосредственного взаимодействия виментина с митохондриями – это его взаимодействие с каким-то белком на наружной мембране

митохондрий. Например, нейрофиламенты *in vitro* конкурируют с белком MAP2 за место связывания с митохондриями. MAP2 взаимодействует с потенциал-зависимым ионным каналом (порином) на наружной мембране митохондрий [Leterrier et al., 1994].

Другой возможный вариант непосредственного взаимодействия виментина с митохондриями – встраивание участка виментина в мембрану митохондрий. Белки, которые встраиваются в наружную мембрану митохондрий, имеют характерное строение полипептида, образующего трансмембранный участок. Сам полипептид несёт суммарный положительный заряд. В его центре расположен слабогидрофобный участок (помимо гидрофобных аминокислот могут встречаться глицин, серин, метионин, тирозин), состоящий из 16-20 аминокислот. Этот гидрофобный участок ограничен с двух сторон положительно заряженными аминокислотами [Rapaport, 2003]. Расположение аминокислот в участке молекулы виментина, принимающего участие в ингибировании подвижности митохондрий (аминокислоты с 44 по 69), несколько напоминает описанный выше трансмембранный домен. Из его 13 центральных аминокислот приблизительно половина гидрофобна, а остальные – слабополярны. Этот полипептид ограничен с двух сторон пятью остатками аргининов. В пользу предположения о взаимодействии виментина с мембраной митохондрий говорят и факты, обнаруженные в лаборатории П. Трауба. В этой лаборатории обратили внимание, что последовательность аминокислот виментина с 26 по 40 похожа на последовательность ДНК-связывающей петли белка G5P фага fd [Shoeman et al., 1999]. В той же лаборатории был выделен из клеток комплекс виментина с митохондриальной ДНК [Tolstonog, Mothes et al., 2001]. Возможно, выявленный нами участок виментина встраивается в наружную мембрану митохондрий, а участок, расположенный в начале N-концевого домена, взаимодействует с митохондриальной ДНК.

Таким образом, возможны различные варианты взаимодействия виментиновых ПФ с митохондриями. Вероятно, в клетке может реализовываться как непосредственное взаимодействие, так и при участии плектина. Однако, по-видимому, для ингибирования подвижности митохондрий ПФ в клетке наиболее важным является такой вариант взаимодействия ПФ и митохондрий, в котором принимают участие аминокислоты с 44 по 69 виментина.

Выводы

1. Подобраны условия для восстановления в клетках MFT-16 ПФ, состоящих из мутантных форм виментина Vim-Δ56, Vim -Δ26, Vim –Δ14, Vim -P56R и Vim –ΔC, и выявления этих ПФ в живых клетках.

2. Получен мутант виментина Vim -Δ26, который сохраняет способность восстанавливать ПФ. ПФ, состоящие из такого мутанта виментина, не ингибируют подвижность митохондрий.

3. Определена относительная подвижность митохондрий в клетках MFT-16, ПФ в которых состоят из мутантных форм виментина Vim-Δ56, Vim -Δ26, Vim –Δ14, Vim -P56R и Vim –ΔC.

4. Показано, что для ингибирования подвижности митохондрий ПФ важен участок на N-концевом домене виментина, расположенный около аминокислот с 44 по 69.

Список литературы

1. Кулик А. В., Некрасова О. Е., Минин А. А. Фибриллярный актин регулирует подвижность митохондрий // Биологические мембраны. 2006. Т. 23. № 1. с. 42-51.
2. Некрасова О. Е., Кулик А. В., Минин А. А. Протеинкиназа С регулирует подвижность митохондрий. // Биологические мембраны. 2007. Т. 24. № 2. с. 126-132.
3. Alberts B et. al. (2002). Molecular biology of the cell. New York: Garland Science. 4th edn. 907-982
4. Allen R. D., Metzels J., Tasaki I., Brady S. T. and Gilbert S. P. Fast axonal transport in squid giant axon // Science. 1982. Vol. 218. p. 1127-1129
5. Andrä K, Lassmann H, Bittner R, Shorny S, Fässler R, Propst F, Wiche G. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. Genes Dev. 1997 Dec 1;11(23):3143-56.
6. Andrä K, Nikolic B, Stöcher M, Drenkhahn D, Wiche G. Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. Genes Dev. 1998 Nov 1;12(21):3442-51.
7. Angelides KJ, Smith KE, Takeda M. Assembly and exchange of intermediate filament proteins of neurons: neurofilaments are dynamic structures. J Cell Biol. 1989 Apr;108(4):1495-506.
8. Appaix F., Kuznetsov A. V., Usson Y., Kay L., Andrienko T., Olivares J., Kaambre T., Sikk P., Margreiter R. and Saks V. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria // Exp. Physiol. 2003. Vol. 88. p. 175-190.
9. Bahler M., Kroschewski R., Stoffler H. E. and Behrmann T. (1994). Rat myr 4 defines a novel subclass of myosin I: identification, distribution, localization, and mapping of calmodulin-binding sites with differential calcium sensitivity // J. Cell Biol. Vol. 126. p. 375-389.
10. Brady S. T., Lasek R. J. and Allen R. D. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon // Science. 1982. Vol. 218. p. 1129-1131.
11. Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function // Trends. Cardiovasc. Med. 2002. Vol. 12. p. 339-348.
12. Chada S. R. and Hollenbeck P. J. Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling // J. Exp. Biol. 2003. Vol. 206. p. 1985-1992.
13. Chada SR, Hollenbeck PJ. Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. Curr Biol. 2004;14(14):1272-6.

14. Colucci-Guyon E., Gimenez M., Ribotta Y., Maurice T., Babinet C., Privat A., Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin, *Glia* 25 (1999) 33–43.
15. Colucci-Guyon E., Portier M.M., Dunia I., Paulin D., Pournin S., Babinet C., Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype, *Cell* 79 (1994) 679–694.
16. Eckes B., Colucci-Guyon E., Smola H., Nodder S., Babinet C., Krieg T., Martin P., Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 2455–2462.
17. Eckes B., Dogic D., Colucci-Guyon E., Wang N., Maniotis A., Ingber D., Merckling A., Langa F., Aumailley M., Delouvee A., Koteliansky V., Babinet C., Krieg T., Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts, *J. Cell Sci.* 111 (Pt 13) (1998) 1897–1907.
18. Elliott CE, Becker B, Oehler S, Castañón MJ, Hauptmann R, Wiche G. Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics.* 1997 May 15;42(1):115-25.
19. Esue O, Carson AA, Tseng Y, Wirtz D. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *J Biol Chem.* 2006 Oct 13;281(41):30393-9. Epub 2006 Aug 9.
20. Fuchs E. and Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. Vol. 63. p. 345-382.
21. Gohara, R., Tang, D., Inada, H., Inagaki, M., Takasaki, Y., and Ando, S. (2001). Phosphorylation of vimentin head domain inhibits interaction with the carboxyl-terminal end of alpha-helical rod domain studied by surface plasmon resonance measurements. *FEBS Lett.* 489, 182–186.
22. Goldman RD, Chou YH, Prahlad V, Yoon M. Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J.* 1999 Dec;13 Suppl 2:S261-5.
23. Gonzales M, Weksler B, Tsuruta D, Goldman RD, Yoon KJ, Hopkinson SB, Flitney FW, Jones JC. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 2001 Jan;12(1):85-100.
24. Gottlieb, E., M.G. Vander Heiden, and C.B. Thompson. 2000. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20:5680–5689.

25. Green, K.J., Virata M.L.A., Elgart G.W., Stanley J.R., Parry D.A.D. (1992) Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin: members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *Intern. J. Biol. Macromol*, 14, 145-153
26. Gyoeva F.K., Gelfand V.I. (1991). Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature*. 353(6343), 445-448
27. Helfand B. T., Chang L. and Goldman R. D. (2004) Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J. Cell Sci.*, 117, 133-141
28. Herrmann H., Aebi U. Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* 2004, 73, 749–89
29. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Feb;12(1):79-90. Review.
30. Herrmann H, Bär H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):562-73. Review.
31. Herrmann H, Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol.* 1996 Dec 20;264(5):933-53.
32. Herrmann H, Hofmann I, Franke WW. Identification of a nonapeptide motif in the vimentin head domain involved in intermediate filament assembly. *J Mol Biol.* 1992 Feb 5;223(3):637-50.
33. Herrmann H., Häner M., Brettel M., Ku N.O., Aebi U. (1999). Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J. Mol. Biol.* 286, 1403–20
34. Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci.* 2001 Jul;114(Pt 14):2569-75.
35. Hockenbery, D.M., Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75:241–251.
36. Hollenbeck P. J. The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons // *Front. Biosci.* 1996. Vol. 1, d. p. 91-102.
37. Hollenbeck P. J., Bershadsky A. D., Pletjushkina O. Y., Tint I. S, and Vasiliev J. M. (1989) Intermediate filament collapse is an ATP-dependent and actin-dependent process. *J. Cell Sci.* 92, 621-631

38. Holwell T.A., Schweitzer S.C., Evans R.M. (1997), Tetracycline regulated expression of vimentin in fibroblasts derived from vimentin null mice. *J Cell Sci.* 16, 1947-56
39. Hotani H, Horio T Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988 10:1-2 229-36
40. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol.* 1997 May 5;137(3):633-48.
41. Jones JC, Hopkinson SB, Goldfinger LE. Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays.* 1998 Jun;20(6):488-94.
42. Kang JS, Tian JH, Pan PY, Zald P, Li C, Deng C, Sheng ZH. Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell.* 2008 11;132(1):137-48.]
43. Kouklis P.D. et. al. In vitro assembly properties of vimentin mutagenized at the β -site tail motif. *J. Cell Sci.* 106, 919-928 (1993)
44. Krendel M., Sgourdas G. and Bonder E. M. Disassembly of actin filaments leads to increased rate and frequency of mitochondrial movement along microtubules // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 1998. Vol. 40. p. 368-378.
45. Ku N. O., Zhou X., Toivola D. M. and Omary M. B. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 277, G p. 1108-1137.
46. Leterrier J. F., Rusakov D. A., Nelson B. D. and Linden M. Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro // *Microsc. Res. Tech.* 1994b. Vol. 27. p. 233-261.
47. Li QF, Spinelli AM, Wang R, Anfinogenova Y, Singer HA, Tang DD. Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase in vimentin cytoskeleton signaling. *J Biol Chem.* 2006 Nov 10;281(45):34716-24. Epub 2006 Sep 20.
48. Li Z., Okamoto K., Hayashi Y. and Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses // *Cell.* 2004. Vol. 119. p. 873-887.
49. Martys J L., Ho C-L, Liem R K. H, Gundersen G G (1999) Intermediate Filaments in Motion: Observations of Intermediate Filaments in Cells Using Green Fluorescent Protein-Vimentin. *Mol Biol of the Cell* Vol. 10, 1289–1295,
50. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol.* 2000 Sep 18;150(6):1283-98.

51. Minin A. A., Kulik A. V., Gyoeva F. K., Li Y., Goshima G. and Gelfand V. I. Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins // *J. Cell Sci.* 2006. Vol. 119. p. 659-670.
52. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982 Nov;31(1):11-24.
53. Monteiro MJ, Cleveland DW. Expression of NF-L and NF-M in fibroblasts reveals coassembly of neurofilament and vimentin subunits. *J Cell Biol.* 1989 Feb;108(2):579-93.
54. Morris R. L. and Hollenbeck P. J. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons // *J. Cell Biol.* 1995. Vol. 131. p. 1315-1326.
55. Morris R. L. and Hollenbeck P. J. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth // *J. Cell Sci.* 1993. Vol. 104 (Pt 3). p. 917-927.
56. Nieminen M., Henttinen T., Merinen M., Marttila -Ichihara F., Eriksson J.E., Jalkanen S., Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 156–162.
57. Pachter JS, Liem RK. alpha-Internexin, a 66-kD intermediate filament-binding protein from mammalian central nervous tissues. *J Cell Biol.* 1985 Oct;101(4):1316-22
58. Paulin D. and Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle // *Exp. Cell Res.* 2004. Vol. 301. p. 1-7.
59. Pollard T. D. and Beltzner C. C. Structure and function of the Arp2/3 complex // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. Vol. 12. p. 768-774.
60. Rapaport D. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep.* 2003 Oct;4(10):948-52. Review.
61. Reipert S., Steinböck F., Fischer I., Bittner R.E., Zeöld A. and Wiche G. (1999) Association of mitochondria with plectin and desmin intermediate filaments in striated muscle. *Exp. Cell Res.*, 252, 479–491
62. Renner W., Franke W.W., Schmid E., Geisler N., Weber K., Mandelkow E. (1981). Reconstitution of intermediate-sized filaments from denatured monomeric vimentin. *J. Mol. Biol.* 149, 285–306
63. Rezniczek G.A., Abrahamsberg C., Fuchs P., Spazierer D., Wiche G. (2003) Plectin 5'-transcript diversity: short alternative sequences determine stability of gene products, initiation of translation and subcellular localization of isoforms *Human Molecular Genetics*, 12, 23 3181–3194

64. Ruhrberg C, Watt FM. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 Jun;7(3):392-7.
65. Sevcik, J., et al., Actin-binding domain of mouse plectin. Crystal structure and binding to vimentin. *Eur J Biochem*, 2004. 271(10): p. 1873-84.
66. Shoeman RL, Hartig R, Berthel M, Traub P. (2002) Deletion mutagenesis of the amino-terminal head domain of vimentin reveals dispensability of large internal regions for intermediate filament assembly and stability. *Exp Cell Res.* Oct 1;279(2):344-53.
67. Shoeman RL, Hartig R, Traub P. Characterization of the nucleic acid binding region of the intermediate filament protein vimentin by fluorescence polarization. *Biochemistry.* 1999 Dec 21;38(51):16802-9.
68. Sin W.C., Chen X.Q., Leung T., Lim L., RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 6325–6339.
69. Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD (1999) .A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem.* Apr 2;274(14):9881-90.
70. Steinert PM, Marekov LN, Parry DA. Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25;268(33):24916-25.
71. Styers ML, Kowalczyk AP, Faundez V. Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic.* 2005 May;6(5):359-65.
72. Styers ML, Salazar G, Love R, Peden AA, Kowalczyk AP, Faundez V. The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2004 Dec;15(12):5369-82. Epub 2004 Sep 29.
73. Thornell L, Carlsson L, Li Z, Mericskay M, Paulin D. (1997) Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 8, 2107-2124
74. Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, Omary MB. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 2005 Nov;15(11):608-17. Epub 2005 Oct 3. Review.
75. Tolstonog GV, Mothes E, Shoeman RL, Traub P. Isolation of SDS-stable complexes of the intermediate filament protein vimentin with repetitive, mobile, nuclear matrix attachment region, and mitochondrial DNA sequence elements from cultured mouse and human fibroblasts. *DNA Cell Biol.* 2001 Sep;20(9):531-54.

76. Tolstonog GV, Shoeman RL, Traub U, Traub P. Role of the intermediate filament protein vimentin in delaying senescence and in the spontaneous immortalization of mouse embryo fibroblasts. *DNA Cell Biol.* 2001 Sep;20(9):509-29.
77. Traub P, Scherbarth A, Wieggers W, Shoeman RL. Salt-stable interaction of the amino-terminal head region of vimentin with the alpha-helical rod domain of cytoplasmic intermediate filament proteins and its relevance to protofilament structure and filament formation and stability. *J Cell Sci.* 1992 Feb;101 (Pt 2):363-81.
78. Vikstrom KL, Borisy GG, Goldman RD. Dynamic aspects of intermediate filament networks in BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jan;86(2):549-53.
79. Wagner OI, Lifshitz J, Janmey PA, Linden M, McIntosh TK, Leterrier JF. Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. *J Neurosci.* 2003 Oct 8;23(27):9046-58.
80. Wang Q, Shoeman R, Traub P. (2000) Abstract Identification of the amino acid residues of the amino terminus of vimentin responsible for DNA binding by enzymatic and chemical sequencing and analysis by MALDI-TOF. *Biochemistry.* Jun 6;39(22):6645-51.
81. Watanabe N., Kato T., Fujita A., Ishizaki T. and Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization // *Nat. Cell Biol.* 1999. Vol. 1. p. 136-143.
82. Wegner A. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 1976 Nov 108:1 139-50
83. Werner E, Werb Z. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J Cell Biol.* 2002 Jul 22;158(2):357-68. Epub 2002 Jul 15
84. Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci.* 1998 Sep;111 (Pt 17):2477-86.