

УДК 576.321

## GRIP1 ВОВЛЕЧЕН ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИМЕНТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ С ФОКАЛЬНЫМИ КОНТАКТАМИ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2024 г. Ф. К. Гюева<sup>a, \*</sup><sup>a</sup>Институт белка Российской академии наук, Пущино, Московская область, 142290 Россия

\*e-mail: fguyeva@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.2023 г.

После доработки 04.03.2024 г.

Принята к публикации 12.03.2024 г.

Виментиновые промежуточные филаменты — динамичные цитоскелетные структуры, способные перемещаться в цитоплазме благодаря активности моторных белков — кинезина-1 и цитоплазматического динеина. Как именно моторные белки взаимодействуют с виментиновыми филаментами, неизвестно. В этой работе показано, что белок GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein), известный как адаптер кинезина-1 на многих карго в нервных клетках, может опосредовать также связывание кинезина-1 с виментиновыми филаментами. GRIP1 ассоциирован с виментиновыми филаментами в различных клетках и иммунопреципитируется с виментином из клеточного лизата. Эндотелиальные клетки человека с нокаутом гена белка GRIP1 теряют фокальные контакты и меняют адгезивные свойства. Предложена гипотеза, согласно которой кинезин-1 с помощью адаптера GRIP1 доставляет виментиновые филаменты на периферию клетки для стабилизации фокальных контактов.

**Ключевые слова:** белок GRIP1, кинезин-1, виментиновые промежуточные филаменты, фокальные контакты

DOI: 10.31857/S0026898424050076, EDN: HUNTKB

### ВВЕДЕНИЕ

Виментиновые промежуточные филаменты — динамичные цитоскелетные структуры, положение и перемещение которых в цитоплазме зависит от микротрубочек и моторного белка кинезина-1 (далее просто кинезин) [1]. Деполимеризация микротрубочек [2], а также ингибирование кинезина [3] или нокаут генов его моторной тяжелой цепи [4] вызывают обратимую агрегацию виментиновых филаментов (ВФ) в околоядерной области, зависящую от АТФ и актиновых филаментов [5]. Кинезин — универсальный моторный белок,

который осуществляет транспорт разнообразных карго, а его активность в каждом отдельном случае определяется связанным с карго адаптерным (scaffolding) белком [6]. Адаптерный белок, опосредующий связывание кинезина с ВФ, неизвестен.

Детальное изучение процесса агрегации ВФ показало, что от основной массы агрегирующих филаментов отстают отдельные филаменты виментина, которые оказываются связанными с фокальными контактами (ФК) на периферии клетки [7]. Фокальные комплексы и более зрелые ФК играют важную роль в прикреплении и распластывании клетки и ее перемещении по субстрату. С участием интегринов устанавливается связь внеклеточного матрикса с цитоскелетом и рекрутируется комплекс сигнальных и адаптерных белков, чувствительный к внешним условиям [8]. Так, например, поток жидкости вдоль клеточной мембраны индуцирует реорганизацию ФК в клетках эндотелия [9]. Другим примером могут служить гладкомышечные клетки, в которых в ответ на механическое натяжение, имити-

Сокращения: GRIP — белок, взаимодействующий с рецептором глутамата (Glutamate Receptor Interacting Protein); ВФ — виментиновые филаменты; ФК — фокальные контакты; GBD — GRIP-связывающий домен (GRIP-Binding Domain); PDZ — общий структурный домен из 80–90 аминокислотных остатков, обнаруженный в сигнальных белках бактерий, дрожжей, растений, вирусов и животных (Postsynaptic density-95/Disks large/Zona occludens-1); AMPA —  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота.

рующее повышенное давление крови в сосуде, один из компонентов ФК, зиксин, мигрирует в ядро и выполняет там роль транскрипционно-го фактора [10].

Изменения в ФК передаются на элементы цитоскелета и корректируют поведение клетки, а воспринимающий сигналы цитоскелет, в свою очередь, влияет на структуру и функционирование ФК. Наиболее тесно с ФК связаны актомиозиновые стресс-фибриллы, вместе они обеспечивают чувствительность клетки к механическим воздействиям и согласованное направленное перемещение клетки в пространстве [11]. По микротрубочкам осуществляется транспорт различных карго к ФК, их функция необходима для обмена компонентов ФК и для внутриклеточной передачи сигналов [12]. Наконец, промежуточные филаменты, в частности ВФ, участвуют в стабилизации этих структур: ассоциация с ВФ замедляет обмен белков в ФК [13], а вызванный РНК-интерференцией нокдаун виментина, напротив, приводит к их частичной разборке [9].

Механизм влияния ВФ на ФК не установлен. Есть несколько кандидатов на роль посредника, обеспечивающего их взаимодействие. Прежде всего, сам виментин способен прямо связываться с  $\beta 3$ -интегрином, и эта изоформа интегрин, по-видимому, удерживает ВФ на периферии, поскольку в отсутствие  $\beta 3$ -интегрин они агрегируют [14]. Распределение ВФ контролируется также ассоциированным с ФК адаптерным белком Нис5, нокаут гена которого вызывает их коллапс [15]. Наконец, одна из изоформ цитолинкера плектина (P1f) локализуется на зрелых ФК в фибробластах и обеспечивает рекрутирование предшественников и сборку на них ВФ, обеспечивая тем самым их связь [16].

Как и повсюду в цитоплазме, точная доставка виментиновых полимеров к ФК зависит от микротрубочек и кинезина. Предполагается, что роль адаптера в этом процессе может играть белок GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1). Для такого предположения есть следующие основания: во-первых, GRIP1 напрямую связывается с тяжелой цепью кинезина [17]; во-вторых, GRIP1 участвует в доставке разнообразных карго; в-третьих, GRIP1 взаимодействует с некоторыми белками, входящими в состав фокальных комплексов — с зиксином [18] и тестином [19] (показано с использованием дигибридного анализа), а также с белком TRIP6 [20] и  $\alpha$ -липринами [21], что продемонстрировано биохимическими методами.

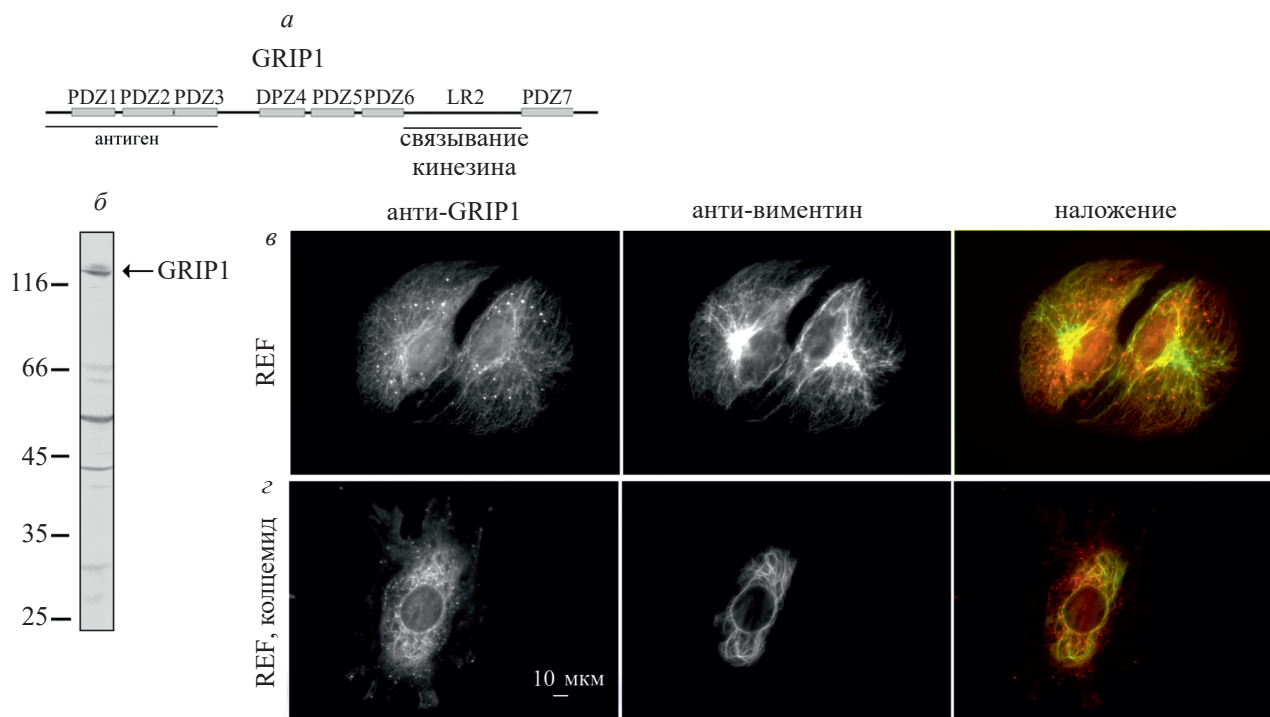
В дополнение к этим данным в экспериментах на животных с инактивированным геном белка GRIP1 показано, что GRIP1 играет важную

роль в прикреплении клеток к внеклеточному матриксу. Так, нокаут гена *GRIP1* вызывал у мышей развитие синдрома Фрейзера, при котором нарушается связь между GRIP1 и Fras1 — белком внеклеточного матрикса, вовлеченным в регуляцию адгезии эпидермиса к базальной мембране [22]. Кроме того, из-за нарушения адгезии тромбоцитов к эндотелию у таких мышей задерживается образование кровяного сгустка [23].

GRIP1 — это белок с молекулярной массой около 130 кДа, содержащий семь PDZ-доменов (рис. 1а), благодаря которым он способен одновременно связываться с разными партнерами и организовывать многокомпонентные комплексы. Главным компонентом этих комплексов, помимо самого GRIP1, является моторный белок кинезин, который обеспечивает транспорт по микротрубочкам. Интересно, что GRIP1 взаимодействует не только с кинезином, но и с другим моторным белком — миозином VI [20]. Оба моторных белка связываются с участком LR2 GRIP1 (рис. 1а), и это связывание регулируется фосфорилированием Trp-956 в белке GRIP1. Фосфорилированный GRIP1 освобождается из комплекса с моторным белком посредством какого-либо члена семейства 14-3-3, который вытесняет кинезин или миозин VI из транспортного комплекса [20, 24].

Ген белка GRIP1 экспрессируется в разных клетках и тканях, многие культивируемые линии клеток млекопитающих содержат заметное количество GRIP1. мРНК GRIP1 подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого образуются множественные варианты белка [25], различающиеся свойствами и функциями [26, 27]. Например, один из переменных N-концевых участков определяет, будет ли изоформа модифицирована остатком пальмитиновой кислоты и направлена в дендритные шипики, в то время как немодифицированный белок останется в теле нейрона [28].

Исходно GRIP1 был обнаружен в головном мозге как партнер субъединиц AMPA-рецепторов — трансмембранных белковых комплексов, обеспечивающих передачу нейромедиатора глутаминовой кислоты между возбуждающими нейронами в центральной нервной системе, что нашло отражение в его названии: Glutamate Receptor Interacting Protein [29]. Позже оказалось, что GRIP1 способен по отдельности связывать целый ряд белков, вовлеченных в функционирование AMPA-рецепторов на разных его этапах [30–37]. В этом процессе участвует и миозин VI, вовлеченный в эндоцитоз AMPA-рецепторов и их транспорт по актиновым филаментам в дендритах [38]. Помимо AMPA-



**Рис. 1.** Характеристика анти-GRIP1-антител с использованием иммуноблотинга и иммунофлуоресцентного окрашивания. *а* – Схема строения молекулы GRIP1. *б* – Результат иммуноблотинга гомогената фибробластов крысы REF52 с анти-GRIP1-антителами. *в* – Клетки REF52, обработанные одновременно анти-GRIP1 и анти-виментиновыми антителами. *г* – Такое же окрашивание клеток REF52, предварительно обработанных колцемидом до полной деполимеризации микротрубочек. Масштаб 10 мкм на всех изображениях.

рецепторов и ассоциированных с ними белков, GRIP1 участвует в доставке многих других карго, выполняя ряд важных функций в нейронах. В контексте этого исследования наиболее интересны такие партнеры GRIP1, как уже упоминавшиеся адаптерные (scaffolding) белки  $\alpha$ -липрины, известные партнеры тирозинфосфатаз семейства LAR, которые играют важную роль в организации синапсов [22, 39]. Однако обнаружено также, что  $\alpha$ -липрины локализуются в области ФК [40] и регулируют процесс их разборки [41].

Представленные в этой работе данные позволяют предположить, что GRIP1 может играть роль адаптера кинезина для ВФ и участвовать в их перемещении по микротрубочкам, по крайней мере, в эндотелиальных клетках. Предполагается, что GRIP1 нужен для доставки ВФ на периферию клетки и обеспечения тесного контакта виментина и ФК для их совместной стабилизации.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Плазмиды.** Клетки человека с нокаутом гена *GRIP1* получены по технологии CRISPR-Cas9 с использованием вектора pLentiV2, содержащего последовательность 5'-CTCCCGATAC-

CGTCAGACCC гидовой ПНК (вектор любезно предоставили Ameli Robert и Владимир Гельфанд, Northwestern University, Chicago, США). Для получения нокаута гена *GRIP1* в клетках мыши олигонуклеотиды 5'-CACCCAGTGTATGTTCCGAAGCTG и 5'-AAACCAGTTCGGAACATAA-CACTG объединили в дуплекс, который фосфорилировали и лигировали в вектор pSpCas9(B-B)-2a-puro, разрезанный по сайту рестрикции Bbs1.

Вектор pCR-Blunt II-ТОПО-GRIP1, содержащий инвертированную последовательность кДНК изоформы 3 GRIP1 человека (NCBI gene ID 23426; accession number 021150.4), получен от компании "Open Biosystems" (США). Для получения полноразмерного GRIP1, слитого с Мусб-тагом на N-конце, последовательность, кодирующую GRIP1, перенесли из исходного вектора в вектор pCS2-MT по KpnI и XbaI-сайтам рестрикции. ДНК, кодирующая N-концевую область GRIP1, слитую с His6-тагом на N-конце, получена путем ПЦР на матрице pCS2-MT-GRIP1 со следующими праймерами: 5'-ATGGATCCATAGCTGTCTCTTTTAAATGC, содержит сайт рестрикции BamHI, и 5'-ATAAGCTTCTGGTCAAGTGGTGTGGCCAG, содержит HindIII-сайт, и лигирования в вектор pQE80L по этим сайтам. Вектор, кодирующий

тот же N-концевой участок GRIP1, но слитый на N-конце с GST, получен с помощью ПЦР на матрице pCS2-MT-GRIP1 с праймерами: 5'-ATCTCGAGATAGCTGTCTCTTTTAAATGC, включает сайт рестрикции XhoI, и 5'-CGCCACATCTGTCTGCAATAC. Продукт был лигирован в вектор pGEX4T-1, обработанный NotI, фрагментом Кленова и XhoI.

Вектор pcDNA3-hKHC, кодирующий тяжёлую цепь кинезина-1, любезно предоставил Richard Wubbolts (Utrecht University, Нидерланды). Конструкцию, кодирующую GFP-GBD, клонировали, используя вектор pcDNA3-hKHC в качестве матрицы для ПЦР со следующими праймерами: 5'-AAGGTACCGCTACAAGAGTTAAAAAG с KpnI-сайтом, и 5'-AAGGATCCAGTTGGAGAAGCTGCTGG с BamHI-сайтом. Продукт лигировали в вектор pEGFP-C1 по таким же сайтам рестрикции. Для получения GFP-GBDshort использовали такой же путь клонирования, но обратным праймером был 5'-AAGGATCCTTCTTTTCAGTGCTGATTC.

Все конструкции ДНК проверяли секвенированием.

Плазмида, кодирующая зиксин человека, слитый с mKate-FP, получена от компании "Евроген" (Москва, Россия).

**Антитела.** Антитела кролика к белку GRIP1 получены и очищены в нашей лаборатории. Для этого векторную ДНК, кодирующую N-концевую часть GRIP1 (аминокислотные остатки 1–330 изоформы 3), слитую с His6-тагом на N-конце (His6-GRIP1-N), ввели в *E. coli* штамм BL21(DE3). Бактерии растили в среде LB, собирали центрифугированием и лизировали с помощью ультразвука. Лизат осветляли центрифугированием, рекомбинантный белок очищали хроматографией на Ni-NTA-агарозе ("Quigen", США). Препарат белка был диализом переведен в PBS и использован для иммунизации двух кроликов. Для приготовления аффинной колонки тот же фрагмент GRIP1, слитый на N-конце с GST, синтезировали в клетках *E. coli* (штамм BL21(DE3)), очищали на глутатион-агарозе ("Sigma-Aldrich", США) и "привязывали" к BrCN-агарозе ("Sigma-Aldrich"). Для очистки антител фракцию иммуноглобулинов выделяли из сыворотки преципитацией в 50%-ном сульфате аммония, затем очищали антитела из этой фракции с помощью аффинной хроматографии.

В работе использовали следующие коммерческие антитела: антитела мыши к виментину V9 ("Sigma-Aldrich"); антитела мыши к винкулину hVin1 ("Novus Biologicals", США); антитела мыши к белку нейрофиламентов NF-L 200/160 ("Sigma-Aldrich"). Антитела

кролика к виментину мыши, обозначенные 3с8, получены предварительно в нашей лаборатории.

**Иммуноблотинг.** Для тестирования антител к GRIP1 клетки на чашках промывали 3 раза 0.25 М раствором сахарозы, лизировали в буфере Laemmli для образцов и прогревали при 98°C в течение 10 мин. Образцы подвергали электрофорезу в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), переносили на нитроцеллюлозные фильтры ("Amersham Biosciences", Великобритания) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре сначала с первичными, а затем с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Jackson ImmunoResearch Laboratories", Великобритания). Все инкубации проводили в буфере PBS с 0.05% Tween 20 и 0.05% неиммунной сыворотки крупного рогатого скота, после каждой инкубации фильтры промывали тем же буфером без сыворотки. Сигнал выявляли с помощью цветной реакции с диаминобензидином ("Sigma-Aldrich").

**Культивирование клеток и трансфекция.** Клетки млекопитающих REF52 и EA.hy926 инкубировали в среде DMEM ("Панэко", Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина ("Sigma-Aldrich"), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Клетки CAD поддерживали в таких же условиях, но в среде DMEM/F-12 ("Панэко"). Для индукции роста нейритов клетки CAD переносили в среду без сыворотки.

Для трансфекции клеток использовали реагент GenJector-U ("Молекта", Россия). Через 4 ч после введения ДНК клетки снимали с подложки, обрабатывая раствором трипсина, переносили на покровные стекла и инкубировали в стандартной среде в течение следующих 24–48 ч.

Для нокаута гена белка GRIP1 клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей Cas9 и гидовую РНК и содержащей ген устойчивости к пуромицину. Через 4 ч после введения ДНК клетки обрабатывали раствором трипсина и переносили в 10 см чашки Петри, через 2 дня среду в чашках заменяли свежей, содержащей пуромицин ("Sigma-Aldrich") в определенной концентрации – минимальной концентрации, вызывающей гибель 100% клеток исходной культуры: 1.2 мкг/мл – в случае клеток CAD и 0.6 мкг/мл – в случае EA.hy926. Выделяли клетки, выжившие и образовавшие колонии, методом иммуноблотинга определяли в них присутствие белка GRIP1.

**Иммунофлуоресцентное окрашивание.** Клетки на покровных стеклах фиксировали 3%-ным параформальдегидом в PBS (10 мин при

комнатной температуре) или метанолом при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 6 мин. Клетки инкубировали с антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере в буфере PBS с 1% BSA и 0.1% Тритоном X-100: сначала с первичными антителами, затем со вторичными, конъюгированными с флуорохромами FITC или TRITC (“Sigma-Aldrich”). По окончании инкубации стекла монтировали на предметные стекла и изучали под микроскопом Zeiss Axiovert M200 (“Carl Zeiss”, ФРГ), оборудованным камерой Zeiss AxioCam MRm.

**Иммунопреципитация.** Опыт по иммунопреципитации проводили на клетках REF52. Клетки, выращенные на 12 чашках Петри диаметром 10 см, промывали 3 раза 0.25 М раствором сахарозы и лизировали на льду в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, 1% Тритона X-100, 150 мМ NaCl, 0.1 мМ EGTA, pH 7.4, с добавлением ингибиторов протеаз (“Sigma-Aldrich”): 1 мл буфера на чашку. Лизат гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе и осветляли центрифугированием при 40 000 g в течение 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Экстракт был разделен на две части, которые параллельно инкубировали с 10 мкг антител против GRIP1, присоединенных к 4%-ной агарозе с белком А (“Sigma-Aldrich”). В качестве контроля использовали такую же порцию агарозы без добавления антител. Инкубацию проводили в течение 2 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . По окончании инкубации обе порции носителя промывали тем же буфером для лизиса клеток, суспендировали в 50 мкл буфера для образцов Laemmli, инкубировали при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин и подвергали электрофорезу и иммуноблоттингу.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

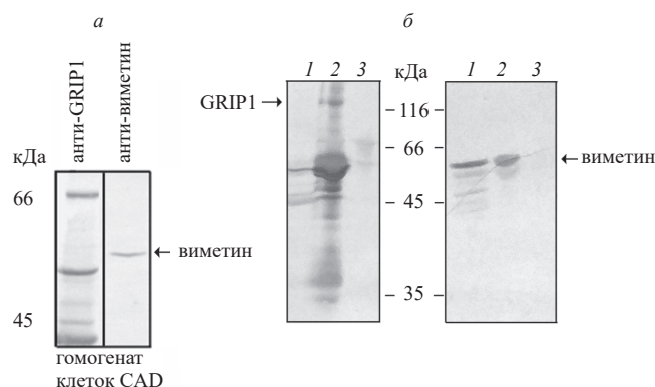
### *GRIP1 связывается с виментиновыми филаментами*

С целью изучения функций белка GRIP1 в клетках, отличных от нервных, были получены антитела к N-концевой области одной из изоформ белка GRIP1 человека, содержащей первые три PDZ-домена (рис. 1а). Как показало сравнение изоформ GRIP1 человека, мыши и крысы, эти три PDZ-домена являются наиболее консервативными, хотя предшествующие первому PDZ-домену N-концевые последовательности могут различаться. С другой стороны, анализ первичной структуры с помощью программы Protein BLAST (National Center for Biotechnology Information) не обнаружил, помимо GRIP1, каких-либо других белков со значительным уровнем гомологии с белком GRIP1. Поэтому результат тестирования полученных антител методом иммуноблоттинга

гомогенатов культивируемых клеток оказался неожиданным. Антитела к такому рекомбинантному белку из сывороток двух разных животных выявляли, помимо компонента с молекулярной массой около 130 кДа, соответствовавшего белку GRIP1, еще несколько иммунореактивных компонентов (рис. 1б), разных в гомогенатах разных клеточных линий (см. также другие рисунки). Такой результат нельзя объяснить присутствием в образцах нескольких изоформ GRIP1, поскольку в соответствии с базой данных NCBI предсказанные молекулярные массы вариантов GRIP1 варьируют в пределах 111–129 кДа. По-видимому, этот результат обусловлен протеолизом GRIP1, тем более что в нескольких работах показана регулируемая деградация GRIP1 [42, 43]. Иммунофлуоресцентное окрашивание культивируемых клеток млекопитающих выявило сложный паттерн: анти-GRIP1-антитела декорировали некие везикулярные структуры, а также филаменты. Определить везикулы, вводя в клетки плазмиды, кодирующие те или иные маркеры различных органелл, и анализируя их колокализацию со структурами, окрашенными антителами к GRIP1, не удалось. Филаменты же были идентифицированы как виментиновые, поскольку окрашивались антителами V9 к виментину (рис. 1в). На рис. 1 для примера приведены фибробласты REF52, содержащие густую сеть ВФ; однако сходный паттерн наблюдался и в клетках других линий (см. далее).

Чтобы различить ВФ и микротрубочки, паттерны распределения которых часто совпадают, клетки инкубировали с колцемидом до полной деполимеризации микротрубочек и последующей агрегации ВФ в околоядерной области. В таких клетках агрегировавшие ВФ по-прежнему декорировались анти-GRIP1-антителами, и картина в мелких деталях совпадала с картиной окрашивания антителами к виментину (рис. 1в).

Как показал иммуноблоттинг, сам виментин не связывал анти-GRIP1-антитела (рис. 2а), то есть их ассоциация с ВФ не была обусловлена прямым взаимодействием с виментином. Эта связь, по всей вероятности, обусловлена взаимодействием виментина с GRIP1, поскольку при использовании анти-GRIP1-антител для иммунопреципитации GRIP1 и связанных с ним белков из клеточного экстракта, виментин обнаруживался в иммунопреципитате (рис. 2б).



**Рис. 2.** Антитела к GRIP1 не взаимодействуют с виментином, но преципитируют его из клеточного экстракта. *a* — Два одинаковых иммуноблота с гомогенатом клеток CAD, параллельно обработанных антителами к GRIP1 и виментину. *б* — GRIP1 преципитирован из экстракта (1) клеток REF52; анти-GRIP1-преципитат (2) содержал виментин, в отличие от контрольного (3), полученного инкубацией такой же порции клеточного экстракта с чистыми агарозными гранулами с привязанным белком А.

*Ингибирование связывания GRIP1 и кинезина нарушает распределение виментиновых филаментов*

До сих пор функции GRIP1 изучали в основном на нейронах, поэтому имело смысл проверить, контролирует ли GRIP1 положение ВФ в линии клеток CAD мыши, которые сохранили в культуре многие свойства нейронов, в частности, способность выпускать длинные отростки [44]. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к виментину показало, что при дифференцировке, которая начиналась при переносе клеток в бессывороточную среду, ВФ сначала концентрировались в местах формирования будущих нейритов, а затем пучки филаментов заполняли длинные отростки, то есть подвергались транспорту в направлении, характерном для кинезина — к плюс-концам микротрубочек [1], которые обращены к концам отростков.

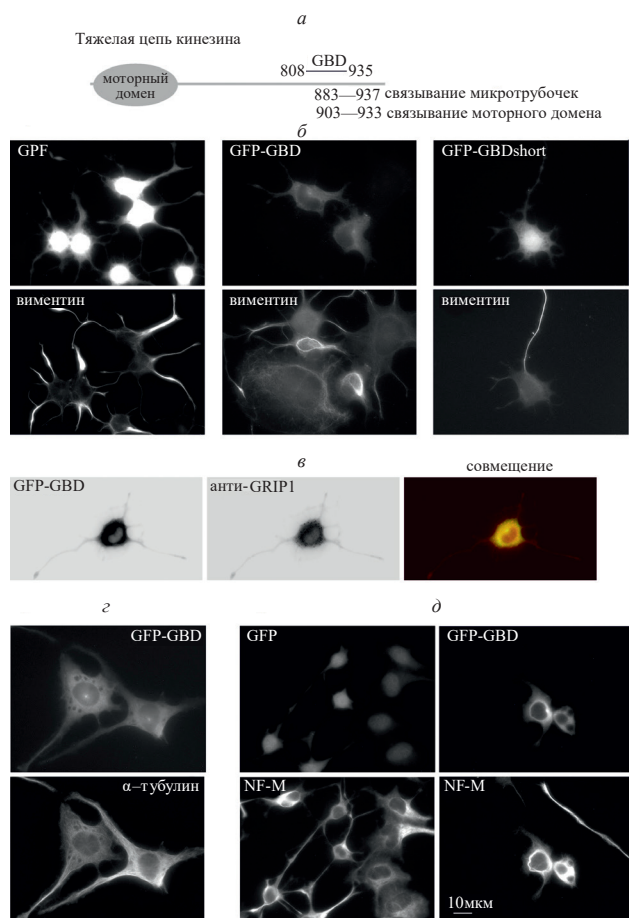
Важность взаимодействия белка GRIP1 и кинезина для продвижения ВФ по отросткам, проверяли прежде всего с использованием уже известного способа его доминантно-негативного ингибирования. В предыдущих исследованиях функций GRIP1 в нейронах в качестве такого ингибитора использовали GRIP1-Binding Domain (GBD), представлявший собой участок тяжелой цепи кинезина, ответственный за связывание GRIP1 (аминокислотные остатки 808–935 тяжелой цепи кинезина (KIF5B) человека) [17] (рис. 3а). Экспрессия плазмиды, кодирующей GFP-GBD (но не GFP, служащий контролем), индуцировала агрегацию ВФ внутри тела клетки

и предотвращала вход виментина в отростки (рис. 3б). Как видно на рис. 3б, эффект GFP-GBD проявлялся уже в довольно низкой (по сравнению с контрольными клетками) концентрации; высокая же концентрация GFP-GBD приводила к гибели клеток.

В клетках CAD, инкубированных в полной среде, анти-GRIP1-антитела также выявляли два типа структур: везикулы и филаменты, которые в этих клетках были очень бледными (рис. 4б). Окрашивание клеток CAD, синтезировавших GFP-GBD, антителами к GRIP1, выявило преимущественную локализацию обоих белков в теле клетки (для визуализации отростков на рис. 3в, представлены инвертированные изображения). Совмещение двух изображений позволяет предположить колокализацию белков, однако из-за того, что тела клеток CAD, сформировавших отростки, плохо распластываются на субстрате, различить детали было невозможно, за исключением везикул, которые окрашивались антителами к GRIP1, но очевидно не связывали GFP-GBD (рис. 3в). Вместе с тем, окрашивание клеток, содержащих GFP-GBD, антителами к  $\alpha$ -тубулину выявляло нормальное распределение микротрубочек (рис. 3г), поэтому эффект GFP-GBD можно было интерпретировать как затруднение в перемещении ВФ в направлении плюс-концов микротрубочек, то есть как нарушение работы кинезина.

Чтобы убедиться, что этот эффект специфичен в отношении ВФ, с которыми связан GRIP1, проверено влияние GFP-GBD на распределение в клетках CAD нейрофиламентов — еще одного типа филаментов, транспортируемых в нейронах кинезином [45]. Как можно видеть на рис. 3д, присутствие GFP-GBD аналогичным образом влияло и на вход в отростки нейрофиламентов. Следовательно, эффект этого доминантно-негативного ингибитора не был специфичным в отношении ВФ и GRIP1.

Причиной ингибирования транспорта промежуточных филаментов в отростки клеток CAD могло быть следующее обстоятельство: полипептид GBD содержит два важных для активности кинезина участка: первый (аминокислотные остатки 883–937) является сайтом связывания с микротрубочками [46], а второй (остатки 903–933) — это сайт автоингибирования [47] (рис. 3а). Поэтому нельзя было исключить, что эффект GFP-GBD обусловлен его связыванием с микротрубочками или моторным доменом кинезина, что должно препятствовать транспорту даже при нормальной системе микротрубочек. Чтобы проверить, критичен ли этот участок тяжелой цепи для GBD-индуцированного ингибирования кинезина, из плазмиды удалили последовательность, кодирующую аминокислотные остатки 883–935.

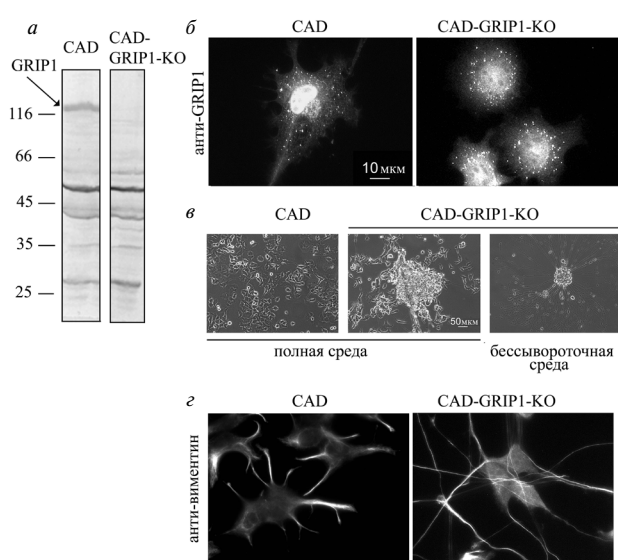


**Рис. 3.** Доминантно-негативное ингибирование взаимодействия GRIP1 с кинезином влияет на вход промежуточных филаментов (ВФ) в нейриты клеток CAD. *a* — Схема положения GBD (GRIP1 Binding Domain) на тяжелой цепи кинезина. *б* — Эффект присутствия GBD на распределение ВФ в клетках CAD. Клетки в полной среде трансфицированы плазмидой, кодирующей GFP-GBD, GFP (в качестве контроля) или GFP-GBD-short и через 20–24 ч перенесены в бессывороточную среду для индукции формирования отростков в течение последующих 48 ч. Затем клетки фиксировали и подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию: антителами 3с8 к виментину мыши (*б*), антителами к GRIP1 (*в*, изображения инвертированы для наглядности), антителами к  $\alpha$ -тубулину DM1 $\alpha$  (*г*) и антителами N2912 к белку NF-M нейрофиламентов (*д*). Масштабная линейка 10 мкм на всех изображениях.

Из рис. 3б видно, что белковый продукт GBD-short никак не влиял на распределение ВФ в клетках CAD.

#### *GRIP1 вовлечен в формирование фокальных контактов*

Поскольку доминантно-негативное ингибирование не дало однозначного результата, для истощения клеток CAD по белку GRIP1 применили метод CRISPR-Cas9. Как показал



**Рис. 4.** Нокаут гена белка GRIP1 меняет адгезивные свойства клеток CAD, но не препятствует заполнению отростков виментином. *a* — Иммуноблоттинг с анти-GRIP1-антителами гомогенатов клеток CAD — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1. *б* — Сравнение иммунофлуоресцентного окрашивания клеток CAD — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, анти-GRIP1-антителами. *в* — Фазово-контрастное изображение клеток CAD — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, в полной и бессывороточной среде. *г* — Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к виментину клеток CAD (контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1), инкубированных в бессывороточной среде. Части *б* и *г* — масштаб 10 мкм.

иммуноблоттинг с анти-GRIP1-антителами, в результате использования такого подхода из клеток CAD-GRIP1-KO исчез компонент с молекулярной массой около 130 кДа, который соответствовал белку GRIP1, но все остальные иммунореактивные компоненты сохранились (рис. 4а).

При окрашивании клеток CAD с нокаутом гена *GRIP1* анти-GRIP1-антителами везикулы были по-прежнему видны, однако декорирования ВФ уже не наблюдалось (рис. 4б). Этот результат позволил заключить, что ассоциация анти-GRIP1-антител с ВФ обусловлена присутствием полноразмерного белка GRIP1, а окрашивание везикул, по-видимому, определялось каким-то другим иммунореактивным компонентом, который пока не удалось идентифицировать.

Нокаут гена *GRIP1* не лишил клетки CAD-GRIP1-KO способности формировать отростки, причем не только в бессывороточной, но даже в полной среде. Однако оказалось, что произошло снижение адгезии клеток CAD к стеклу или пластику: в отсутствие сыворотки они образовывали большие,

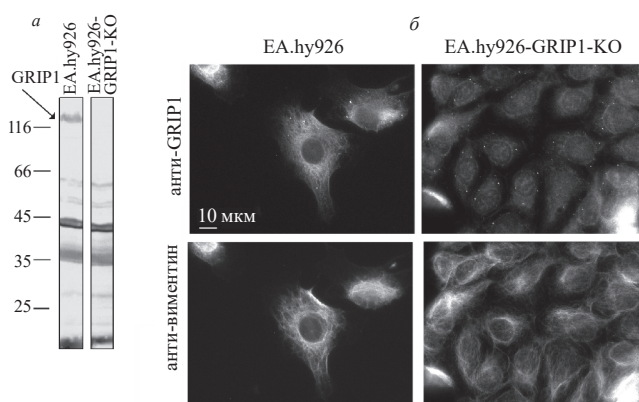
плавающие в среде агрегаты, окруженные множеством длинных тонких нейритов (рис. 4б). Иммунофлуоресцентное окрашивание редких прикрепившихся клеток показало, что отростки клеток с нокаутом содержали виментин и никаких признаков коллапса ВФ в телах клеток не наблюдалось (рис. 4г). Нельзя исключить, однако, что в клетках, потерявших способность к адгезии и объединившихся в плавающие агрегаты, ВФ претерпели коллапс. К сожалению, проверить это предположение оказалось технически невозможным. Таким образом, пока не ясно, нужен ли GRIP1 для формирования отростков и транспорта в них ВФ, но он явно важен для обеспечения адгезии.

Поскольку адгезия зависит от силы ФК, можно предположить, что в клетках, истощенных по белку GRIP1, нарушено функционирование ФК. Однако из-за снижения адгезии к стеклу иммунофлуоресцентное окрашивание ФК в клетках CAD с нокаутом оказалось технически невозможным. Поэтому тот же метод CRISPR-Cas9 был применен к другой линии клеток — эндотелиальным клеткам человека EA.hy926, которые часто служат моделью при исследовании фокальных и других клеточных контактов.

Иммуноблотинг с анти-GRIP1-антителами показал, что из эндотелиальных клеток с нокаутом гена белка GRIP1 исчез также компонент с молекулярной массой 130 кДа, то есть полноразмерный GRIP1 (рис. 5а), при этом в клетках с нокаутом не наблюдалось декорирования виментиновых филаментов (рис. 5б).

Поведение эндотелиальных клеток EA.hy926 тоже заметно изменялось после нокаута гена *GRIP1*. Они начинали объединяться в “островки” (рис. 6б), а их адгезия к субстрату заметно снижалась, так что их было гораздо легче снять с пластика обработкой трипсином. Более того, иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру ФК винкулину показало отсутствие выраженных ФК в клетках с нокаутом (рис. 6в).

В клетках EA.hy926-GRIP1-KO, как и в клетках CAD с нокаутом, не было заметно классического коллапса ВФ, однако наблюдалось очевидное перераспределение виментина: появлялись плотные пучки филаментов, особенно в краевых клетках “островков” (рис. 6б). По-видимому, эти виментиновые пучки оставались связанными с интегринами [14], так как на поверхности, покрытой поли-*L*-лизином, который препятствует связыванию интегринов с субстратом [48], пучки филаментов выглядели более рыхлыми (рис. 6б).

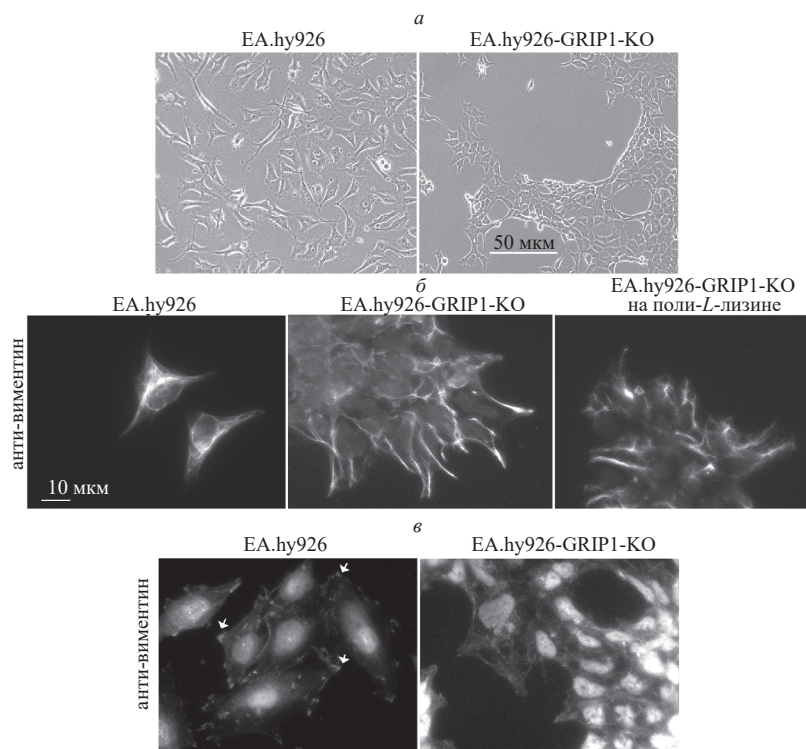


**Рис. 5.** Нокаут гена *GRIP1* в эндотелиальных клетках EA.hy926. *а* — Сравнение гомогенатов клеток EA.hy926 — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, в иммуноблотинге с анти-GRIP1-антителами. *б* — Сравнение клеток EA.hy926 — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1 — по двойному иммунофлуоресцентному окрашиванию анти-GRIP1-антителами и антителами к виментину.

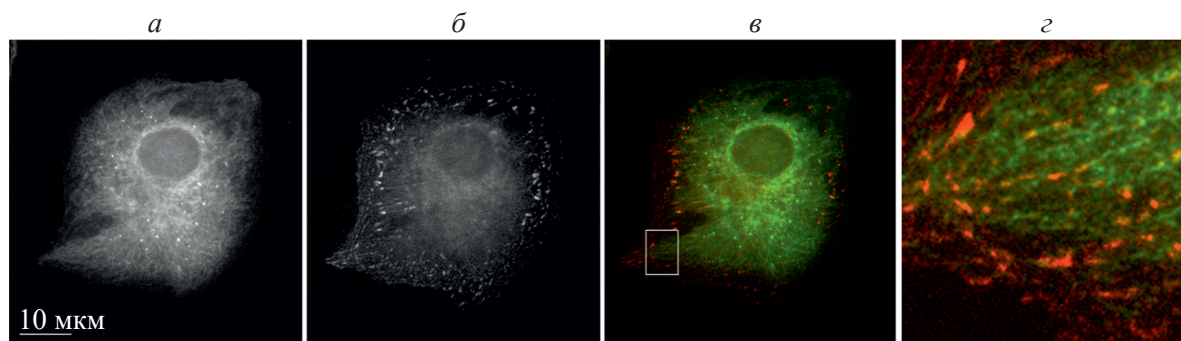
Попытка восстановить ФК в эндотелиальных клетках с нокаутом гена белка GRIP1 путем введения плазмиды, кодирующей изоформу 3 белка GRIP1 человека, не привела к успеху. По-видимому, с ФК связана некая другая изоформа белка.

Феномены разборки ФК в клетках эндотелия с нокаутом гена *GRIP1* и резкого изменения адгезивных свойств клеток требуют дальнейшего изучения. На данном этапе можно лишь предположить, что GRIP1 неким образом способствует стабилизации ФК, например, через доставку к ним ВФ, которые, как уже показано, оказывают на ФК стабилизирующее действие [9, 13]. Интересно, что микротрубочки и происходящий по ним транспорт в таком случае играют двоякую роль, поскольку они необходимы и для противоположного процесса естественной разборки ФК и обмена их компонентов [49]. Так, деполимеризация микротрубочек вызывает рост ФК [48], который можно объяснить сдвигом равновесия в сторону их сборки и стабилизации, тем более что ВФ еще некоторое время остаются связанными с ФК [7]. На рис. 7 представлен результат одновременной визуализации ФК и филаментов, декорированных анти-GRIP1-антителами, выявляющий их колокализацию на периферии фибробласта.

Взаимодействие GRIP1 с кинезином и ключевая роль кинезина в транспорте ВФ в направлении плюс-концов микротрубочек давно установлены [6, 18]. Если GRIP1 это действительно адаптер, соединяющий кинезин с ВФ для их транспорта, то ингибирование их взаимодействия должно вызывать агрегацию ВФ, как это происходит при микроинъекции ингибирующих антител против кинезина [3]



**Рис. 6.** В истощенных по белку GRIP1 эндотелиальных клетках EA.hy926 отсутствуют ФК и меняется расположение ВФ. *а* – Фазово-контрастное изображение клеток EA.hy926 – контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1. *б* – Распределение виментина (антитела V9) в клетках EA.hy926 – контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, на простом стекле и стекле, покрытом поли-*L*-лизинином. *в* – Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток EA.hy926 (контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1) антителами к винкулину, маркеру ФК. Стрелками указаны ФК. Части *б* и *в* масштаб 10 мкм, *а* – 50 мкм.



**Рис. 7.** GRIP1 и фокальные контакты (ФК) колокализуются на периферии фибробласта. Взаимное расположение филаментов, декорированных анти-GRIP1-антителами (*а*), и ФК (*б*) в фибробласте REF52. ФК визуализированы по экспрессии плазмиды, кодирующей зиксин человека, слитый с флуоресцирующим белком mKate. Последнее изображение (*г*) является увеличенным участком, выделенным на совмещенном изображении (*в*).

или при деполимеризации микротрубочек [2]. Причиной того, что в клетках CAD и EA.hy926, лишенных GRIP1, ВФ не агрегировали в окооядерной области, вероятно, может быть присутствие другого, отличного от GRIP1, адаптерного белка, который отвечает за поддержание распределения ВФ по всей цитоплазме и в отростках нейронов. В нейронах, моделью которых служат клетки CAD, ФК важны главным образом для направленного роста аксона, который происходит благодаря тому, что

конус роста обладает механочувствительностью [50]. Вносит ли GRIP1 вклад в этот процесс, пока непонятно. Насколько прочно связывались концы отростков с субстратом и сохранились ли ФК в конусах роста при истощении клеток CAD по белку GRIP1, осталось неясным из-за технических трудностей. Что касается клеток эндотелия, то участие GRIP1 в качестве специального адаптера в поддержании связи ФК с ВФ может объясняться тем, что эндотелиальные клетки нуждаются в надежном контакте с субстратом

для успешной пролиферации, а потеря связи с внеклеточным матриксом вызывает в них апоптоз [51].

Таким образом, в данной работе обнаружена, с одной стороны, ассоциация уже известного белка-адаптера кинезина GRIP1 с уже известным видом карго, транспортируемого кинезином — ВФ, с другой стороны, выявлена роль GRIP1 в поддержании адгезивных свойств у по крайней мере двух типов клеток и организации ФК в клетках эндотелия. Поскольку роль ВФ в стабилизации ФК убедительно показана, можно предположить, что для выполнения этой функции ВФ должны располагаться в непосредственной близости к ФК, то есть должны доставляться на периферию клетки посредством активного транспорта с помощью кинезина, и связь кинезина с ВФ осуществляет адаптерный белок GRIP1. Можно предположить также, что белок GRIP1 играет роль посредника, взаимодействующего с ВФ и неким компонентом ФК.

Выражаю глубокую благодарность моим коллегам: Владимиру Родионову (University of Connecticut Health Center, Farmington, США) — за помощь в приобретении плазмиды, кодирующей GRIP1, Ольге Плетюшкиной (МГУ, Москва, Россия) — за культуру клеток EA.hy926, Ameli Robert и Владимиру Гельфанду (Northwestern University, Chicago, США) — за культуру клеток CAD и CRISPR vector, а также за ценные критические замечания, Александру Минину (Институт белка РАН, Пушкино, Россия) — за активное обсуждение работы, Наталии Мининой (Институт белка РАН, Пушкино, Россия) — за техническую помощь и советы.

Эта работа поддержана Российским научным фондом (проект 23-74-00036).

Работа выполнена без привлечения животных и людей в качестве объектов исследования.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hookway C., Ding L., Davidson M.W., Rappoport J.Z., Danuser G., Gelfand V.I. (2015) Microtubule-dependent transport and dynamics of vimentin intermediate filaments. *Mol. Biol. Cell.* **26**, 1675–1686.
- Forry-Schaudies S., Murray J.M., Toyama Y., Holtzer H. (1986) Effects of colcemid and taxol on microtubules and intermediate filaments in chick embryo fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **6**, 324–338.
- Gyoeva F.K., Gelfand V.I. (1991) Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature.* **353**, 445–448.
- Robert A., Tian P., Adam S.A., Kittisopikul M., Jaqaman K., Goldman R.D., Gelfand V.I. (2019) Kinesin-dependent transport of keratin filaments: a unified mechanism for intermediate filament transport. *FASEB J.* **33**, 388–399.
- Hollenbeck P.J., Bershadsky A.D., Pletjushkina O.Y., Tint I.S., Vasiliev J.M. (1989) Intermediate filament collapse is an ATP-dependent and actin-dependent process. *J. Cell Sci.* **92**, 621–631.
- Fu M.M., Holzbaur E.L.F. (2014) Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* **24**, 564–574.
- Bershadsky A.B., Tint I.S., Svitkina T.M. (1987) Association of intermediate filaments with vinculin-containing adhesion plaques of fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **8**, 274–283.
- Ivaska J., Pallari H.M., Nevo J., Eriksson J.E. (2007) Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* **313**, 2050–2062.
- Tsuruta D., Jones J.C.R. (2003) The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J. Cell Sci.* **116**, 4977–4984.
- Cattaruzza M., Lattrich C., Hecker M. (2004) Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* **43**, 1–5.
- Burridge K., Guilluy C. (2016) Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp. Cell Res.* **343**, 14–20.
- Seetharaman S., Etienne-Manneville S. (2019) Microtubules at focal adhesions — a double-edged sword. *J. Cell Sci.* **132**, 1–11.
- Gonzales M., Weksler B., Tsuruta D., Goldman R.D., Yoon K.J., Hopkinson S.B., Flitney F.W., Jones J.C.R. (2001) Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 85–100.
- Bhattacharya R., Gonzalez A.M., DeBiase P.J., Trejo H.E., Goldman R.D., Flitney F.W., Jones J.C.R. (2009) Recruitment of vimentin to the cell surface by  $\beta 3$  integrin and plectin mediates adhesion strength. *J. Cell Sci.* **122**, 1390–1400.
- Vohnoutka R.B., Gulvady A.C., Goreczny G., Alpha K., Handelman S.K., Sexton J.Z., Turner C.E. (2019) The focal adhesion scaffold protein Hic-5 regulates vimentin organization in fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 3037–3056.
- Burgstaller G., Gregor M., Winter L., Wiche G. (2010) Keeping the vimentin network under control: cell-matrix adhesion-associated plectin 1f affects cell shape and polarity of fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* **21**, 3362–3375.
- Setou M., Seog D.-H., Tanaka Y., Kanai Y., Takei Y., Kawagishi M., Hirokawa N. (2002) Glutamate-re-

- ceptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*. **417**, 83–87.
18. Li B., Trueb B. (2001) Analysis of the  $\alpha$ -actinin/zyxin interaction. *J. Biol. Chem.* **276**, 33328–33335.
  19. Coutts A.S., MacKenzie E., Griffith E., Black D.M. (2003) TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J. Cell Sci.* **116**, 897–906.
  20. Lv K., Chen L., Li Y., Li Z., Zheng P., Liu Y., Chen J., Teng J. (2015) Trip6 promotes dendritic morphogenesis through dephosphorylated GRIP1-dependent myosin VI and F-actin organization. *J. Neurosci.* **35**, 2559–2571.
  21. Wyszynski M., Kim E., Dunah A.W., Passafaro M., Valtchanoff J.G., Serra-Pages C., Streuli M., Weinberg R.J., Sheng M. (2002) Interaction between GRIP and liprin- $\alpha$ /SYD2 is required for AMPA receptor targeting. *Neuron*. **34**, 39–52.
  22. Takamiya K., Kostourou V., Adams S., Jadeja S., Chalepakis G., Scambler P.J., Huganir R.L., Adams R.H. (2004) A direct functional link between the multi-PDZ domain protein GRIP1 and the Fraser syndrome protein Fras1. *Nat. Genet.* **36**, 172–177.
  23. Modjeski K.L., Ture S.K., Field D.J., Cameron S.J., Morrell C.N. (2016) Glutamate receptor interacting protein 1 mediates platelet adhesion and thrombus formation. *PLoS One*. **11**, e0160638.
  24. Geiger J.C., Lipka J., Segura I., Hoyer S., Schlager M.A., Wulf P.S., Weinges S., Demmers J., Hoogenraad C.C., Acker-Palmer A. (2014) The GRIP1/14-3-3 pathway coordinates cargo trafficking and dendrite development. *Dev. Cell*. **28**, 381–393.
  25. Charych E.I., Li R., Serwanski D.R., Li X., Miralles C.P., Pinal N., Blas A.L.D. (2006) Identification and characterization of two novel splice forms of GRIP1 in the rat brain. *J. Neurochem.* **97**, 884–898.
  26. Yamazaki M., Fukay M., Abe M., Ikeno K., Kakizaki T., Watanabe M., Sakimura K. (2001) Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. *Neurosci. Lett.* **304**, 81–84.
  27. Hanley L.J., Henley J.M. (2010) Differential roles of GRIP1a and GRIP1b in AMPA receptor trafficking. *Neurosci. Lett.* **485**, 167–172.
  28. DeSouza S., Fu J., States B.A., Ziff E.B. (2002) Differential palmitoylation directs the AMPA receptor-binding protein ABP to spines or to intracellular clusters. *J. Neurosci.* **22**, 3493–3503.
  29. Dong H., O'Brien R.J., Fung E.T., Lanahan A.A., Worley P.F., Huganir R.L. (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*. **386**, 279–284.
  30. Pfennig S., Foss F., Bissen D., Harde E., Treeck J.C., Segarra M., Acker-Palmer A. (2017) GRIP1 binds to ApoER2 and ephrinB2 to induce activity-dependent AMPA receptor insertion at the synapse. *Cell Rep.* **21**, 84–96.
  31. Steiner P., Alberi S., Kulangara K., Yersin A., Sarria J.C.F., Regulier E., Kasas S., Dietler G., Muller D., Catsicas S., Hirling H. (2005) Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2. *EMBO J.* **24**, 2873–2884.
  32. Zhang J., Wang Y., Chi Z., Keuss M.J., Pai Y.-M.P., Kang H.C., Shin J., Bugayenko A., Wang H., Xiong Y., Pletnikov M.V., Mattson M.P., Dawson T.M., Dawson V.L. (2011) The AAA+ ATPase, Thorase regulates AMPA receptor-dependent synaptic plasticity and behavior. *Cell*. **145**, 284–299.
  33. Ye B., Sugo N., Hurn P.D., Huganir R.L. (2002) Physiological and pathological caspase cleavage of the neuronal RASGEF GRASP-1 as detected using a cleavage site-specific antibody. *Neuroscience*. **114**, 217–227.
  34. Davidkova G., Carroll R.C. (2007) Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J. Neurosci.* **27**, 13273–13278.
  35. Mao L., Takamiya K., Thomas G., Lin D.T., Huganir R.L. (2010) GRIP1 and 2 regulate activity-dependent AMPA receptor recycling via exocyst complex interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 19038–19043.
  36. Stegmüller J., Werner H., Nave K.A., Trotter J. (2003) The proteoglycan NG2 is complexed with  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ Glutamate Receptor Interaction Protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 3590–3598.
  37. Heisler F.F., Lee H.K., Gromova K.V., Pechmann Y., Schurek B., Ruschkies L., Schroeder M., Schweizer M., Kneussel M. (2014) GRIP1 interlinks N-cadherin and AMPA receptors at vesicles to promote combined cargo transport into dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 135030–135035.
  38. Wagner W., Lippmann K., Heisler F.F., Gromova K.V., Lombino F.L., Roesler M.K., Pechmann Y., Hornig S., Schweizer M., Polo S., Schwarz J.R., Eilers J., Kneussel M. (2019) Myosin VI drives clathrin-mediated AMPA receptor endocytosis to facilitate cerebellar long-term depression. *Cell Rep.* **28**, 11–20.
  39. Xie X., Liang M., Yu C., Wei Z. (2021) Liprin- $\alpha$ -mediated assemblies and their roles in synapse formation. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 653381.
  40. Astro V., Tonoli D., Chiaretti S., Badanai S., Sala K., Zerial M., de Curtis I. (2016) Liprin- $\alpha$ 1 and ERC1 control cell edge dynamics by promoting focal adhesion turnover. *Sci. Rep.* **6**, 33653.
  41. Pehkonen H., de Curtis I., Monni O. (2021) Liprins in oncogenic signaling and cancer cell adhesion. *Oncogene*. **40**, 6406–6416.
  42. Lu X., Wyszynski M., Sheng M., Baudry M. (2007) Proteolysis of glutamate receptor-interacting protein by calpain in rat brain: implications for synaptic plasticity. *J. Neurochem.* **77**, 1553–1560.
  43. Guo L., Wang Y. (2007) Glutamate stimulates glutamate receptor interacting protein 1 degradation by

- ubiquitin-proteasome system to regulate surface expression of GluR2. *Neuroscience*. **145**, 100–109.
44. Qi Y., Wang J.K.T., McMillian M., Chikaraishi D.M. (1997) Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J. Neurosci.* **17**, 1217–1225.
  45. Shea T.B., Flanagan L.A. (2001) Kinesin, dynein and neurofilament transport. *Trends Neurosci.* **24**, 644–648.
  46. Hackney D.D., Stock M.F. (2000) Kinesin's IAK tail domain inhibits initial microtubule-stimulated ADP release. *Nat. Cell Biol.* **2**, 257–260.
  47. Yonekura H., Nomura A., Ozawa H., Tatsu Y., Yumoto N., Uyeda T.Q.P. (2006) Mechanism of tail-mediated inhibition of kinesin activities studied using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 420–427.
  48. Bershadsky A., Chausovsky A., Becker E., Lyubimova A., Geiger B. (1996) Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.* **6**, 1279–1289.
  49. Kaverina I., Krylyshkina O., Small J.V. (1999) Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* **146**, 1033–1044.
  50. Wang D-Y., Melero C., Albaraky A., Atherton P., Jansen K.A., Dimitracopoulos A., Dajas-Bailador F., Reid A., Franze K., Ballestrem C. (2021) Vinculin is required for neuronal mechanosensing but not for axon outgrowth. *Exp. Cell Res.* **407**, 112805–112811.
  51. Meredith J.E., Fazeli B., Schwartz M.A. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.* **4**, 953–961.

## GRIP1 is Involved in the Interaction of Vimentin Filaments with Focal Adhesions in Endothelial Cells

F. K. Gyoeva<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pouschino, Moscow Region, 142290 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: fgyoeva@gmail.com*

Vimentin intermediate filaments are dynamic structures that are able to move in cytoplasm due to activity of the motor proteins, kinesin-1 and cytoplasmic dynein. How exactly motors interact with vimentin filaments remains unclear. In this work, I show that Glutamate Receptor Interacting Protein (GRIP1) known as adapter for kinesin-1 on neuronal cargoes is also a mediator for kinesin-1 interaction with vimentin filaments, and this interaction provides crosstalk between vimentin filaments and focal adhesions. GRIP1 associates with vimentin filaments in various cells and co-immunoprecipitates with vimentin from cell lysate. Human endothelial cells knockout by *GRIP1* gene lose focal adhesions and dramatically change their adhesive properties. Hypothetically, kinesin-1 engages GRIP1 to deliver vimentin filaments to the cell periphery so that they make contact with focal adhesions and stabilize them.

**Keywords:** Glutamate Receptor Interacting Protein 1 (GRIP1), kinesin, vimentin intermediate filaments, focal adhesions