61**:**07**-**3/925

**РОССИИ(JKал АкАДЬіУІИЯ НАУК ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАД. М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА**

*На правах рукописи УДК 577.1*

**ГУРЬЯНОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА Участие адапторных белков RIL и TRIP6 в организации актинового цитоскелета и злокачественной трансформации**

**03.00.03 - молекулярная биология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель к.б.н. Фролова Е.И.**

**МОСКВА, 2007**

**Оглавление**

[**Список сокращений 7**](#bookmark5)

[**Введение 11**](#bookmark6)

1. [**Обзор литературы 13**](#bookmark7)
2. [**Адапторные белки 13**](#bookmark8)
3. [**Особенности LIM-доменов 13**](#bookmark9)
4. **Характеристика PDZ-доменов 16**
5. **Ген** *TRIP6* **18**
6. **Ген** *RIL* **19**
7. **RIL - представитель семейства белков ALP/Enigma 20**
8. **Происхождение и эволюционная консервативность семейства ALP/Enigma 21**
9. **Геномная организация гена** *RIL* **человека 23**
10. **Альтернативные транскрипты гена** *RIL* **человека 24**
11. [**Эволюционная консервативность** *RIL* **27**](#bookmark10)
12. [**Анализ экспрессии** *RIL* **и других членов семейства ALP/Enigma в различных тканях 27**](#bookmark11)
13. [**Репертуар взаимодействий белка RIL 30**](#bookmark13)

[**RIL взаимодействует с протеинтирозинфосфатазой PTP-BL 30**](#bookmark14)

[*Краткая функциональная характеристика PTP-Bas/PTP-BL* **31**](#bookmark15)

[**RIL взаимодействует с LIM-доменным белком TRIP6 32**](#bookmark16)

1. [**Роль RIL в поддержании структуры актиновых стресс-фибрилл 33**](#bookmark17)

[*Краткая характеристика а-актининов* **35**](#bookmark18)

1. [**Транспортная функция RIL 37**](#bookmark19)
2. [**Возможное участие** *RIL* **в злокачественной трансформации 38**](#bookmark20)
3. [**Данные о дифференциальной экспрессии** *RIL,* **полученные с использованием микропанелей олигонуклеотидов 40**](#bookmark21)

**з**

1. [**Лентивирусная система экспрессии 41**](#bookmark22)
2. [**РНК-интерференция 43**](#bookmark23)

[**II. Материалы и методы 45**](#bookmark24)

1. [**Работа с культурами эукариотических клеток 45**](#bookmark25)

[**II. 1.1. Клеточные линии, использованные в работе, и их культивирование 45**](#bookmark26)

[**II. 1.2. Трансфекция 46**](#bookmark27)

[**II. 1.3. Упаковка лентивирусных частиц 47**](#bookmark28)

[**II. 1.4. Очистка вирионов и трансдукция 48**](#bookmark29)

**II. 1.5. Определение эффективного титра вирусных частиц и множественности**

**заражения клеток 48**

1. [**1.6. Оценка скорости клеточного деления 49**](#bookmark31)
2. [**1.7. Определение скорости миграции клеток 49**](#bookmark32)

[**Метод «зарастания раны» 49**](#bookmark33)

[**Оценка подвижности клеток с помощью трансмиграционных камер 49**](#bookmark34)

1. [**1.8. Измерение клеточной адгезии 50**](#bookmark35)
2. [**1.9. Колониеобразование в полужидкой среде 51**](#bookmark36)
3. [**Проточно-цитометрический анализ 51**](#bookmark37)
4. [**Работа с плазмидной ДНК и клонирование 52**](#bookmark38)
5. [**Получение химически компетентных клеток** *E.coli* **52**](#bookmark39)

[**И.2.2. Трансформация химически компетентных клеток** *E.coli* **52**](#bookmark40)

1. [**Препаративное и аналитическое выделение плазмидной ДНК 53**](#bookmark41)
2. [**Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции 53**](#bookmark42)
3. [**Фракционирование и извлечение ДНК из агарозных гелей 53**](#bookmark43)
4. [**Лигирование ДНК 53**](#bookmark44)
5. [**Векторы и плазмидные конструкции, использованные в работе 54**](#bookmark45)
6. [**Получение конструкций, экспрессирующих немеченые белки и белки, слитые с эпитопами Flag, НА, GFP 55**](#bookmark46)
7. [**Получение конструкций для экспрессии РНК-шпилек для РНК- интерференции 57**](#bookmark47)
8. [**Получение репортерных конструкций 58**](#bookmark48)

[**И.З. Выделение и анализ РНК 60**](#bookmark49)

1. [**Выделение РНК, фракционирование и перенос на мембраны 60**](#bookmark50)
2. [**Нозерн-блот анализ 60**](#bookmark51)
3. [**ОТ-ПЦР 61**](#bookmark52)

[**П.3.4. Выделение и анализ мРНК, связанной полисомами 63**](#bookmark53)

1. [**4. Методы выделения и анализа белков 64**](#bookmark54)
2. [**Получение тотальных клеточных лизатов 64**](#bookmark55)

[**И.4.2. Получение Triton Х-100-растворимой и нерастворимой фракций 64**](#bookmark56)

1. [**Фракционирование белков, перенос на мембрану и иммунодетекция 65**](#bookmark57)
2. [**Иммунопреципитация 68**](#bookmark58)
3. [**Иммунофлюоресценция 68**](#bookmark59)
4. [**Определение соотношения полимеризованного и неполимеризованного актина с помощью конфокальной микроскопии 70**](#bookmark60)
5. [**Колориметрическое измерение активности р-галактозидазы (ONPG- окрашивание) 73**](#bookmark64)
6. [**Измерение активности люциферазы 73**](#bookmark65)
7. [**Оценка времени полужизни белка 74**](#bookmark66)
8. [**Результаты и обсуждение 75**](#bookmark67)
9. [**1. Оптимизация некоторых методов 75**](#bookmark68)
10. [**1.1. Оптимизация упаковки псевдовирусных частиц 75**](#bookmark69)
11. [**1.2. Оптимизация структуры РНК-шпильки для РНК-интерференции 78**](#bookmark70)
12. [**Влияние измененного уровня экспрессии** *TRIP б* **и** *RIL* **на морфологию и физиологию клеток карцином 80**](#bookmark72)
13. **Тестирование конструкций для экспрессии shPHK, специфичных генам** *TRIP6* **и** *RIL* **81**
14. [**Подавление экспрессии гена** *TRIP6* **приводит к изменению морфологии клеток 82**](#bookmark76)
15. **Изменение уровня экспрессии гена** *RIL* **влияет на морфологию клеток 85**
16. [**Влияние изменения уровней экспрессии** *TRIP6* **и** *RIL* **на скорость миграции клеток 86**](#bookmark83)
17. [**Экспрессия** *TRIP6* **и** *RIL* **и скорость пролиферации клеток 88**](#bookmark85)
18. [**Экспрессия** *TRIP6* **и** *RIL* **по-разному влияет на способность клеток к росту в условиях анойкиса 89**](#bookmark87)
19. [**Гиперэкспрессия** *RIL* **усиливает адгезию клеток 91**](#bookmark88)

**Ш.2.8. Возможные механизмы эффектов, наблюдаемых при подавлении**

**экспрессии** *TRIP6* **92**

1. [**Возможная роль** *RIL* **при раке молочной железы 93**](#bookmark91)
2. **Анализ экспрессии мРНК** *RIL* **в опухолях человека 95**
3. **Экспрессия** *RIL* **в культурах клеток рака молочной железы человека 96**
4. [**Статус RIL обратно коррелирует с экспрессией эпителиального маркера Е- кадгерина в культурах клеток рака молочной железы 97**](#bookmark94)
5. [**Изучение механизмов регуляции экспрессии** *RIL* **и Е-кадгерина при раке молочной железы 99**](#bookmark98)
6. **Роль альтернативных изоформ RIL в реорганизации актинового цитоскелета 103**
7. [**Изучение взаимодействия RIL с а-актинином 103**](#bookmark102)
8. **Альтернативные варианты RIL имеют различную локализацию в клетке 105**
9. [**Изоформы RIL меняют распределение а-актинина-1 между цитоскелет- ассоциированным состоянием и цитозолем 109**](#bookmark105)
10. **RIL повышает степень полимеризации актина за счет своего LIM доменаї 10**
11. [**LIM домен RIL ингибирует разборку актиновых волокон 112**](#bookmark107)
12. **Карбокситерминальный пептид альтернативных форм RIL является сигналом**

**протеасомной деградации 116**

1. [**Выявление короткоживущих форм RIL 116**](#bookmark111)
2. [**Альтернативный С-концевой пептид RIL дестабилизирует гетерологичные белки 118**](#bookmark112)
3. **Альтернативный С-концевой пептид RIL содержит PEST-мотив - сигнал протеасомной деградации 120**

[**Выводы 122**](#bookmark116)

[**Благодарности 123**](#bookmark117)

[**Список литературы 124**](#bookmark118)

**Список сокращений**

**а.о. - аминокислотный остаток**

**БСА - бычий сывороточный альбумин**

**ВИЧ - вирус иммудефицита человека**

**ВПЧ-18 - вирус папилломы человека 18 серотипа**

**ДКП - длинный концевой повтор**

**ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота**

**ДТТ - дитиотрейтол**

**н. - нуклеотид**

**ОРС - открытая рамка считывания ОТ - обратная транскрипция**

**ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция, проведенная на матрице, полученной при обратной транскрипции п.н. - пара нуклеотидов ПЦР - полимеразная цепная реакция ПЭГ - полиэтиленгликоль РНК - рибонуклеиновая кислота СЯЭ - сигнал ядерного экспорта ФСБ - фосфатно-солевой буфер ЭГТА - этиленгликольтетрауксусная кислота ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота ЭМТ - эпителиально-мезенхимальная трансформация ЭТС - эмбриональная телячья сыворотка**

**AF (AlexaFluor) - общее название флюоресцентных красителей, разработанных компанией Molecular Probes**

**ALP (a-actinin associated LIM domain protein) - а-актинин-ассоциированный LIM-доменный белок**

**АРС (от adematous poliposis coli) - ген-опухолевый супрессор, мутации которого идентифицированы при семейном аденоматозном полипозе и спорадических опухолях ободочной кишки CEF (от chicken embryonic fibroblasts) - куриные эмбриональные фибробласты CLP-36 (от carboxyl-terminal LIM domain protein of 36 kDa) - карбокси-терминальный LIM- доменный белок массой 36 кДа CytB (Cvtochalasin В) - цитохалазин Б**

**DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - ростовая среда Игла, модифицированная Дульбекко**

**DMSO (dimethyl sulfoxide) - диметил сульфоксид**

**EGFR (от epidermal growth factor receptor) - рецептор эпидермального фактора роста ENH (от Enigma homologue) - белок, гомологичный белку Enigma**

**ERK (от extracellular signal-regulated kinase) - киназа, регулируемая внеклеточными сигналами, дерегуляция этого сигнального каскада часто встречается в канцерогенезе FACS (fluorescense-activated cell sorting) - метод проточно-цитометрической селекции клеток, основанной на их флуоресценции FITC (fluorescein isothiocyanate) - флуоресцеин изотиоцианат, зеленый флуоресцентный краситель**

**GFP (green fluorescent protein) - зеленый флуоресцентный белок**

**НА (от haemoagglutinin) - гемагглютинин, мотив, часто используемый для мечения экзогенно-экспрессируемых белков HIV-1 (human immunodeficiency virus typel) - вирус иммунодефицита человека, тип 1 НМЕС (human mammary epithelial cells) - клетки эпителия молочной железы человека HRP (от horseradish peroxidase) - пероксидаза хрена**

**ІкВ (от inhibitor of кВ) - ингибитор кВ**

**JNK (от Jun N-terminal kinase) - киназа N-конца Jun**

**lacZ - ген [3-галактозидазы**

**LatA (Latrunculin A) - латрункулин A**

**LB - среда Луриа-Бертани**

**LEF (от lymphoid enhancer factor) - лимфоидный энхансерный фактор, один из компонентов бета-катенин-зависимого сигнального** каскада **LIM - структурный белковый домен, названный по первым буквам генов** *ljn-11, ijl-1* **и** *тес-3,* **кодирующих белки, у которых он был впервые описан LTR (long terminal repeat) - длинный концевой повтор**

**mCMV (minimal promotor of cytomegalovirus early gene) - минимальный промотор раннего гена цитомегаловируса**

**MEGM (от mammary epithelium growth medium) - специализированная ростовая среда для культуры первичных эпителиоцитов молочной железы MES - 2-(К-Морфолино)этансульфоновая кислота**

**M-MLV (от Moloney murine leukemia virus) - вирус Молони лейкоза мышей NA (от numerical aperture) - числовая апертура объектива, характеристика, определяющая разрешающую способность линзы NFkB - ядерный фактор каппа Б (от nuclear factor кВ)**

**ONPG - о-нитрофенил-Р-В-галактопиранозид PDLIM (от PDZ and LIM protein)**

**PDZ - структурный белковый домен, названный** по **первым буквам белков PSD95, DlgA и ZO-1, у которых он был впервые** описан **PIPES - пиперазин-НМ’-бис(2-этан)сульфоновая кислота РТР** (от **protein tyrosine phosphatase) - тирозиновая фосфатаза RE (response element) - чувствительный элемент**

**RIL (reversion induced LIM gene/protein)**

**RISC (от RNA-induced silencing complex) - РНК-индуцированный комплекс, осуществляющий сайленсинг**

**SDS - додецилсульфат натрия**

**shPHK - короткая шпилечная РНК, используемая для РНК-интерференции (от англ. short hairpin)**

**SIN (от self-inactivating) - самоинактивирующийся ДКП, необходимый для получения ретровирусов, неспособных к репликации**

**siPHK- короткая интерферирующая РНК (от англ. short interfering)**

**TCF (от T-cell factor) - фактор T клеток, транскрипционный фактор, компонент бета-катенин- зависимого сигнального каскада, гиперактивация которого часто встречается в канцерогенезе**

**TGFp - трансформирующий фактор роста (3 (от англ. transforming growth factor Р)**

**THRp - рецептор тиреоидного гормона бета (от англ. thyroid hormone receptor)**

**TRIP6 (thyroid hormone receptor interacting protein 6)**

**VSV-G (от vescular stomatitit virus G protein) - оболочечный белок G вируса везикулярного стоматита, часто используется для псевдотипирования рекомбинантных вирусных частиц**

**WPRE (от woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) - посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка, повышает стабильность вирусных транскриптов**

**X-gal - 5-бром-4-хлор-3-индолил-р-0-галактопиранозид**

**ZASP (от Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein) - альтернативно сплайсированный PDZ-белок Z-диска**

**Введение**

**Недавнее завершение проекта «геном человека» параллельно с определением полной первичной структуры геномов многих других организмов, а также накопление большого массива данных об экспрессируемых последовательностях ставят перед исследователями принципиально новые задачи по обобщению, классификации и структурированию этой информации. Определение функций отдельных генов, поиск функциональных связей между ними, объединение их в функциональные цепочки, а затем и в функциональные сети - приоритетное направление современных молекулярной биологии и молекулярной генетики. Ключевую роль в интеграции сигнальных каскадов и тонкой регуляции их взаимодействий играют LIM-доменные цитоскелет-ассоциированные адапторные белки, представителями которых являются продукты генов** *RIL* **и** *TRIP6.*

**В свете многочисленных исследований последних лет некогда принятая точка зрения, что актиновый цитоскелет - просто статическая структура, обеспечивающая поддержание формы клеток, выглядит чрезмерным упрощением. Состояние актинового цитоскелета модулирует активность многих сигнальных каскадов; его интактность - необходимое условие внутриклеточного транспорта органелл. Реорганизация актинового цитоскелета играет основную роль в процессах адгезии и миграции клеток, а также при их злокачественной трансформации. В связи с этим выявление конкретных механизмов регуляции состояния цитоскелета, а также поиск и всестороннее изучение белков, вовлеченных в эти процессы, является одним из приоритетных направлений современной молекулярной и клеточной биологии. Изучение функциональных особенностей цитоскелет- ассоциированных белков RIL и TRIP6 может пролить свет на многие аспекты клеточной физиологии и опухолевой прогрессии, открывает широкие перспективы для детального реконструирования механизмов их участия в реорганизации актинового цитоскелета в норме и патологии и закладывает основы для разработки в будущем новых подходов к диагностике и лечению рака.**

**Основной целью данной работы явилось исследование функциональных особенностей цитоскелет-ассоциированных LIM-доменных белков TRIP6 и RIL, их влияния на реорганизацию актинового цитоскелета, на морфологию и физиологию клеток, а также их возможное влияние на инвазивные свойства опухолевых клеток.**

**В ходе исследования были поставлены следующие задачи:**

1. **Изучение влияния уровня экспрессии TRIP6 на морфологические и функциональные особенности клеток линий карцином.**
2. **Изучение морфологических и функциональных особенностей клеток линий карцином с измененным уровнем экспрессии RIL.**
3. **Анализ уровня экспрессии RIL в опухолях различного гистогенеза, в частности при раке молочной железы.**
4. **Выявление роли доменов белка RIL при его взаимодействии с альфа-актинином, и их влияние на состояние актинового цитоскелета.**
5. **Определение функционального мотива белка RIL, влияющего на стабильность белка RIL, и исследование механизма его деградации.**

**В методической части работы были поставлены задачи по оптимизации упаковки лентивирусных частиц для повышения эффективности трансдукции экспрессионных кассет в клетки-мишени и по совершентствованию структуры РНК-шпильки для наиболее эффективной РНК-интерференции в рамках лентивирусной экспрессии.**

1. **Обзор литературы**
2. **Адапторные белки**

**Основная отличительная черта адапторных белков - наличие нескольких доменов, обеспечивающих белок-белковые взаимодействия. Белки этого класса служат основой для образования крупных сигнальных комплексов, отвечая за правильное проведение сигнала. Они диктуют специфичность межмолекулярных взаимодействий, внутриклеточную локализацию отдельных белков и целых комплексов и могут модулировать активность своих белков-партнеров [1].**

**Отсутствие у TRIP6 и RIL собственной ферментативной активности, а также наличие PDZ (у RIL) и LIM-доменов (у TRIP6 и RIL) - мотивов, ответственных за белок-белковые взаимодействия, - позволяют отнести их к классу адапторных белков. Рассмотрим структуру и функции этих двух доменов более подробно.**

1. **Особенности LIM-доменов**

**Белки, содержащие LIM-домены, были обнаружены относительно давно. В начале 90- х годов прошлого века были идентифицированы три структурно похожих гена, которые кодировали транскрипционные факторы, содержащие ДНК-связывающий гомеодомен, а также две тандемные копии некоего цистеин-богатого мотива. Это были ген** *Пп-11,* **участвующий в контроле пролиферации клеток-предшественников вульвы у** *Caenorhabditis elegans, lsl-1,* **кодирующий белок, который связывается с энхансером гена инсулина, а также ген** *тес-3,* **кодирующий фактор, необходимый для дифференцировки рецепторных нейронов у нематод [2]. Эти высококонсервативные цистеин-богатые структуры, имеющие два тандемно-расположенных цинковых пальца (консенсусная последовательность - С-Х**2**-С-Х**16**-** 23**-H-X2C-X**2**-C-X**2**-C-Xi**6**.**2**iC-X**2**-(C/H/D), где X - любая аминокислота) были названы LIM- доменами [3]. Попытки выявить непосредственное связывание LIM-доменов с ДНК успехом не увенчались [4]. На сегодняшний день утвердилась точка зрения, что LIM-домен - домен белок-белковых взаимодействий. Петли цинковых пальцев могут отличаться по длине и аминокислотной последовательности (Рисунок 1), что обеспечивает специфичность и широкий спектр белков-интеракторов.**

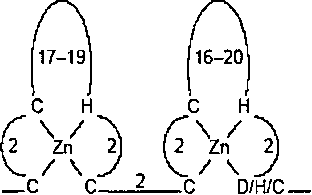


Рисунок 1. Схематичное изображение аминокислотной структуры LIM-домена.

**В настоящий момент в геноме человека идентифицировано 58 генов, кодирующих 135 LIM-доменов. Количество LIM-доменов варьирует от одного до пяти, причем эти мотивы могут быть ассоциированы с совершенно разными функциональными доменами, такими как уже упоминавшийся гомеодомен, каталитические домены или другие домены межбелковых взаимодействий. Интересно отметить, что большинство охарактеризованных LIM-белков могут напрямую или опосредованно связываться с актиновым цитоскелетом (см. ниже).**

**LIM-домены не имеют собственной каталитической активности. Тем не менее, LIM- белки участвуют во многих биологических процессах за счет связывания с белками- мишенями. На основании анализа большого числа LIM-белков и их взаимодействий было выделено четыре основных механизма, посредством которых они модулируют функции других белков: LIM-белки могут а) действовать как адаптеры, Ь) конкурировать за связывание с мишенями или «вытитровывать» другие белки из сигнальных комплексов, с) менять конформацию других белков или d) локализовать белки-интеракторы в соответствующие компартменты клетки (Рисунок 2).**

**а Адаптер**

**в Конформер**

***г+а,*** **□**

<ЭО - Белки-мишени

**OmQ)**

Открытый

Неактивный

(нефункциональный)

Активный

(функциональный)

Закрытый

***г* Локализатор**

***б* Конкурент**

**(О,**

Активный

.(LJ) (О)

Неактивный

Сайт X

Сайт X

Сайт X

Рисунок 2. Четыре механизма, посредством которых LIM-белки модулируют функции своих партнеров, а - Адаптеры организуют белковые комплексы таким образом, чтобы обеспечить максимальную активность своих партнеров, б - LIM-домен может иметь различное сродство к своим мишеням, и активность LIM-комплекса будет зависеть от конкурентного связывания, *в* - Некоторые белки могут иметь «открытую» и «закрытую» конформации, и соответственно, разную активность; связывание с LIM-доменом других белков может снимать такое аутоингибирование и способствовать «переключению» из одного состояния в другое, *г -* LIM-белки могут локализовать себя и/или своих партнеров по связыванию в определенные компартменты

Недавно в литературе появились сообщения о том, что LIM домен также может обладать ЕЗ-убиквитин-лигазной функцией [5, 6]. Группой ученых под руководством Grusby был идентифицирован LIM-доменный белок SLIM, необходимый для убиквитинирования *in vitro* и *in vivo* белка STAT4, который играет ключевую роль в передаче сигнала от цитокинов. ЕЗ-убиквитин-лигазная активность приписывается LIM-домену на основе сходства укладки петель его цинковых пальцев и структуры RING- и PHD-доменов [7] - характерных компонентов убиквитин- и SUMO-лигаз. Тем не менее, прямого доказательства участия именно LIM-домена в переносе активированного убиквитина с Е2-убиквитин- конъюгирующего фермента на белок-мишень представлено не было.

Таким образом, домены межбелковых взаимодействий, включая и LIM-домен, признаны ключевыми компонентами регуляторной системы клетки [8].

**момент описано по меньшей мере 4 алыернативно-сплайсированные изоформы, у трех из которых отсутствуют все три LIM домена. Предполагается, что функционируют такие укороченные варианты как доминантно-негативные регуляторы полноразмерного белка [60].** *Mystique/PDLIM2* **кодирует по меньшей мере 3 изоформы, дифференциально экспрессируемые в различных тканях [37]. В литературе имеется упоминание о существовании двух альтернативных форм ALP - гладкомышечной smALP и скелетной skALP [61]. Как уже упоминалось ранее, альтернативный сплайсинг - основной механизм, обеспечивающий разнообразие белков ALP/Enigma у беспозвоночных. У червя** *C.elegans* **существует вариант белка с отсутствующим PDZ-доменом [48], подобный RIL-изоформе III.**

**Выводы**

**Подавление экспрессии гена *TRIP6* в линиях клеток карцином приводит к реорганизации актинового цитоскелета и другим морфологическим и функциональным сдвигам, характерным для эпителиально-мезенхимальной транзиции.**

**Повышенная экспрессия *RIL* в линиях клеток карцином индуцирует мезенхимный фенотип, пролиферацию клеток и повышает скорость их миграции. При этом гиперэкспрессия RIL усиливает адгезию клеток как эпителиальной, так и неэпителиальной природы. Подавление экспрессии *RIL,* наоборот, приводит к появлению признаков, характерных для менее агрессивного опухолевого фенотипа. При анализе экспрессии *RIL* в образцах злокачественных опухолей молочной железы человека и культурах клеток того же происхождения выявлена тенденция к подавлению *RIL.* При этом высокий уровень RIL коррелирует с более агрессивным опухолевым фенотипом.**

**При исследовании роли RIL в регуляции динамики актинового цитоскелета внутри LIM-домена RIL выявлен дополнительный сайт, обеспечивающий взаимодействие RIL с а-актинином. Показано, что LIM домен RIL рекрутирует а-актинин на актиновый цитоскелет и повышает степень полимеризации актина за счет подавления его деполимеризации.**

**В составе альтернативного С-концевого пептида двух изоформ RIL выявлен PEST- мотив, приводящий к дестабилизации этих белков посредством их протеасомной деградации.**

**В методической части работы установлено оптимальное соотношение компонентов упаковочной смеси, позволившее увеличить эффективный титр получаемых вирусных препаратов в 15-20 раз.**

**В результате масштабного тестирования различных дизайнов РНК-шпильки для осуществления подавления экспрессии генов посредством РНК-интерференции установлено, что наиболее эффективной является «классическая» структура шпильки с 22-нуклеотидным стеблем.**

**Благодарности**

**Хочу поблагодарить своего научного руководителя Елену Ивановну Фролову за предоставление интереснейшей темы для разработки.**

**Свою искреннюю благодарность хочу выразить Петру Михайловичу Чумакову (лаб. Пролиферации клеток Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН) за моральную поддержку и ценные советы в ходе работы и за предоставленные реактивы.**

**Слова особой признательности хотела бы высказать в адрес Анны Саблиной, которая научила меня многим методам и без чьей поддержки эта работа не была бы выполнена так скоро. Я благодарю Романа Кондратова за критические замечания и стимулирующие дискуссии, а также Ольгу Разоренову и Александра Гаспарьяна за помощь в подготовке материалов к защите. Я благодарна членам лабораторий Е.И.Фроловой, П.М.Чумакова и А.В.Гудкова за поддержку, а также всем, кто мне помогал в ходе работы.**

**Список литературы**

1. **Flynn D.C. 2001. Adaptor proteins. *Oncogene.* 20,6270-6272.**
2. **Kadrmas J.L., Beckerle M.C. 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5,920-931.**
3. **Dawid I.B., Breen J.J., Toyama R. 1998. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* 14,156-162.**
4. **Wang Y., Gilmore T.D. 2001. LIM domain protein Тгірб has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1538,260-272.**
5. **Tanaka Т., Soriano M.A., Grusby M.J. 2005. SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity.* 22,729-736.**
6. **Ungureanu D., Silvennoinen O. 2005. SLIM trims STATs: Ubiquitin E3 ligases provide insights in the regulation of cytokine signaling. *Science’s STKE,* 304, pe49.**
7. **Capilli A.D., Schultz D.C., Rauscher III F.J., Borden K.L. 2001. Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBOJ.* 20,165-177.**
8. **Pawson Т., Nash P. 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science.* 300,445-452.**
9. **Fanning A.S., Anderson J.M. 1999. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J. Clin. Invest.* 103,767-772.**
10. **Pallen M.J., Ponting C.P. 1997. PDZ domains in bacterial proteins. *Mol. Microbiol.* 26,411- 413.**
11. **Ponting C.P. 1997. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci.* 6, 464-468.**
12. **Harris B.Z., Lim W.A. 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. J. *CellSci.* 114,3219-3231.**
13. **Muhlhahn P., Zweckstetter М., Georgescu J., Ciosto C., Renner C., Lanzendorfer М., Lang K., Ambrosius D., Baier М., Kurth R., Holak T.A. 1998. Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site. *Nat. Struct. Biol.* 5, 682- 686.**
14. **Fan J.-S., Zhang M. 2002. Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals.* 11,315-321.**
15. **Hung A.Y., Sheng M. 2002. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* 277,5699-5702.**
16. **Besprozvanny I., Maximov A. 2001. Classification of PDZ domains. *FEBS Lett.* 509, 457- 462.**
17. **Songyang Z., Fanning A.S., Fu C., Xu J., Marfatia S.M., Chishti A.H., Crompton A., Chan A.C., Anderson J.M., Cantley L.C. 1997. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science (Washington D.C.)* 275, 73-77.**
18. **Van den Berk L.C.J., van Ham M.A., te Lindert M.M., Walma Т., Aelen J., Vuister G.W., Hendriks W.J.A.J. 2004. The interaction of PTP-BL PDZ domains with RIL: an enigmatic role for the RIL LIM domain. *Mol. Biol. Rep.* 31, 203-215.**
19. **Ponting C.P., Phillips C., Davies K.E., Blake D.J. 1997. PDZ domains: targeting signaling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays.* 19,469-479.**
20. **Nourry C., Grant S.G.N., Borg J.-P. 2003. PDZ Domain Proteins: Plug and Play! *Science’s STKE.* re7.**
21. **Jelen F., Oleksy A., Smietana K., Otlewski J. 2003. PDZ domains - common players in the cell signaling*. Acta Biochim. Pol.* 50, 985-1017.**
22. **Yi J., Beckerle M.C. 1998. The human *TRIP6* gene encodes a LIM domain protein and maps to chromosome 7q22, a region associated with tumorigenesis. *Genomics.* 49,314-316.**
23. **Murthy K.K., Clark K., Fortin Y., Shen S.-H., Banville D. 1999. ZRP-1, a zyxin related protein, interacts with the second PDZ domain of the cytosolic protein tyrosine phosphatase hPTPlE. *J. Biol. Chem.* 274,20679-20687.**
24. **Wang Y., Gilmore T.D. 2001. LIM domain protein Тгірб has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1538,260-272.**
25. **Yi J., Kloeker S., Jensen C.C., Bockholt S., Honda H., Hirai H., Beckerle M.C. 2002. Members of the zyxin family of LIM proteins interact with members of the pl30Cas family of signal transducers. *J. Biol. Chem.* 277, 9580-9589.**
26. **Sanz-Rodriguez F., Guerrero-Esteo М., Botella L.-M., Banville D, Vary C.P.H., Bemabeu C. 2004. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the LIM family of proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 32858-32868.**
27. **Lai Y.-J., Chen С.-S., Lin W.-C., Lin F.-T. 2005. c-Src-mediated phosphorylation of TRIP6 regulates its function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5859-5868.**
28. **Lee J.W., Choi H.-S., Gyuris J.,Brent R., Moore D.D. 1995. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Endocrinology.* 9,243-254.**
29. **Kassel O., Schneider S., Heilbock C., Litfin М., Gottlicher М., Herrlich P. 2004. A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Тгірб integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-KB-regulated promoters. *Genes Dev.* 18,2518-2528.**
30. **Li L., Bin L.H., Liu Y., Chen D., Zhai Z., Shu H.B. 2005. TRIP6 is RIP2-associated common signaling component of multiple NF-кВ activation pathways. *J. Cell Sci.* 118, 555- 563.**
31. **Kiess М., Scharm B., Aguzzi A., Hajnal A., Klemez R., Schwarte-Waldhoff I., Schafer R. 1995. Expression of *ril,* a novel LIM domain gene, is down-regulated in #iM,S’-transformed cells and restored in phenotypic revertants. *Oncogene.* 10, 61-68.**
32. **Cuppen E., Gerrits H., Pepers B., Wieringa B., Hendriks W. 1998. PDZ motifs in PTP-BL and RIL bind to internal protein segments in the LIM domain protein RIL. *Mol. Biol. Cell.* 9, 671-683.**
33. **Xia H., Winokur S.T., Kuo W.L., Altherr M.R., Bredt D.S. 1997. Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat. *J. Cell Biol.* 139,507-515.**
34. **Wang H., Harrison-Shostak D.C., Lemasters J.J., Herman B. 1995. Cloning of a rat cDNA encoding a novel LIM domain protein with high homology to rat RIL. *Gene.* 165,267-71.**
35. **Kotaka М., Ngai S.M., Garcia-Barcelo М., Tsui S.K., Fung K.P., Lee C.Y., Waye M.M.**

**1999. Characterization of the human 36-kDa carboxyl terminal LIM domain protein**

**(hCLIMl). *J. CellBiochem.* 72,279-285.**

1. **Bashirova A.A., Markelov M.L., Shlykova T.V., Levshenkova E.V., Alibaeva R.A., Frolova E.I. 1998. The human *RIL* gene: mapping to human chromosome 5q31.1, genomic organization and alternative transcripts. *Gene.* 210, 239-245.**
2. **Loughran G., Healy N.C., Kiely P.A., Huigsloot М., Kedersha N., O’Connor R. 2005.**

**Mystique is a new insulin-like growth factor-I-regulated PDZ-LIM domain protein that**

**promotes cell attachement and migration and suppresses anchorage-independent growth. *Mol. Biol. Cell.* 16,1811-1822.**

1. **Torrado М., Senatorov V.V., Trivedi R., Fariss R.N., Tomarev S.I. 2004. Pdlim2, a novel PDZ-LIM domain protein, interacts with a-actinins and filamin A. *Invest. Ophlh. Vis. Sci.* 45, 3955-3963.**
2. **Kang S., Xu H., Duan X., Liu J.-J., He Z., Yu F., Zhou S., Meng X.-Q., Cao М., Kennedy G.C. 2000. PCD1, a novel gene containing PDZ and LIM domains, is overexpressed in several human cancers. *Cancer Res.* 60,5296-5302.**
3. **Wu R.Y., Gill G.N. 1994. LIM domain recognition of a tyrosine-containing tight turn. *J. Biol. Chem. 269,*25085-25090.**
4. **Boden S.D., Liu Y., Hair G.A., Helms J.A., Hu D., Racine М., Nanes M.S., Titus L. 1998. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effect on bone formation. *Endocrinology.* 139,5125-5134.**
5. **Kuroda S., Tokunaga C., Kiyohara Y., Higuchi O., Konishi H., Mizuno K., Gill G.N., Kikkawa U. 1996. Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with PKC. *J. Biol. Chem.* 271,31029-31032.**
6. **Nakagawa N., Hoshijima М., Oyasu М., Saito N., Tanizawa K., Kuroda S. 2000. ENH, containing PDZ and LIM domains, heart/skeletal muscle-specific protein, associates with cytoskeletal proteins through the PDZ domain. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 272, 505-512.**
7. **Zhou Q., Ruiz-Lozano P., Martone M.E., Chen J. 1999. Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *J. Biol Chem.* 274,19807-19813.**
8. **Faulkner G., Pallavicini A., Formentin E., Comelli A., Ievolella C., Trevisan S., Bortoletto**
9. **, Scannapieco P., Salamon М., Mouly V., Valle G., Lanfranchi G. 1999. ZASP: a new Z- band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J. Cell Biol.* 146,465-475.**
10. **Passier R., Richardson J.A., Olson E.N. 2000. Oracle, a novel PDZ-LIM domain protein expressed in heart and skeletal muscle. *Mech. Develop.* 92,277-284.**
11. **Vallenius Т., Scharm В., Vesikansa A., Luukko K., Schafer R., Makela T.P. 2004. The PDZ-LIM protein RIL modulated actin stress fiber turnover and enhances the association of alpha-actinin with F-actin. *Exp. Cell Res.* 293,117-128.**
12. **McKeown C.R., Han H.-F., Beckerle M.C. 2006. Molecular characterization of the *Caenorhabditis elegans* ALP/Enigma gene *alp-1. Developmental Dynamics.* 235, 530-538.**
13. **te Velthuis A.J.W., Isogai Т., Gerrits L., Bagowski C.P. 2007. Insights into the molecular evolution of the PDZ/LIM family and identification of a novel conserved protein motif. *PloS ONE.* 2, el89.**
14. **van der Meer D.L.M., Marques I.J., Leito J.T.D., Besser J., Bakkers J., Schoonheere E., Bagowski C.P. 2006. Zebrafish *cipher* is important for somite formation and heart development. *Dev. Biol.* 299, 356-372.**
15. **te Velthuis A.J.W., Ott E.B., Marques I.J., Bagowski C.P. 2007. Gene expression pattern of the ALP family during zebrafish development. *Gene Expression Patterns.* 7,297-305.**
16. **Andersen O., Ostbye Т.К., Gabestad I., Nielsen C., Bardal T. 2004. Molecular characterization of a PDZ-LIM protein in Atlantic salmon (Salmo salar): a fish ortholog of the alpha-actinin-associated LIM-protein (ALP). *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 61.**
17. **Szpirer C., Szpirer J., Riviere М., Hagnal A., Kiess М., Scharm B., Schafer R. 1996. Chromosomal assignment of three rat and human H*-rev* genes, putative tumor suppressors, down-regulated in malignantly ^/^-transformed cells. *Mamm. Genome.* 7, 701-703.**
18. **Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291,1304-1351.**
19. **Lander E.S., Linton L.M., Birren B., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409, 860-921.**
20. **Subramanian G., Adams M.D., Venter J.C., Broder S. 2001. Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *J. Am. Med. Assn.* 286,2296-2307.**
21. **Modrek В., Lee С. 2002. A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* 30,13-19.**
22. **Kopelman N.M., Lancet D., Yanai I. 2005. Alternative splicing and gene duplication are inversely correlated evolutionary mechanisms. *Nat. Genet. Ъ1,*588-589.**
23. **Huang C., Zhou Q., Liang P., Hollander M.S., Sheikh F., Li X., Greaser М., Shelton G.D., Evans S., Chen J. 2003. Characterization and *in vivo* analysis of splice variants of Cypher. *J. Biol. Chem.* 278,7360-7365.**
24. **Niederlander N., Fayein N.A., Auffray C., Pomies P. 2004. Characterization of a new human isoform of the enigma homolog family specifically expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 325,1304-1311.**
25. **Pomies P., Macalma Т., Beckerle M.C. 1999. Purification and characterization of an alpha- actinin-binding PDZ-LIM protein that is up-regulated during muscle differentiation. *J. Biol. Chem*. 274,29242-29250.**
26. **Zhou Q., Chu P.-H., Huang C., Cheng C.-F., Martone M.E., Knoll G., Shelton G.D., Evans**

**S., Chen J. 2001. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *J. Cell Biol.* 155,605-612.**

1. **Vatta М., Mohapatra B., Jimenez S., Sanchez X., Faulkner G., Perles Z., Sinagra G., Lin J.H., Vu T.M., Zhou Q., Bowles K.R., DiLenarda A., Schimmenti L., Fox М., Chrisco M.A., Murphy R.T., McKenna W., Elliott P., Bowles N.E., Chen J., Valle G., Towbin J.A. 2003. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non­compaction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42,2014-2027**
2. **Lasorella A., Iavarone A. 2006. The protein ENH is a cytoplasmic sequestration factor for Id2 in normal and tumor cells from the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 4976-4981.**
3. **Ueki N., Seki N., Yano K., Masuho Y., Saito Т., Muramatsu M.-a. 1999. Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of a human LIM protein gene, showing homology to rat Enigma homologue (ENH). *J. Hum. Genet.* 44,256-260.**
4. **Pashmforoush М., Pomies P., Peterson K.L., Kubalak S., Ross J. Jr., Hefti A., Aebi U., Beckerle M.C., Chien K.R. 2001. Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nat. Med.* 7, 591-597.**
5. **Jo K., Rutten B., Bunn R.C., Bredt D.S. 2001. Actinin-associated LIM protein-deficient mice maintain normal development and structure of skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1682-1687.**
6. **Altherr M.R., Bengtsson U., Markovich R.P., Winokur S.T. 1995. Efforts toward understanding the molecular basis of fascioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2, S32-S38.**
7. **Vallenius Т., Luukko K., Makela T.P. 2000. CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4. *J. Biol. Chem.* 275,11100-11105.**
8. **Kotaka М., Lau Y.-m., Cheung K.-k., Lee S.M.Y., Li H.-y., Chan W.-y., Fung K.-p., Lee C.- у., Waye M.M.Y., Tsui S.K.W. 2001. Elfin is expressed during early heart development. *J. Cell. Biochem.* 83,463-472.**
9. **Guy P.M., Kenny D.A., Gill G.N. 1999. The PDZ domain of the LIM protein Enigma binds to beta-tropomyosin. *Mol. Biol. Cell.* 10, 1973-1984.**
10. **Bauer K., Kratzer М., Otte М., de Quintana K.L., Hagmann J., Arnold G.J., Eckerskom C., Lottspeich F., Siess W. 2000. Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood.* 96,4236-4245.**
11. **Krause A., Zacharias W., Camarata Т., Linkhart B., Law E., Lischke A., Miljan E., Simon**
12. **-G. 2004. Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development. *Dev. Biol.* 273,106-120.**
13. **Camarata Т., Bimber B., Kulisz A., Chew T.-L., Yeung J., Simon H.-G. 2006. LMP4 regulates Tbx5 protein subcellular localization and activity. *J. Cell Biol.* 174,339-348.**
14. **Vallenius T. 2004. Characterization of actin stress fibers: involvement of PDZ-LIM adapter proteins and the novel Clikl kinase. Academic dissertation.**
15. **Arimura Т., Hayashi Т., Terada H., Lee S.-Y., Zhou Q., Takahashi М., Ueda K., Nouchi Т., Honda S., Shibutani М., Hirose М., Chen J., Park J.-E., Yasunami М., Hayashi H., Kimura**
16. **2004. A *Cypher/ZASP* mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 279,6746-6752.**
17. **Maeno-Hikichi Y., Chang S., Matsumura K., Lai М., Lin H., Nakagawa N., Kuroda S., Zhang J.-f. 2003. A РКСє-ENH-channel complex specifically modulates N-type Ca2+ channels. *Nat. Neurosci. 6,* 468-475.**
18. **Wu R.-y., Durick K., Songyang Z., Cantley L.C., Taylor S.S., Gill G.N. 1996. Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 15934-15941.**
19. **Frey N., Olson E.N. 2002. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J. Biol. Chem. 211,* 13998-14004.**
20. **Erdmann K.S. 2003. The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like: interacting proteins and molecular functions. *Eur. J. Biochem.* 270, 4789-4798.**
21. **Meinhold-Heerlein I., Stenner-Liewen F., Liewen H., Kitada S., Krajewska М., Krajewski**

**S., Zapata J.M., Monks A., Scudiero D.A., Bauknecht Т., Reed J.C. 2001. Expression and potential role of Fas-associated phosphatase-1 in ovarian cancer. *Am. J. Pathol.* 158, 1335- 1344.**

1. **Erdmann K.S., Kuhlmann J., Lessmann V., Herrmann L., Eulenburg V., Muller 0., Heumann R. 2000. The Adematous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene.* 19, 3894-3901.**
2. **Nelson W.J., Nusse R. 2004. Convergence of Wnt, p-catenin, and cadherin pathways. *Science.* 303, 1483-1487.**
3. **Hermann L., Dittmar Т., Erdmann K.S. 2003. The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 14,230-240.**
4. **Wansink D.G., Peters W., Schaafsma I., Sutmuller R.P.M., Oerlemans F., Adena G.J., Wieringa B., van der Zee C.E.E.M., Hendriks W. 2004. Mild inpairment of motor nerve repair in mice lacking PTP-BL tyrosine phosphatase activity. *Physiol. Genomics.* 19, 50-60.**
5. **Cuppen E., van Ham М., Wansink D.G., de Leeuw A., Wieringa B., Hendriks W. 2000. The zyxin-related protein TRIP6 interacts with PDZ motifs in the adaptor protein RIL and the protein tyrosine phosphatase PTP-BL. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 283-293.**
6. **Taylor K.A., Taylor D.W., Schachat F. 2000. Isoforms of a-actinin from cardiac, smooth, and skeletal muscle form polar arrays of actin filaments. *J. Cell Biol.* 149,635-645.**
7. **Honda K., Yamada Т., Endo R., Ino Y., Gotoh М., Tsuda H., Yamada Y., Chiba H., Hirohashi S. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein, associated with cell motility and cancer invasion. J. *Cell Biol.* 140,1383-1393.**
8. **Mills M.A., Yang N., Weinberg R.P., van der Woude D.L., Beggs A.H., Eastel S., North K.N. 2001. Differential expression of the actin-binding proteins, a-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum. Mol. Genet.* 10,1335-1346.**
9. **Broderick Winder S.J. 2005. Spectrin, a-actinin, and dystrophin. *Adv. Protein Chem.* 70,203-246.**
10. **Otey C.A., Carpen 0. 2004. a-Actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil. Cytoskel.* 58,104-111.**
11. **Schulz T.W., Nakagawa Т., Licznerski P., Pawlak V., Kolleker A., Rozov A., Kim J., Dittgen Т., Kohr G., Sheng М., Seeburg P.H., Osten P. 2004. Actin/alpha-actinin-dependent transport of AMPA receptors in dendritic spines: role of the PDZ-LIM protein RIL. *J. Neurosci.* 24, 8584-8594.**
12. **Fu S.-l., Waha A., Vogt P.K. 2000. Identification and characterization of genes upregulated in cells transformed by v-Jun. *Oncogene.* 19,3537-3545.**
13. **Vanaja D.K., Ballman K.V., Morlan B.W., Cheville J.C., Neumann R.M., Lieber M.M., Tindall D.J., Young C.Y.F. 2006. *PDLIM4* repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 12,1128-1136.**
14. **Welsh J.B., Sapinoso L.M., Su A.I., et al. 2001. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 5974- 5978.**
15. **Yu Y.P., Landsittel D., Jing L., et al. 2004. Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J. Clin. Oncol.* 22, 2790-2799.**
16. **Mills J.C., Syder A.J., Hong C.V., Guruge J.L., Raaii F., Gordon J.I. 2001. A molecular profile of the mouse gastric parietal cell with and without exposure to *Helicobacter pylori. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98,13687-13692.**
17. **Liu C., Goshu E., Wells A., Fang C.-M. 2003. Identification of the downstream targets of SIM1 and ARNT2, a pair of transcription factors essential for neuroendocrine cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 278,44857-44867.**
18. **Gerhardinger С., Costa M.B., Coulombe M.C., Toth I., Hoehn Т., Grosu P. 2005. Expression of acute-phase response proteins in retinal Muller cells in diabetes. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 46,349-357.**
19. **Omasu F., Ezura Y., Kajita М., Ishida R., Kodaira М., Yoshida H., Suzuki Т., Hosoi Т., Inoue S., Shiraki М., Orimo H., Emi M. 2003. Association of genetic variation of the *RIL* gene, encoding a PDZ-LIM domain protein and localized in 5q31.1, with low bone mineral density in adult Japanese women. *J. Hum. Genet.* 48,342-345.**
20. **Grignani F., Kinsella Т., Mencarelli A., Valtieri М., Riganelli D., Lanfrancone L., Peschle C., Nolan G.P., Pelicci P.G. 1998. High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* 58,14-19.**
21. **Overbaugh J., Miller A.D., Eiden M.V. 2001. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycophosphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 371-389.**
22. **Emi N., Friedmann Т., Yee J.K. 1991. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 65,1202-1207.**
23. **Lin S., Gaiano N., Culp P., Bums J.C., Friedmann Т., Yee J.K., Hopkins N. 1994. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science.* 265,666-669.**
24. **Burns J.K., Friedmann Т., Driever W., Burrascano М., Yee J.K. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 91,9564-9568.**
25. **Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. *Retroviruses.* 1997. CSHL Press.**
26. **Nguyen Т.Н., Oberholzer J., Birraux J., Majno P., Morel P., Trono D. 2002. Highly efficient**

**lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary**

**hepatocytes. *Mol. Ther.* 6,199-209.**

1. **Pfeifer A., Ikawa М., Dayn Y., Verma I.M. 2002. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99,2140-2145.**
2. **Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296,550-553.**
3. **Barton G.M., Medzhitov R. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99,14943-14945.**
4. **Dykxhoom D.M., Novina C.D., Sharp P.A. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4,457-467.**
5. **Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. 1998. Potent and**

**specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans. Nature.***

**391,806-811.**

1. **Ngo H., Tschudi C., Gull K., Ullu E. 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95,14687-92.**
2. **Yang S., Tutton S., Pierce E., Yoon K. 2001. Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7807-16.**
3. **Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Balint Ё., Tuschl Т., Zamore P.D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science.* 293, 834-838.**
4. **Moss E.G. 2002. MicroRNAs: hidden in the genome. *Current Biology.* 12, R138-R140.**
5. **Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116, 281-297.**
6. **Berstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. Hannon G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409, 363-366.**
7. **Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R.A. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98,*9742-9747.**
8. **Lee Y., Ahn C., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N. 2003. The nuclear Rnase III Drosha initiates micro RNA processing. *Nature.* 425,415-419.**
9. **Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404,293-296.**
10. **Carmell M.A., Xuan Z., Zhang M.Q., HannonG.J. 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16,2733-2742.**
11. **Sledz C.A., Williams B.R.G. 2005. RNA interference in biology and disease. *Blood.* 106, 787-794.**
12. **Hammond S.M. 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579, 5822-5829.**
13. **Sui G., Soohoo C., El Bashir A., Gay F., Shi Y., Forrester W.C., Shi Y. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99,5515-5520.**
14. **Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conclin D.S. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16, 948-958.**
15. **Cullen B.R. 2005. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther.* 1- 6.**
16. **Inoue H., Nojima H., Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96,23-28.**
17. **Silva J.M., Sachidanandam R., Hannon G.J. 2003. Free energy lights the path toward more effective RNAi. *Nat. Genet.* 35,303-305.**
18. **Разоренова O.B., Агапова Jl.C., Буданов A.B., Иванов А.В., Струнина С.М., Чумаков П.М. 2005. Репортерные системы для оценки активности транскрипционных факторов р53, HIF-1 и HSF-1 на основе вирусной системы доставки в клетки-мишени. *Молекулярная биология.* 3,286-289.**
19. **Lukyanov К.А., Chudakov D.M., Fradkov A.F., Labas Y.A., Matz M.V., Lukyanov S. 2006. Discovery and properties of GFP-like proteins from nonbioluminescent anthozoa. *Method. Biochem. Analysis.* 47,121-138.**
20. **Chomczynski P. 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201,134-139.**
21. **Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis Т., *Strategies for cloning in plasmid vectors,* in *Molecular Cloning, a Laboratory Manual,* C. Nolan, Editor. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 1.53-51.73.**
22. **Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.**
23. **Small J.V. 1981. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: Influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J. Cell Biol.* 91, 695-705.**
24. **Cramer L., Mitchison T.J. 1993. Moving and stationary actin filaments are involved in spreading of postmitotic PtK2 cells. *J. Cell Biol.* 122, 833-843.**
25. **Cramer L.P., Briggs L.J., Dawe H.R. 2002. Use of fluorescently labeled deoxyribonuclease I to spatially measure G-actin levels in migrating and non-migrating cells. *Cell Mot'll. Cytoskeleton.* 51,27-38.**
26. **Yee J.K., Miyahora A., LaPorte P., Burns J.C., Friedmann T. 1994. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91,9564-9568.**
27. **Chen S.-Т., Iida A., Guo L., Friedmann Т., Yee J.-K. 1996. Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 10057- 10062.**
28. **Zeng Y., Wagner E.J., Cullen B.R. 2002. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell.* 9,1327-1333.**
29. **Lagos-Quintana М., Rauhit R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001 Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 294, 853-858.**
30. **Cullen B.R. 2005. RNAi the natural way. *Nat. Genets.* 37,1163-1165.**
31. **Thiery J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2,442-454.**
32. **Bogenrieder Т., Herlyn M. 2003 Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene.* 22, 6524-6536.**
33. **Mareel М., Leroy A. 2003. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol. Rev.* 83,237-276.**
34. **Копнин Б.П. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия.* 65, 5-33.**
35. **Malliri A., Symons М., Hennigan R.F., Hurlstone A.F.L., Lamb R.F., Wheeler Т., Ozanne**
36. **W. 1998. The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of Rho- like GTPases, cytoskeletal rearrangements, motility, and in vitro invasion of A431 cells. *J. Cell Biol* 143,1087-1099.**
37. **Bouton A.H., Riggins R.B., Bruce-Staskal P.J. 2001. Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and determination of cellular responses. *Oncogene.* 20,6448-6458.**
38. **Yun М.-S., Kim S.-E., Jeon S.H., Lee J.-S., Choi K.-Y. 2005. Both ERK and Wnt/(3-catenin pathwys are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J. Cell Sci.* 118,313-322.**
39. **Sansom O.J., Reed K.R., Hayes A.J., Ireland H., Brinkmann H., Newton I.P., Batlle E., Simon-Assmann P., Clevers H., Nathke I.S., Clarke A.R., Winton D.J. 2004. Loss of Ape in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 18, 1385-1390.**
40. **Lin A.W., Barradas М., Stone J.C., van Aelst L., Serrano М., Lowe S.W. 1998. Premature senescence involving p53 and pl6 is activated in response to constitutive МЕКУМАРК mitogenic signaling. *Genes Dev.* 12,3008-3019.**
41. **Lin A.W., Lowe S.W. 2001. Oncogenic *ras* activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 98, 5025-5030.**
42. **Brenner A.J., Paladugu A., Wang H., Olopade О. I., Dreyling M.H., Aldaz C.M. 1996. Preferential loss of expression of *pl6lhK4a* rather than *pi9ARF* in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2,1993-1998.**
43. **Foster S.A., Wong D.J., Barrett M.T., Galloway D.A. 1998. Inactivation of pl6 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol. Cell. Biol.* 18,1793-1801.**
44. **Bachelder R.E., Yoon S.-О., Franci C., Garcia de Herreras A., Mercurio A.M. 2005. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription; implications for the epithelial-mesenchumal transition. *J. Cell Biol.* 168,29-33.**
45. **Conacci-Sorell М., Simcha I., Ben-Yedidia Т., Blechman J., Savagner P., Ben-Ze’ev A. 2003. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of p-catenin signaling, Slug, and МАРК. *J. Cell Biol.* 163, 847-857.**
46. **Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 117,927-939.**
47. **Yang J., Mani S.A., Weinberg R.A. 2006. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res.* 66,4549-4552.**
48. **Yue J., Mulder K. 2001. Transforming growth factor-P signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol. Therapeut.* 91,1-34.**
49. **Kaminska B., Wesolowska A., Danilkiewicz M. 2005. TGF beta signalling and its role in tumor pathogenesis. *Acta Biochim. Pol.* 52,329-337.**
50. **Klaavuniemi Т., Ylanne J. 2006. Zasp/Cypher internal ZM-motif containing fragments are sufficient to co-locolize with a-actinin - Analysis of patient mutations. *Exp. Cell Res.* 312, 1299-1311.**
51. **Klaavuniemi Т., Kelloniemi A., Ylanne J. 2004. The ZASP-like motif in actinin-associated LIM protein is required for interaction with the a-actinin rod and for targeting to the muscle Z-line. *J. Biol. Chem.* 279,26402-26410.**
52. **Henderson J.R., Pomies P., Auffray C., Beckerle M.C. 2003. ALP and MLP distribution during myofibrillogenesis in cultured cardiomyocytes. *Cell Motil. Cytoskel. 54,*254-265.**
53. **Haugland R.P., You W., Paragas V.B., Wells K.S., DuBose D.A. 1994. Simultaneous visualization of G- and F-actin in endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 42,345-350.**
54. **Pulinilkunnil Т., An D., Ghosh S., Qi D., Kewalramani G., Yuen G., Virk N., Abrahani A., Rodrigues B. 2005. Lysophosphatidic acid-mediated augmentation of cardiomyocyte**

**lipoprotein lipase involves actin cytoskeleton reorganization. *Am. J. Physiol. Heart Physiol.* 288, 2802-2810.**

1. **Pomies P., Pashmforoush М., Vegezzi C., Chien K.R., Auffray C., Beckerle M.C. 2007. The cytoskeleton-associated PDZ-LIM protein, ALP, acts on serum response factor activity to regulate muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 18, 1723-1733.**
2. **Spector I., Braet F., Shochet N.R., Bubb M.R. 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Techniq.* 47, 18-37.**
3. **Schoenenberger C.-A., Steinmetz M.O., Stoffler D., Mandilova A., Aebi U. 1999. Structure, assembly, and dynamics of actin filaments in situ and in vitro. *Microsc. Res. Techniq.* 47, 38-50.**
4. **Taunton J. 2001. Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13,85-91.**
5. **Spector I., Braet F., Shochet N.R., Bubb M.R. 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Techniq.* 47,18-37.**
6. **Rechsteiner М., Rogers S.W. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21,267-271**