

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 581.17.

ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА: ОТ ИСТОКОВ ДО НОВЫХ ГОРИЗОНТОВ

Е.И.Зворыкина

Московский Государственный университет им.М.В. Ломоносова, Москва

y.zvorykina@gmail.com

Повышенный риск опухолеобразования при переезде в Арктику из средних широт является одной из серьезных проблем, ограничивающих возможности полноценного заселения Арктики. Одним из способов терапии возникновения опухолей является воздействие на цитоскелет опухолевых клеток, поэтому немаловажным является его подробное изучение. В данной работе приведена история изучения клеточной подвижности.

Ключевые слова: цитоскелет, клеточная биология, микротрубочки

HIGHLIGHTS IN CYTOSKELETON STUDY

E.I.Zvorykina

Lomonosov Moscow State University, Moscow

y.zvorykina@gmail.com

The high risk of tumorigenesis due to migration to the Arctic from mid-latitude environment is one of the serious problems that limits the possibilities for efficient settlement of the Arctic region. One of the therapeutic ways to affect tumors is the cytoskeleton modification of the tumor cells. Therefore, cytoskeleton study is vital for cancer prevention. This paper presents the main highlights in history of the study of cell motility and cytoskeleton.

Index terms: cytoskeleton, cell biology, microtubules, cancerogenesis

Способность к направленному движению и поддержанию поляризованной формы является фундаментальным свойством животных клеток. На движении клеток строятся многие процессы в организме, такие как морфогенетические миграции во время эмбрионального развития, процессы регенерации в организме, передвижение

нервных клеток при формировании нервной системы, хемотаксические перемещения клеток крови и иммунной системы, движение фибробластов в процессе заживления раны. Особую роль процессы подвижности играют в опухолеобразовании, в частности при метастазировании. Исследования последних лет связывают повышенный

риск развития опухолей с нарушением циркадных ритмов. По последним данным известно, что при переезде из средней полосы в условия полярного дня и ночи у людей и животных происходит сдвиг фаз циркадных ритмов. Это в свою очередь приводит к изменениям в суточном режиме труда и отдыха: при низком потреблении естественного (дневного) света потребность в сне повышается на физиологическом уровне, в результате в такие периоды люди подвержены депривации сна [38]. В случае частых смен часовых поясов даже на короткие периоды времени и работой в ночные смены также наблюдается десинхронизация внутренних часов организма, что повышает риск опухолеобразования [28]. Многие современные виды онкотерапии основываются на воздействии на аппарат подвижности клетки, поэтому исследования компонентов цитоскелета являются одним из ведущих вопросов современной клеточной биологии. В данной работе приведены основные этапы исследования цитоскелета с первых достижений микроскопии до современных открытий, в частности в онкотерапии.

В 1844 году Роберт Ремак, один из основателей клеточной теории, описал фибриллярные структуры в теле нейрона и аксоне ракообразных [39]. На основании этих наблюдений в 1882 году Зигмунд Фрейд пришел к выводу, что «Нервные клетки в головном мозге и в брюшной нервной цепочке состоят из двух составляющих, одно из которых представляет собой сеть нервных фибрилл, а второе гомогенно окружает эти фибриллы» [21]. В отсутствие новых технологических возможностей для создания большего микроскопического увеличения более глубокое изучение аппарата клеточной подвижности становилось невозможным. Большая часть наблюдений движения клеток в 18-19 веках сводилась к описанию поведения одноклеточных организмов и сперматозоидов.

Возможность исследовать движение животных клеток на более высоком уровне появилась в конце 19 века благодаря усовершенствованию конструкции микроскопа. На основании достижений 18-19 веков удалось значительно повысить разрешающую способность микроскопа. Современные объективы оптических микроскопов с масляной иммерсией при числовой апертуре 1,50 стали возможными только благодаря деятельности немецкого оптика Эрнста Аббе, разработавшего совершенно новую теорию образования изображения наблюдаемого предмета в оптическом микроскопе. Именно им была внесена ясность в вопрос о разрешающей способности такого вида микроскопа. Аббе теоретически установил пределы разрешающей способности микроскопа, вывел так называемый «Закон синусов», разработал методы расчёта безабберационных оптических систем, предложил конструкцию нового осветителя. Под его руководством в 1872 году немецкой фирмой «Карл Цейс» в г. Йене была рассчитана и изготовлена серия первоклассных микрообъективов-ахроматов с апертурой до 1,50. В 1886 году получившая мировую известность фирма «Карл Цейс», руководимая Э. Аббе, выпустила серию световых сложных микроскопов с объективами из восьми апохроматов (с компенсационными окулярами) и стала ведущим производителем микроскопов того времени. В 1888 году она создала апохромат с монобромнафталиновой иммерсией при апертуре 1,60. Расчет числа Аббе способствовал развитию методов темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

На основании новых методов усиления контраста и объективов с большим увеличением удалось получить качественные изображения тонких прозрачных объектов и наблюдать движение животных клеток.

В 1882 году на Сицилии Илья Мечников, наблюдая за поведением личинок морских звезд, заметил, что их подвижные клетки окружают и

поглощают чужеродные тела. Наблюдая под микроскопом за подвижными клетками личинки морской звезды, ученый открыл, что эти клетки, захватывающие и переваривающие органические частицы, не только участвуют в пищеварении, но и выполняют в организме защитную функцию. Это предположение Мечников подтвердил простым убедительным экспериментом. Введя в тело прозрачной личинки шип розы, он через некоторое время увидел, что амёбоциты скопились вокруг занозы. Клетки либо поглощали, либо обволакивали инородные тела «вредных деятелей», попавшие в организм. Мечников эти клетки назвал фагоцитами, а само явление фагоцитозом, от греческого слова «фагейн» — «есть». И в следующем, 1883 году, Мечников сделал в Одессе доклад на съезде естествоиспытателей и врачей «О целебных силах организма» [45]. Предложенные Мечниковым идеи о роли фагоцитоза в развитии воспаления и формирования иммунитета достаточно быстро получили одобрение со стороны современников, однако они стали общепринятыми только после формулировки теории гуморального иммунитета.

Наблюдаемые Мечниковым клетки личинок морских звезд были достаточно прозрачными для подробного изучения под микроскопом, однако это является исключением из правил и большинство животных клеток обладают большей толщиной и меньшей контрастностью. Прижизненное наблюдение животных клеток требовало новых технологических достижений в микроскопии. Возникновение подобного биологического интереса привело к появлению новых оптических методов.

Для подтверждения идей Сантьяго Рамон-и-Кахаля и Вильгельма Гиса о формировании фибрилл в нейронах в 1906 году Росс Гаррисон предложил метод культивирования клеток. Ему удалось культивировать ткани эндотелия, полученные из медуллярного сосуда зародыша лягушки. В 1907 году Гаррисон

опубликовал статью, подробно описав свой опыт [24]. Благодаря ей многие биологи того времени – Уоррен и Маргарет Льюис, Алексис Каррел, стали развивать новые методы культивирования клеток. Открытие Гаррисона позволило наблюдать за движением большинства типов животных клеток, тогда как до него трудно было предположить, что клетки в тканях способны к движению.

В 1903 году русский биолог Николай Кольцов впервые ввел в употребление термин «цитоскелет» на основании большой серии опытов по изучению свойств жгутиков сперматозоидов [2]. Он описывал цитоскелет как структуру, поддерживающую форму клетки и является ее опорным каркасом. Полный спектр функций цитоскелета в клетке был выявлен намного позже.

Наблюдение за медленным движением клеток под микроскопом стало полностью возможным и требовало лишь внимательности и терпения от исследователей.

Однако для улучшения качества съемки клеток в реальном времени требовалось еще большее повышение контрастности получаемого изображения. Английский оптик Джон Сиркс своими научными трудами от 1893 года положил начало интерференционной микроскопии [16]. В 1903 году Жигмонди и Зидентопф создали ультрамикроскоп. В 1911 году Саньяком была описана конструкция первого двухлучевого интерференционного микроскопа. В 1932 году Фриц Цернике предложил использовать метод фазового контраста для наблюдения в оптических микроскопах прозрачных и слабо рассеивающих белый свет объектов. Это был наиболее применимый метод для прямого наблюдения за живыми объектами под микроскопом без дополнительного окрашивания и контрастирования. За изобретение фазово-контрастного микроскопа Цернике в 1953 году был удостоен Нобелевской премии по физике [52]. Интерференционная микроскопия также

нашла свое применение в наблюдении за животными клетками после того, как в 1950 году Джордж Номарский преобразовал призму Волластона и таким образом создал интерферометр сдвига с небольшой степенью разделения луча. В 1955 году он опубликовал теоретические основы дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии [7]. Его труды легли в основу используемого на сегодняшний день метода дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии.

В первой половине 20-го века были описаны физико-химические и биохимические свойства актина и миозина и их участие в процессе мышечного сокращения. В 1929 году Рудольф Питерс предлагает концепцию системы белков, координирующих и транспортирующих биохимические компоненты в цитоплазме [34], но термин «цитоскелет» (cytosquelette) вводит французский эмбриолог Поль Винтрберт в 1931 году [20].

В 1950-е, благодаря работам Хартмута Хоффманна-Берлинга стало ясно, что актин и миозин являются не только механохимическими элементами мышечного сокращения, но также могут быть ключевыми компонентами, обеспечивающими движение клетки. Динамическое взаимодействие актина и миозина было подробно изучено в экспериментах со слизевиками и амебой. Это привело к появлению двух теорий, объясняющих амебоидное движение – сторонники первой считали, что движение обеспечивается за счет сокращения переднего конца клетки, тогда как сторонники второй считали, что поджимается задний конец клетки относительно направления движения [5].

Адам Кертис, работая в лаборатории Майкла Аберкромби в Лондоне, использовал метод интерференционной отражательной микроскопии для изучения адгезионных контактов в мигрирующих клетках. Он измерял расстояние между мембраной клетки и стеклом, на котором

культивировались клетки. Опыты, проводимые Кертисом, впервые позволили показать, что клетки прикрепляются к поверхности неравномерно [13].

В 1970 Колин Иззард подтвердил наблюдения в лаборатории Аберкромби. С помощью метода интерференционной отражательной микроскопии он показал, что мембрана фибробласта во время движения прикрепляется к стеклу через дискретные области адгезии, самые большие из которых были названы фокальными контактами или точками фокальной адгезии. Из интерференционных картинок на кадрах IRM было установлено, что расстояния от клеток до субстрата в фокальных контактах находятся в диапазоне 10-15 микрон. Так же исследования Иззарда выявили общую неподвижность фокальных контактов относительно субстрата, что согласуется с функцией адгезии. Адгезивная природа этих локусов была подтверждена в экспериментах, где клетки были механически удалены с поверхности на которой они выращивались: после такой обработки в местах фокальных контактов оставались остатки, изолированные и все еще прикрепленные к субстрату [27].

Аберкромби, исследуя фибробласты, [3] обнаружил фокальные контакты с помощью метода электронной микроскопии в своих работах с Джоном Хэйсмэном и Сью Пегрум – они выявили дискретные точки адгезии между мембраной и стеклом, а также то, что такие области часто располагаются вблизи длинных пучков микрофиламентов, распространяющихся по цитоплазме клетки. Однако использование интерференционного отражательного микроскопа позволило исследовать динамическое поведение фокальных контактов на живых клетках. В течение недели Аберкромби и Кертис снимали фильмы на интерференционном отражательном микроскопе и методом фазового контраста, на которых наблюдали поведение области адгезии с субстратом в мигрирующей фибробласте.

Аберкромби предложил называть эти области адгезии «ножками», но в результате это не прижилось, и для них осталось название, изначально данное Иззардом – «фокальные контакты» [51].

Следующей задачей для ученых стала полная характеристика компонентов цитоскелета. В 1944 году Кейс Портер подробно исследовал структуру цитоскелета в эукариотической клетке с помощью электронной микроскопии. Он наблюдал короткие филаменты, расположенные в цитоплазме. Портер назвал их микротрабекулами и рассматривал как отдельную сеть филаментов в клетке наряду с микротрубочками, микрофиламентами и промежуточными филаментами. На сегодняшний день открытие Портера считается артефактом [29].

Для дальнейшего изучения структуры цитоскелета требовались новые методы, которые не заставили себя ждать. В 1940-1950-е годы Альберт Кунс разрабатывал метод иммуофлюоресценции. В 1970-е годы Клаус Вебер и Элиас Лазардис, а в последствии и Мэри Осборн, открыли антитела против белков цитоскелета, таких как актин и тубулин [48]. Используя эти белки, удалось выявить локализацию микрофиламентов и микротрубочек в цитоплазме на фиксированных пермеабелизированных клетках с флуоресцентно мечеными белками.

На данный период времени получил развитие метод эпифлуоресцентной микроскопии и благодаря деятельности Иогана Пloedма был создан современный куб светофильтров [36]. Благодаря использованию флуоресцентного микроскопа было определено, что стресс-фибриллы, наблюдаемые в световой микроскоп и пучки микрофиламентов, видимые с помощью электронной микроскопии, имеют сложную структуру и находятся в мышцах. Однако изучение фиксированных клеток не позволяло наблюдать эти структуры в динамике, поэтому основным способом

прижизненных исследований клеток по-прежнему осуществлялось с помощью светового микроскопа. Значительные изменения относятся к 1970 годам, когда Ланс Тэйлор и Ю-Ли Вонг напрямую поместили актин флуоресцентной меткой и микроинъекцировали его в живые клетки [20; 21]. С помощью использования метода микроинъекции актина удалось выяснить, что миозин активирует АТФазу, а также пронаблюдать полимеризацию мономерного актина в филаменты. В дальнейшем были флуоресцентно помечены другие компоненты цитоскелета, что привело к значительным открытиям в области изучения динамики белков клеточной подвижности.

В 1980-е с развитием компьютерных технологий электронные методы стали применяться в микроскопии. Хотя видеомикроскопия как метод появилась за 30 лет до этого, её развитие было отложено в связи с тем, что качество получаемых изображений нельзя было улучшить. Несомненно, использование видеокамеры и последующее улучшение цифрового изображения смогли заменить фильмы на пленке. В частности, в результате деятельности Нины и Роберта Аллена в 1981 году, разработавших метод высокоразрешающей дифференциальной интерференционной микроскопии, удалось добиться достаточного качества съемки, чтобы выявить отдельные микротрубочки в клетке. Это в дальнейшем привело к открытию моторных белков кинезинов [6].

К моменту выхода первого издания Шинайи Иное «Video Microscopy» в 1986 году компьютерные технологии и видеотехника получили широкое распространение и стали доступными [26]. Это привело к появлению микроскопов с компьютеризированным контролем и подключенной цифровой камерой. В результате изображения, получаемые с помощью методов фазового контраста и дифференциальной интерференционной микроскопии, стали цифровыми. Следующим шагом стало

введение метода просвечивающей электронной микроскопии для анализа клеточной подвижности [32].

Конфокальная сканирующая микроскопия как метод достаточно долго не использовалась клеточными биологами для исследований. В 1950-х годах биологам понадобилось увеличить контраст наблюдения меченых флюорохромами объектов в толстых срезах тканей. Для разрешения этой проблемы Марвин Минский, профессор Массачусетского технологического института, предложил использовать для флуоресцентных микроскопов конфокальную схему [32].

Показатель преломления большинства биологических объектов почти такой же, как и у стекла. В этой связи наблюдение таких объектов, находящихся на поверхности стекла предметного столика микроскопа, в обычном световом микроскопе затруднено. Поэтому конфокальный микроскоп, имеющий высокий контраст, давал исследователю две неопределимые возможности: во-первых, он позволяет исследовать препарированные ткани на клеточном уровне в состоянии их физиологической жизнедеятельности; во-вторых, он дает возможность оценивать результаты исследования клеточной активности биологических тканей в четырёх измерениях (высота, ширина, глубина и время). Однако использование метода конфокальной микроскопии подходило для фиксированных объектов, но не для исследования живых клеток.

В середине 1980-х Брэд Амос и Джон Уайт исследовали межклеточные контакты в клетках эмбриона *Caenorhabditis elegans*, используя антитела к тубулину. Их эксперимент потерпел неудачу, качество изображений было достаточно низким из-за фоновой флуоресценции. Тогда Амос и Уайт развили идею Минского и предложили сканировать неподвижные клетки лазерным лучом для возбуждения флуоресценции [9]. Их разработки привели к появлению лазерного

сканирующего конфокального микроскопа.

Потребовалось дождаться еще одного открытия, чтобы метод флуоресцентной микроскопии позволил изучать аппарат подвижности клеток. В 1974 году Осаму Симомура выделил зелёный флуоресцентный белок GFP вместе с другим светящимся белком экворином из медузы *Aequorea victoria*. Оказалось, что в *A. victoria* взаимодействие ионов кальция с экворином вызывает голубое свечение белка. Часть этой биолуминесценции переносится на зелёный флуоресцентный белок, который поглощает синий свет и испускает флуоресценцию зелёного цвета, что в целом приводит к зелёному сдвигу в свечении медузы. Однако применение зелёного флуоресцентного белка в молекулярной биологии началось лишь в 1990-х годах. В 1992 году Дуглас Прэшер проклонировал и просеквенировал ДНК белка, после чего из-за недостатка финансирования вынужден был закрыть проект, и разослал полученную ДНК в несколько лабораторий, в том числе в лабораторию Мартина Чалфи [37]. Чалфи экспрессировал последовательность в *Escherichia coli* и *Caenorhabditis elegans* и опубликовал результаты в журнале *Science* в 1994 году. Месяц спустя были опубликованы независимые результаты из лаборатории Фредерика Тцуи. Оказалось, что GFP принимал нативную конформацию и образовывал флуорофор при комнатной температуре и без добавления дополнительных кофакторов, что обеспечило возможность использования белка в качестве маркера в клетках многих организмов.

Теперь два или более компонентов цитоскелета могли визуализироваться в клетке одновременно и лазерная конфокальная микроскопия позволила отслеживать распределение этих белков в трехмерном пространстве при воздействии на клетки и в процессе движения. В таких условиях исследователям удалось заняться решением центральной проблемы клеточной подвижности – как внешние

факторы влияют на динамику цитоскелета и каким образом это приводит к движению клетки. Наряду с развитием оптических возможностей микроскопии появились технические методы для измерения механических сил и натяжения в клетке [33], появились методы для визуализации хемотаксиса [53], и способы изучения сигнальных путей [8]. В 1980 была описана морфология подвижных клеток и органеллы движения [1]. У подвижных клеток наблюдали поляризованную форму. Исследования, направленные на изучение локомоторной активности, установление и поддержание поляризованной формы клетки позволили установить, что эти процессы основываются на элементах цитоскелета и обеспечиваются способностью актиновых филаментов и МТ к динамическим перестройкам. В перемещающихся клетках выявили две основные группы структурно различающихся движущихся органелл – ламеллоподии, содержащие сеть диагонально ориентированных актиновых филаментов и филоподии, содержащие плотные пучки параллельных актиновых филаментов, филаменты однозначно ориентированы в них растущими плюс-концами вперед [42].

В 1990-е была предложена подробная модель образования ламеллоподии в поляризованной клетке. Модель предполагает, что механизмы протрузии ламеллоподии обусловлены полимеризацией актина из мономеров, присутствующих в цитоплазме в филаменты, растущие к краю клетки или постоянно перестраивающиеся за счет сборки на переднем конце и одновременной разборки на заднем. Исследования с помощью электронной микроскопии выявили новые детали надмолекулярной организации актиновых филаментов в ламеллоподии [44].

В 2000-е годы ученые пришли к противоречию относительно каскадов, приводящих к полимеризации актина. С одной стороны, было показано, что основной по активности сигнал к образованию новых сетей

микрофиламентов идет по механизму WASP-Arp2/3 [30]. Также белки Ena/VASP облегчают формирование новых сетей посредством удлинения филаментов и увеличения их устойчивости. Однако позднее было показано, что белки Ena/VASP могут замедлять перемещение эукариотических клеток, хотя они и ускоряют перемещение клеток *Listeria* [11;10].

Стало очевидно, что интенсивность полимеризации актина не может быть единственным фактором, определяющим процесс движения клетки. Клетки *Dictyostelium* обнаруживают максимум эффективности сборки актина в ответ на получение импульса внеклеточного цАМФ в момент полного завершения структуризации клетки, но до поляризации.

Возможно, форма и полярность эукариотической клетки служат более точным индикатором скорости перемещения, нежели количество или скорость сборки актиновых филаментов. Быстро перемещающиеся фибробласты клеток *Dictyostelium* довольно часто обнаруживают сильно поляризованный фенотип – клетка удлинена явно различимой задней уropодией, а также небольшой, но постоянно присутствующей ламеллоподией спереди.

В 2000 году исследование движения клеток в трехмерном пространстве с использованием современной техники позволило выявить, что классическое представление о ламеллоподиальном способе локомоции, постулируемое Аберкромби, является одним из множества стратегий движения [35; 36]. Они также предполагали наличие одного сигнального каскада внутри клетки для переключения между различными типами движения и изменения морфологии клетки [37; 38].

Фридл и Вульф в 2010 году подтвердили эту теорию, однако основные участники подобного каскада и механизмы их взаимодействия не были выявлены [19].

В 2007 году научной группой Пейтоном было показано, что клетки

реагируют на изменения двумерного и трехмерного внеклеточного матрикса за счет фокальных контактов и свойств сети актиновых филаментов. Ключевыми участниками этого процесса были признаны малая ГТФаза RhoA и ROCK1 и ROCK2 киназы и миозин II типа (моторный белок, связывающийся с актином) [40; 41].

Таким образом, исследование элементов цитоскелета непосредственно связано с расширением возможности микроскопии и прижизненных наблюдений. На сегодняшний день одним из удобных методов прижизненных исследований МТ является использование маркеров плюс-концов МТ [31].

При анализе клеток с флуоресцентно меченым тубулином основной проблемой является исследование поведения МТ в центральной части клетки, где сеть МТ очень плотная [43; 44]. При использовании маркеров плюс-концов этого удается избежать, так как визуализируются только концы МТ, однако таким образом удается отследить только события роста. Обработка фильмов с визуализированными плюс-концами МТ может проводиться как вручную, так и при помощи полуавтоматизированных методов. [45; 46]. Одним из основных фундаментальных походов к исследованию системы МТ является применение веществ, влияющих на полимеризацию тубулина [49].

Роль тубулина как субъединицы МТ была выяснена на основе

экспериментов с колхицином. При воздействии на клетки колхицина МТ разбирались и рост новых МТ подавлялся [14]. Важным моментом является то, что связывание ингибиторов с тубулиновыми мономерами обратимо [25]; – после отмывки из среды система МТ восстанавливается.

Винбластин и винкулин также разбирают МТ, однако в присутствии этих ингибиторов мономеры тубулина собираются в кластеры, а не присоединяются к пулу свободного тубулина. Напротив, паклитаксел (таксол) – стабилизирует уже существующие МТ [50,51]. Эффект таксола на МТ схож с действием других ингибиторов роста МТ и подходит для исследования роли системы МТ в жизнедеятельности клетки. Следует отметить, что также практикуется использование антитубулиновых ингибиторов для синхронизирования клеток в ходе клеточного цикла и митотического ареста [40].

Знания об особенностях регуляции цитоскелета раскрывают новые возможности в онкотерапии, в частности, в регулировании процессов метастазирования. Успехи в этой области позволяют значительно понизить риск развития рака во время адаптации к различным режимам освещенности как в высоких, так и в средних широтах, что делает миграцию между этими регионами более безопасной и эффективной.

Список литературы:

1. Васильев Ю.М., Гельфанд И.М., Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Комм С.Г., Ольшевская Л.В. Действие метафазных ингибиторов на форму и движение фибробластов в культуре. Цитология, 1972, т. 14. М, с.80-87.
2. Кольцов Н.К. Исследования о форме клеток. I. О спермиях десятиногих

раков в связи с общими соображениями относительно организации клетки. 1905. В кн.: Н.К. Кольцов. Организация клетки. - Москва-Ленинград, 1936.

3. Abercrombie, M., Dunn, G. A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. Exp. Cell Res., 92, P. 57–62.

4. Albrecht-Buehler, G. (1980). Autonomous movements of cytoplasmic fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, P. 6639-6643.
5. Allen, R. D. & Kamiya, N. (eds) (1964). *Primitive motile systems in cell biology*. Academic Press, New York & London.
6. Allen, R. D., Allen, N. S., Travis, J. L. (1981). Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil.*, 1, P. 291-302.
7. Allen, R. D., David, G. B., Nomarski, G. (1969). The Zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy. *Z. Wiss. Mikrosk.*, 69, P. 193-221.
8. Allen, W. E., Jones, G. E., Pollard, J. & Ridley, A. J. (1997). Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organisation and cell adhesion in macrophages. *J. Cell Sci.*, 110, P. 707-720.
9. Amos, W. B., White, J. G. (2003). How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol. Cell*, 95, P. 335-342.
10. Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., Goodman, C.S.(2000). Repulsive Axon Guidance: Abelson and Enabled Play Opposing Roles Downstream of the Roundabout Receptor // *Cell*, 707, P. 703-715.
11. Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fassler, R., Wehland, J., and Gertler, F.B. (2008). Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell*, 707, P. 717-728.
12. Bovee, E. C. (1964). Morphological differences among Pseudopodia of various small amebae and their functional significance. In *Primitive Motile Systems in Cell Biology* (ed. R. D. Allen and N. Kamiya), P. 189-219. New York, London: Academic Press.
13. Curtis, A. S. G. (1964). The adhesion of cells to glass: a study by interference reflection microscopy. *J. Cell Biol.*, 19, P.199-215.
14. De Brabander, M. J., Van De Veire, R. M. L., Aerts, F. E. M., Borgers, M., Janssen, P. A. J. (1976). The effects of methyl[5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro. *Cancer Res*, 36, P. 905-916.
15. De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Willebrords, R., and De Mey, J. (1981). Microtubule assembly in living cells after release from nocodazole block: The effects of metabolic inhibitors, Taxol and pH. *Cell Biol, Int. Rep*, 5, P. 913-920.
16. Dunn, G. A. (1988). Transmitted-light interference microscopy: a technique born before its time. *Proc. RMS*, 33, P. 189-196.
17. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126, P. 677-689.
18. Friedl, P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol*, 16, P.14-23.
19. Friedl, P., Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol*, 188, P.11-19.
20. Frixione E. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic // *Cell motility and the cytoskeleton*. 2000. Vol. 46 (2). P.73-94.
21. Frixione E. (2003). Sigmund Freud's contribution to the history of the neuronal cytoskeleton. *J. Histor. Neurosci*, 12, P.12-24.
22. Garrison A.K., Shanmugam M., Leung H.C., Xia C., Wang Z., Ma L. (2012). Visualization and analysis of microtubule dynamics using dual color-coded display of plus-end labels // *PLoS one*, 7(11), E50421.
23. Gell C., Bormuth V, Brouhard GJ, Cohen DN, Diez S, Friel CT, Helenius J, Nitzsche B, Petzold H, Ribbe J, Schäffer E, Stear JH, Trushko A, Varga V, Widlund PO, Zanic M, Howard J. (2010). Microtubule dynamics reconstituted in vitro and imaged by single-molecule fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.*, 95, P.221-245.

24. Harrison, R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.*, 1, P. 116–118.
25. Hoebeke, J., Van Nijen, G., De Brabander, M. (1976). Interaction of nocodazole (R 17934), a new anti-tumoral drug, with rat brain tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, P. 319–324.
26. Inoué, S. (1986). *Video Microscopy*. Plenum Press, New York, USA.
27. Izzard, C. S., Lochner, L. R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell Sci.*, 21, P. 129–159.
28. Knutsson A. Health disorders of shift workers // *Occupational Medicine*. 2003. Vol. 53(2). P. 103–108.
29. Lazarides, E., Weber, K. (1974). Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 71, P. 2268–2272.
30. Machesky L.M., Gould K.L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer // *Curr Opin Cell Biol*, 11(1), P. 117-21.
31. Matov A., Applegate K., Kumar P., Thoma C., Krek W., Danuser G., Wittmann T. (2010). Analysis of Microtubule Dynamic Instability Using a Plus End Growth Marker. *Nat Methods*, 7(9), P. 761-768.
32. Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope // *Scanning*, 10, P. 128–138.
33. Pelham, R. J. Jr, Wang, Y. (1999). High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate // *Mol. Biol. Cell*, 10, P. 935–945.
34. Peters RA. The Harben Lectures, 1929. Reprinted in: Peters, R. A. *Biochemical lesions and lethal synthesis*, p. 216. Pergamon Press, Oxford. 1963.
35. Petrie, R. J., Gavara, N., Chadwick, R. S., Yamada, K. M. (2012). Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J. Cell Biol*, 197, P. 439-455.
36. Ploem, J. S. (1971). A study of filters and light sources in immunofluorescence microscopy // *Ann. NY Acad. Sci*, 177, P.414–429.
37. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein // *Gene*, 111, P. 229–233.
38. Rajaratnam S.M.W., Dijk D.J., Middleton B., Stone B.M., Arendt J. (2003). Melatonin phase-shifts human circadian rhythms with no evidence of changes in the duration of endogenous melatonin secretion or the 24- h production of reproductive hormones. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9), P. 4303-4309.
39. Remak, R. (1844). *Neurologische Erläuterungen Arch. Anat. Physiol. wiss Med*, P. 463–472.
40. Rowinsky, E. K., Donehower, R. C. (1955). Paclitaxel (Taxol) *N. Engl. J. Med*, 332, P. 1004–1014.
41. Schiff, P. B., Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, P. 1561–1565.
42. Small, J.V., Celis J.E. (1978). Direct visualization of the 10-nm (100-A)-filament network in whole and enucleated cultured cells. *J. Cell Sci.*, 31, P.393-409.
43. Stout A., D’Amico S., Enzenbacher T., Ebbert P., Lowery L.A. (2014). Using plusTipTracker software to measure microtubule dynamics in *Xenopus laevis* growth cones. *J.Vis. Exp*, 7(91), E52138.
44. Svitkina T.M., Borisy G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, 145(5), P. 1009-1026.
45. Tauber, A. I. (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, 4, P. 897–901.
46. Taylor, D. L., Wang, Y. (1978). Molecular cytochemistry: incorporation of fluorescently labeled actin into living cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 75, P. 857–861.
47. Telley IA, Bieling P, Surrey T. (2011). Reconstitution and quantification of dynamic microtubule end tracking in vitro

using TIRF microscopy. *Methods Mol Biol*, 777, P.127-145.

48. Weisenberg R.C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations *Science*, 177(4054), P. 1104-1105.

49. Wilson, L., and Jordan, M. A. (1995). Pharmacological probes of microtubule function. In "Microtubules" (J. S. Hyams and C. W. Lloyd, Eds.), P. 59–83, Wiley–Liss, New York.

50. Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Brocker, E. B., Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol*, 160, P. 267-277.

51. Wolosewick J.J., Porter K.R. (1979). Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality. *J. Cell Biol*, 82 (1), P. 114–39.

52. Zernike, F. (1955). How I discovered phase contrast. *Science*, 121, P. 345–349.

53. Zicha, D., Dunn, G. A., Brown, A. F. (1991). A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J. Cell Sci*, 99, P.769–775.

References:

1. Vasilev Ju. M. Gelfand I. M., Domnina L.V., Ivanova O.Ju., Komm S.G., Olshevskaya L.V. Deistvie metafaznih ingibitorov na formu I dvizhenie fibroplastov v culture [The effect of metaphase inhibitors on the shape and movement of fibroblasts in culture.]. *Citologiya – Moscow*, 1972, vol. 14, pp. 80-87. (In Russian).

2. Koltsov N.K. Issledovaniya o forme kletok i o spermiyah desyatinogih rakov v syazi s obshimi soobrazheniyami otnositelno organizatsii kletki [Studies on cell shape and sperm of decapod crayfish in connection with general considerations regarding cell organization]. *Organizatsiya kletki* [Cell organization]. Moscow-St.Petersburg, 1936 (In Russian).

3. Abercrombie, M., Dunn, G. A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition

observed by interference reflection microscopy. *Exp. Cell Res.*, 92, P. 57–62.

4. Albrecht-Buehler, G. (1980). Autonomous movements of cytoplasmic fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, P. 6639-6643.

5. Allen, R. D. & Kamiya, N. (eds) (1964). Primitive motile systems in cell biology. Academic Press, New York & London.

6. Allen, R. D., Allen, N. S., Travis, J. L. (1981). Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil.*, 1, P. 291–302.

7. Allen, R. D., David, G. B., Nomarski, G. (1969). The Zeiss–Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy. *Z. Wiss. Mikrosk.*, 69, P. 193–221.

8. Allen, W. E., Jones, G. E., Pollard, J. & Ridley, A. J. (1997). Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organisation and cell adhesion in macrophages. *J. Cell Sci.*, 110, P. 707–720.

9. Amos, W. B., White, J. G. (2003). How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol. Cell*, 95, P. 335–342.

10. Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., Goodman, C.S.(2000). Repulsive Axon Guidance: Abelson and Enabled Play Opposing Roles Downstream of the Roundabout Receptor // *Cell*, 707, P. 703-715.

11. Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fassler, R., Wehland, J., and Gertler, F.B. (2008). Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell*, 707, P. 717-728.

12. Bovee, E. C. (1964). Morphological differences among Pseudopodia of various small amebae and their functional significance. In *Primitive Motile Systems in Cell Biology* (ed. R. D. Allen and N. Kamiya), P. 189-219. New York, London: Academic Press.

13. Curtis, A. S. G. (1964). The adhesion of cells to glass: a study by

interference reflection microscopy. *J. Cell Biol.*, 19, P.199–215.

14. De Brabander, M. J., Van De Veire, R. M. L., Aerts, F. E. M., Borgers, M., Janssen, P. A. J. (1976). The effects of methyl[5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro. *Cancer Res*, 36, P. 905–916.

15. De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Willebrords, R., and De Mey, J. (1981). Microtubule assembly in living cells after release from nocodazole block: The effects of metabolic inhibitors, Taxol and pH. *Cell Biol, Int. Rep*, 5, P. 913–920.

16. Dunn, G. A. (1988). Transmitted-light interference microscopy: a technique born before its time. *Proc. RMS*, 33, P. 189–196.

17. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126, P. 677-689.

18. Friedl, P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol*, 16, P.14-23.

19. Friedl, P., Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol*, 188, P.11-19.

20. Frixione E. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic // *Cell motility and the cytoskeleton*. 2000. Vol. 46 (2). P.73–94.

21. Frixione E. (2003). Sigmund Freud's contribution to the history of the neuronal cytoskeleton. *J. Histor. Neurosci*, 12, P.12–24.

22. Garrison A.K., Shanmugam M., Leung H.C., Xia C., Wang Z., Ma L. (2012). Visualization and analysis of microtubule dynamics using dual color-coded display of plus-end labels // *PLoS one*, 7(11), E50421.

23. Gell C., Bormuth V, Brouhard GJ, Cohen DN, Diez S, Friel CT, Helenius J, Nitsche B, Petzold H, Ribbe J, Schäffer E, Stear JH, Trushko A, Varga V, Widlund PO, Zanic M, Howard J. (2010). Microtubule dynamics reconstituted in vitro and imaged

by single-molecule fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.*, 95, P.221-245.

24. Harrison, R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.*, 1, P. 116–118.

25. Hoebeke, J., Van Nijen, G., De Brabander, M. (1976). Interaction of nocodazole (R 17934), a new anti-tumoral drug, with rat brain tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, P. 319–324.

26. Inoué, S. (1986). *Video Microscopy*. Plenum Press, New York, USA.

27. Izzard, C. S., Lochner, L. R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell Sci.*, 21. P. 129–159.

28. Knutsson A. Health disorders of shift workers // *Occupational Medicine*. 2003. Vol. 53(2). P. 103–108.

29. Lazarides, E., Weber, K. (1974). Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 71, P. 2268–2272.

30. Machesky L.M., Gould K.L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer // *Curr Opin Cell Biol*, 11(1), P. 117-21.

31. Matov A., Applegate K., Kumar P., Thoma C., Krek W., Danuser G., Wittmann T. (2010). Analysis of Microtubule Dynamic Instability Using a Plus End Growth Marker. *Nat Methods*, 7(9), P. 761-768.

32. Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope // *Scanning*, 10, P. 128–138.

33. Pelham, R. J. Jr, Wang, Y. (1999). High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate // *Mol. Biol. Cell*, 10, P. 935–945.

34. Peters RA. The Harben Lectures, 1929. Reprinted in: Peters, R. A. *Biochemical lesions and lethal synthesis*, p. 216. Pergamon Press, Oxford. 1963.

35. Petrie, R. J., Gavara, N., Chadwick, R. S., Yamada, K. M. (2012). Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J. Cell Biol*, 197, P. 439-455.

36. Ploem, J. S. (1971). A study of filters and light sources in immunofluorescence microscopy // *Ann. NY Acad. Sci*, 177, P.414–429.
37. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein // *Gene*, 111, P. 229–233.
38. Rajaratnam S.M.W., Dijk D.J., Middleton B., Stone B.M., Arendt J. (2003). Melatonin phase-shifts human circadian rhythms with no evidence of changes in the duration of endogenous melatonin secretion or the 24- h production of reproductive hormones. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9), P. 4303-4309.
39. Remak, R. (1844). *Neurologische Erläuterungen Arch. Anat. Physiol. wiss Med*, P. 463–472.
40. Rowinsky, E. K., Donehower, R. C. (1955). Paclitaxel (Taxol) *N. Engl. J. Med*, 332, P. 1004–1014.
41. Schiff, P. B., Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, P. 1561–1565.
42. Small, J.V., Celis J.E. (1978). Direct visualization of the 10-nm (100-A)-filament network in whole and enucleated cultured cells. *J. Cell Sci.*, 31, P.393-409.
43. Stout A., D'Amico S., Enzenbacher T., Ebbert P., Lowery L.A. (2014). Using plusTipTracker software to measure microtubule dynamics in *Xenopus laevis* growth cones. *J.Vis. Exp*, 7(91), E52138.
44. Svitkina T.M., Borisy G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, 145(5), P. 1009-1026.
45. Tauber, A. I. (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, 4, P. 897–901.
46. Taylor, D. L., Wang, Y. (1978). Molecular cytochemistry: incorporation of fluorescently labeled actin into living cells . *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 75, P. 857–861.
47. Telley IA, Bieling P, Surrey T. (2011). Reconstitution and quantification of dynamic microtubule end tracking in vitro using TIRF microscopy. *Methods Mol,Biol*, 777, P.127-145.
48. Weisenberg R.C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations *Science*, 177(4054), P. 1104-1105.
49. Wilson, L., and Jordan, M. A. (1995). Pharmacological probes of microtubule function. In “Microtubules” (J. S. Hyams and C. W. Lloyd, Eds.), P. 59–83, Wiley–Liss, New York.
50. Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Bro“cker, E. B., Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol*, 160, P. 267-277.
51. Wolosewick J.J., Porter K.R. (1979). Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality. *J. Cell Biol*, 82 (1), P. 114–39.
52. Zernike, F. (1955). How I discovered phase contrast. *Science*, 121, P. 345–349.
53. Zicha, D., Dunn, G. A., Brown, A. F. (1991). A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J. Cell Sci*, 99, P.769–775.