

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Н. В. Клементьева^{1✉}, О. Е. Фурман^{1,2}, А. С. Мишин^{1,3}, К. А. Лукьянов^{1,3}, Е. В. Загайнова¹

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинских технологий, Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

² Нижегородский национальный исследовательский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород

³ Лаборатория биофотоники, отдел геномики и постгеномных технологий, Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Структурные особенности организации актина и актин-связывающих белков могут служить критериями оценки агрессивности различных популяций клеток злокачественных солидных опухолей. В настоящей работе мы изучили воздействие химиотерапевтических препаратов паклитаксел и цисплатин на структуру актина и альфа-актинина клеток рака шейки матки человека HeLa Kyoto с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и микроскопии сверхвысокого разрешения с детекцией одиночных молекул. Было показано, что паклитаксел вызывает существенные нарушения структуры актинового цитоскелета опухолевых клеток, затрагивающие как актин, так и альфа-актинин: исчезновение стресс-фибрилл, сосредоточение филаментов в кортикальном слое клеток, изменения морфологии фокальных контактов. Для цисплатина удалось детектировать сниженное содержание тонких волокон актина и более компактное расположение альфа-актинина. Полученные данные позволяют рассматривать актиновый цитоскелет как дополнительную мишень противоопухолевой химиотерапии.

Ключевые слова: актин, альфа-актинин, микрофиламенты, культура клеток рака шейки матки, паклитаксел, цисплатин, флуоресцентная визуализация

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-25-00129).

Благодарности: авторы благодарят Центр коллективного пользования ИБХ РАН за предоставленное оборудование.

✉ **Для корреспонденции:** Клементьева Наталия Владимировна
603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1; nvklementieva@gmail.com

Статья поступила: 15.08.2016 **Статья принята к печати:** 25.08.2016

FLUORESCENCE IMAGING OF ACTIN CYTOSKELETON CHANGES IN CANCER CELLS UPON CHEMOTHERAPY

Klementieva NV^{1✉}, Furman OE^{1,2}, Mishin AS^{1,3}, Lukyanov KA^{1,3}, Zagaynova EV¹

¹ Research Institute of Biomedical Technologies, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

² Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod – National Research University, Nizhny Novgorod, Russia

³ Laboratory of Biophotonics, Department of Genetics and Postgenomic Technologies, M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Structural organization of actin and actin-binding proteins can be a hallmark of aggressiveness among various populations of solid tumor cells. Here, we studied the impact of chemotherapeutic drugs (paclitaxel and cisplatin) on actin and alpha-actinin structural patterns in human cervical adenocarcinoma cell culture HeLa Kyoto using total internal reflection fluorescence microscopy and single-molecule localization super-resolution microscopy. It was shown that paclitaxel causes disruption of actin cytoskeleton in cancer cells, both for actin and alpha-actinin. We observed disappearance of stress fibers, accumulation of filaments in the cell cortex and morphological changes in focal contacts. With cisplatin, we detected a lower number of thin actin bundles and more dense arrangement of alpha-actinin. Our results suggest that the actin cytoskeleton is a potential target for antitumor chemotherapy.

Keywords: actin, alpha-actinin, microfilaments, cervical carcinoma cell culture, paclitaxel, cisplatin, fluorescence imaging

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 14-25-00129).

Acknowledgement: authors thank the IBCH Core Facility for the equipment.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia Klementieva
pl. Minina i Pozharskogo, d. 10/1, Nizhny Novgorod, Russia, 603005; nvklementieva@gmail.com

Received: 15.08.2016 **Accepted:** 25.08.2016

Актин и актин-связывающие белки являются компонентами цитоскелета клетки, формирующими систему микрофиламентов. Они вовлечены во множество процессов, такие как рост, подвижность, деление клетки, регуляция транскрипции, клеточно-матриксные и межклеточные взаимодействия. Актиновый цитоскелет также участвует в сигнальных каскадах, во внутриклеточном транспорте белков и органелл [1]. В клетках постоянно идут энергозависимые процессы полимеризации и деполимеризации актина, а сборка его новых нитей (микрофиламентов) сопровождается формированием специализированных структур, таких как стресс-фибриллы, филоподии, ламеллоподии и др. Перестройки актина и актин-связывающих белков могут указывать на нарушения в работе клетки и быть признаком ее злокачественной трансформации [2]. Раковые клетки используют различные механизмы для выживания и роста опухоли, в том числе изменение адгезивных и механических свойств. Структура актинового цитоскелета может определять такие характеристики опухолевых клеток, как ригидность, подвижность и инвазивность [3].

Исследование структуры актинового цитоскелета важно для понимания механизма действия того или иного противоопухолевого препарата. Так, посредством визуализации изменений в системе актиновых волокон был продемонстрирован эффект воздействия малых интерферирующих РНК, применяемых для ингибирования пролиферации раковых клеток [4]. Характер организации актина послужил также одним из критериев восприимчивости клеток рака легкого к химиопрепаратам [5]. Кроме того, актин как потенциальный регулятор развития опухолей и метастазов может сам выступать мишенью для химиотерапии [6, 7]. Однако доступные на сегодня соединения, специфически нарушающие организацию микрофиламентов, высокотоксичны и пока не нашли применения в клинической практике.

Перспективным представляется исследование особенностей реакции актиновой сети на терапию противоопухолевыми препаратами, адаптированными для лечения онкологических больных. Злокачественные опухоли, как правило, гетерогенны, и для их успешной элиминации необходимо уничтожение самых агрессивных клеточных популяций. Показано, что в клетках, способных к формированию метастазов, наблюдаются наиболее выраженные перестройки актинового цитоскелета [8, 9]. Определение характера реорганизации актина в ответ на стандартную химиотерапию важно для обнаружения потенциально метастазирующих клеток опухоли.

Целью нашего исследования являлось изучение структурных перестроек в системе актинового цитоскелета в опухолевых клетках при воздействии противоопухолевых препаратов паклитаксела и цисплатина, используемых в клинической практике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на клеточной линии HeLa Kyoto (рак шейки матки человека). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %) (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США), глутамина (2 mM) («ПанЭко»), стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко») и пенициллина (50 ед./мл) («ПанЭко») в условиях содержания в воздухе 5 % CO₂ и при температуре 37 °С.

Применяли препараты паклитаксел («Таксол», Bristol-Myers Squibb, США) и цисплатин («Цисплатин-Тева», Teva Pharmachemie, Нидерланды). В качестве контрольного соединения использовали цитохалазин D (Enzo Life Sciences, США) — ингибитор полимеризации актина. Для вычисления полулетальных концентраций препаратов использовали МТТ-тест [10], время инкубации клеток с препаратом — 24 ч. Показания оптической плотности красителя считывали на планшетном фотометре Synergy Mx (BioTek, США) на длинах волн 570 и 630 нм.

Клетки высевали на чашки со стеклянным дном диаметром 35 мм FluoroDish (WPI, США) в количестве 200 тыс. На следующие сутки в опытных чашках производили замену питательной среды на среду с препаратом в полулетальной концентрации и инкубировали культуру в течение 24 ч в стандартных условиях. Контролем служили клетки без добавления препарата. После этого клетки единожды промывали раствором DPBS («ПанЭко»), добавляли 1 мл среды FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) и окрашивали.

Для мечения актина использовали краситель SiR-actin (Spirochrome, Швейцария) в концентрации 0,5 мкМ, для мечения ядер — краситель Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) в концентрации 5 мкг/мл. Окрашивали в течение 30 мин, после чего проводили флуоресцентную визуализацию. SiR-actin [11] обеспечивал мечение эндогенного актина в живых клетках без фиксации и отмывок образца после окрашивания. Эксперимент включал микросъемку контрольного образца и образцов (по одному) с паклитакселом, цисплатином и цитохалазином D. Каждый образец оценивали в 10 полях зрения.

Для мечения альфа-актина использовали плазмидный вектор pTagRFP-actinin («Евроген», Россия). Клетки были временно трансфицированы им с помощью реагента X-tremeGene 9 (Roche, США) по методике производителя. Спустя сутки после трансфекции клетки инкубировали с препаратом в полулетальной концентрации в течение 24 ч. Перед проведением флуоресцентной микроскопии клетки промывали раствором DPBS и добавляли 1 мл среды MEM (Sigma-Aldrich, США). Исследовали контрольный образец и опытные образцы (по одному) с паклитакселом, цисплатином и цитохалазином D. Каждый образец оценивали в 5–6 полях зрения.

Флуоресцентный имиджинг осуществляли на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония), оснащенном объективом со стократным увеличением, масляной иммерсией Apo TIRF/1.49 (Nikon) и EM-CCD-камерой iXon3 DU-897 (Andor, Великобритания). Для детекции сигнала флуоресценции красителя SiR-actin использовали широкополосный фильтр C-NSTORM QUAD (Nikon) и лазер с длиной волны 640 нм (плотность мощности — 7,8 Вт/см²). Для красителя Hoechst 33342 использовали флуоресцентную лампу Nikon Intensilight и фильтр флуоресценции BV-2A. Актиновый цитоскелет визуализировали с помощью микроскопии полного внутреннего отражения (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy, TIRF). Выбор TIRF-режима был обусловлен тем, что он позволяет наблюдать примембранный слой клетки толщиной не более 200 нм, обеспечивая наилучшее соотношение сигнал/шум, и оптимален при проведении локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения с детекцией одиночных молекул. Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Fiji [12]. Микроскопию сверхвысокого разрешения на основе TagRFP проводили по методике, описанной нами ранее [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования мы определили концентрации препаратов, необходимые для проведения химиотерапии выбранной культуры клеток. По результатам МТТ-теста были построены кривые зависимости жизнеспособности клеток HeLa Kyoto от концентрации препаратов, по которым мы рассчитали их полулетальные концентрации: для паклитаксела — 45 нМ для цисплатина — 7 мкМ, для цитохалазина D — 12,5 мкМ.

Затем мы оценили эффекты воздействия препаратов на структуру актинового цитоскелета в опухолевых клетках с помощью флуоресцентной микроскопии. На рис. 1А показаны типичные клетки HeLa Kyoto в контрольном образце, окрашенные SiR-actin. Актиновый скелет в них характеризуется наличием богатой сети из протяженных стресс-фибрилл, пронизывающих цитоплазму в разных направлениях, имеются выпячивания на ведущем крае клетки с высокой плотностью актина в кортикальном слое, а также детектируется паутинообразная сеть из тонких микрофиламентов, заполняющих всю цитоплазму. В образце с цитохалазином D типичные стресс-фибриллы в клетках не наблюдаются. Для их сборки требуется формирование филаментов актина из мономерного белка, а в присутствии цитохалазина D этот процесс затруднен. Характерно наличие равномерно рассредоточенных по цитоплазме коротких филаментов и точечных структур актина. Только во внешнем примембранном слое наблюдаются редкие остатки стресс-фибрилл. Клетки имеют более округлую форму и лишены выступов на ведущем крае (рис. 2Б). В образце с цисплатином значительные нарушения в организации микрофиламентов не обнаруживаются. Отмечается типичная для клеток HeLa Kyoto неправильная форма с множеством стресс-фибрилл, свойственных распластанным клеткам. Вместе с тем, в отличие от контрольного образца, после воздействия цисплатина отсутствуют сеть из тонких микрофиламентов и скопления актина в кортикальном слое клеток (рис. 1В). В образце с паклитакселом детектируются более сильные перестройки актинового

цитоскелета, чем в образце с цисплатином. Так, клетки практически лишены выпячиваний цитоплазмы и демонстрируют тенденцию к ошариванию. Актин сосредоточен в основном в кортикальном слое. В клетках выявляются редкие волокна микрофиламентов при полном отсутствии стресс-фибрилл (рис. 1Г). Следует отметить, что большинство клеток имеет многоядерный фенотип.

Более тонкую оценку изменений в системе микрофиламентов провели с помощью флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, основанной на локализации одиночных молекул флуорофора. Визуализировали ультраструктуру актин-связывающего белка альфа-актинина. В клетках контрольного образца наблюдается обычное распределение альфа-актинина, в норме расположенного вдоль актиновых пучков. Филаменты актин-связывающего белка заполняют всю цитоплазму, формируя небольшие утолщения в области фокальных контактов (рис. 2А). Под воздействием цитохалазина D наблюдается полная разборка волокон альфа-актинина, что согласуется с характером агрегации актина и утратой протяженных стресс-фибрилл. Детектируются точечные (диаметром 200–250 нм) структуры альфа-актинина, равномерно распределенные по клетке (рис. 2Б). После воздействия паклитаксела клетки приобретают округлую форму, теряют выпячивания и стресс-фибриллы. Альфа-актинин концентрируется в кортикальном слое клеток. На субдифракционном изображении видно существенное утолщение фибрилл в области фокальных контактов и их сближение между собой (рис. 2В). Наименее выраженные изменения отмечаются после химиотерапии цисплатином. Клетки неправильной формы имеют характерную исчерченность цитоскелета (рис. 2Г). Среди структурных изменений можно отметить более плотную упаковку волокон альфа-актинина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе был исследован эффект воздействия химиотерапевтических препаратов паклитаксела и цисплатина на структуру актинового цитоскелета.

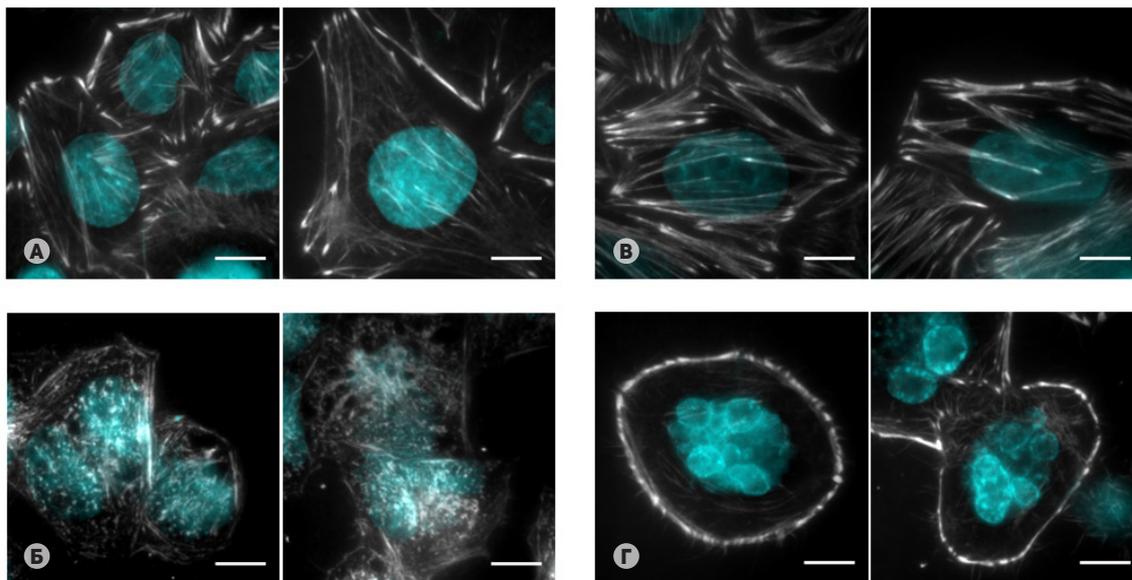


Рис. 1. Эффекты воздействия химиотерапевтических агентов в полулетальных концентрациях на структуру актина в культуре клеток рака шейки матки HeLa Kyoto. (А) Клетки контрольного образца. (Б) Клетки после инкубации с цитохалазином D. (В) Клетки после инкубации с цисплатином. (Г) Клетки после инкубации с паклитакселом

Флуоресцентная TIRF-микроскопия, окраска красителями SiR-actin (Spirochrome, Швейцария) и Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США). Актиновый цитоскелет и ядра показаны серым и голубым соответственно. Масштабная линейка — 10 мкм.

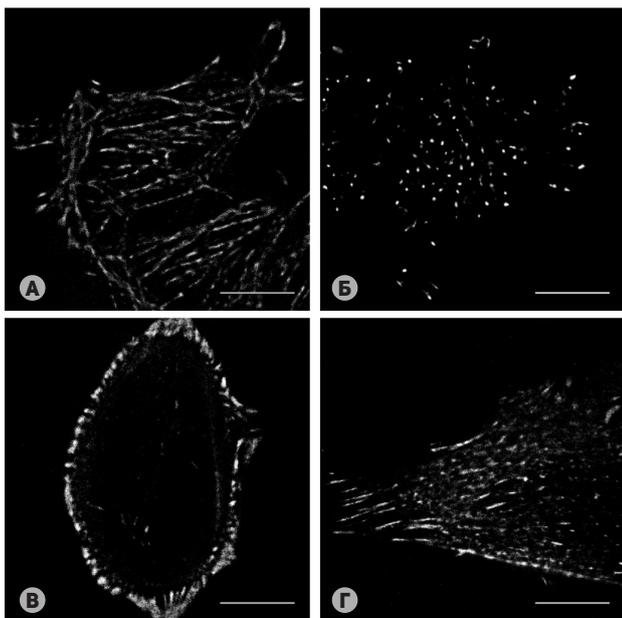


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения с детекцией одиночных молекул альфа-актина, меченного флуоресцентным белком TagRFP, в культуре клеток рака шейки матки HeLa Kyoto. **(А)** Клетки контрольного образца. **(Б)** Клетки после инкубации с цитохалазином D. **(В)** Клетки после инкубации с паклитакселом. **(Г)** Клетки после инкубации с цисплатином.

Все химиотерапевтические агенты добавляли в полулетальных концентрациях. Масштабная линейка — 10 мкм.

Механизм действия паклитаксела, относящегося к классу таксанов, связывают с блокированием работы тубулинового аппарата клетки: стабилизация процесса сборки мономеров бета-тубулина приводит к остановке пролиферации клеток. В работе Murakami и соавт. [14] показано, что терапия соединениями таксанового ряда способствует снижению содержания альфа-актина в стромальных клетках опухоли молочной железы. Наши данные свидетельствуют о том, что, помимо микротрубочек, в реакции клеток рака шейки матки на лечение паклитакселом активно задействована система микрофиламентов. Обнаруженная нами значительная реорганизация актина (разреженные тонкие изогнутые филаменты в отсутствие стресс-фибрилл) согласуется с результатами, полученными на линии клеток рака молочной железы MCF7 при воздействии таксанов [15].

Интересно, что в большинстве клеток после инкубации культуры с паклитакселом мы наблюдали многоядерность. Показано, что связывание химиопрепарата с бета-тубулином ведет к аккумуляции клеток в фазе G2/M, полиплоидии и апоптозу [16, 17]. Перестройки в актиновом цитоскелете, которые мы детектировали в клеточной культуре HeLa Kyoto, также косвенно могут быть связаны с многоядерностью. Известно, что в нормальных многоядерных клетках, например в остеокластах, актин претерпевает значительные изменения и представлен в основном точечными структурами, формирующими подосомы [18]. Пока-

зано, что в культуре клеток-производных HeLa наблюдаются гигантские многоядерные клетки, в которых актиновый цитоскелет сосредоточен в микрошипиках на периферии клетки и точечных структурах, подобных подосомам [19].

Что касается цисплатина, то пока не установлено прямой связи его терапевтического эффекта с влиянием на актиновые волокна. Механизм действия цисплатина объясняют способностью ионов платины в его составе образовывать сшивки с пуриновыми основаниями ДНК. Это препятствует репарации ДНК, вызывая ее повреждение, которые индуцируют апоптоз в раковых клетках [20]. Тем не менее, существует ряд работ по проблеме развития устойчивости опухолевых клеток к данному препарату и роли актина в этом процессе. Так, у цисплатин-резистентных клеток отмечается изменение уровня экспрессии различных белков цитоскелета, в том числе актина, проявляющееся в нарушениях свойственной опухолевым клеткам динамики актин-филаминной системы [21, 22]. Sharma и соавт. сообщили, что в клетках рака яичника OVCAR5, резистентных к цисплатину, наблюдаются значительные отличия в организации и механических свойствах актиновых волокон по сравнению с обычной культурой [23]. В этой работе для визуализации актина применили микроскопию сверхвысокого разрешения, что позволило выявить различия на уровне субдифракционных структур, таких как индивидуальные пучки и уплотнения межклеточных контактов. Согласно полученным нами результатам, цисплатин имеет менее выраженное по сравнению с паклитакселом воздействие на актиновый скелет клеток HeLa Kyoto. Вместе с тем данные микроскопии сверхвысокого разрешения указывают на изменение плотности упаковки микрофиламентов, что потенциально может приводить к затруднению функционирования опухолевой клетки.

ВЫВОДЫ

В данной работе с помощью флуоресцентной микроскопии мы изучили влияние двух химиопрепаратов — паклитаксела и цисплатина — на актиновый цитоскелет клеток рака шейки матки HeLa Kyoto. Было обнаружено, что паклитаксел вызывает сильную перестройку актинового цитоскелета, выражающуюся в разборке стресс-фибрилл, сосредоточении актина в кортикальном слое клеток, утолщении и сближении фокальных контактов. Цисплатин вызывал меньшие изменения: некоторое снижение количества тонких пучков микрофиламентов и более плотную упаковку альфа-актина. Обнаруженные нами структурные изменения актинового цитоскелета под действием препаратов, не имеющих против него специфической направленности, могут указывать на наличие дополнительной клеточной мишени в борьбе с опухолью. Возможно, такая реорганизация системы микрофиламентов влияет на инвазивные и метастатические свойства клеток солидной опухоли *in vivo*. Мы планируем продолжить исследование влияния химиотерапии на структуру актинового цитоскелета на мышиных опухолевых моделях.

Литература

1. Bezanilla M, Gladfelter AS, Kovar DR, Wei-Lih L. Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *J Cell Biol.* 2015; May 11; 209 (3): 329–37.
2. Шутова М. С., Александрова А. Ю. Сравнительное исследование

распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Роль полимеризации микрофиламентов и актин-миозинового сокращения. *Цитология.* 2010; 52 (1): 41–51.

3. Stevenson RP, Veltman D, Machesky LM. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *J Cell Sci.* 2012; 125 (Pt 5): 1073–9.
4. Groth-Pedersen L, Aits S, Corcelle-Termeau E, Petersen NHT, Nylandsted J, Jäättelä M. Identification of Cytoskeleton-Associated Proteins Essential for Lysosomal Stability and Survival of Human Cancer Cells. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e45381.
5. Chen QY, Xu LQ, Jiao DM, Yao QH, Wang YY, Hu HZ, et al. Silencing of Rac1 modifies lung cancer cell migration, invasion and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity to antitumor drugs. *Int J Mol Med.* 2011 Nov; 28 (5): 769–76.
6. Bonello TT, Stehn JR, Gunning PW. New approaches to targeting the actin cytoskeleton for chemotherapy. *Future Med Chem.* 2009 Oct; 1 (7): 1311–31.
7. Brayford S, Schevzov G, Vos J, Gunning P. The Role of the Actin Cytoskeleton in Cancer and Its Potential Use as a Therapeutic Target. В книге: Schatten H, editor. *The Cytoskeleton in Health and Disease.* Luxemburg: Springer Science + Business Media; 2015. p. 373–91.
8. Gross SR. Actin binding proteins: their ups and downs in metastatic life. *Cell Adh Migr.* 2013 Mar–Apr; 7 (2): 199–213.
9. Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11 (3): 177–87.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16; 65 (1–2): 55–63.
11. Lukinavičius G, Reymond L, D'Este E, Masharina A, Göttfert F, Ta H, et al. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods.* 2014 Jul; 11 (7): 731–3.
12. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jun; 9 (7): 676–82.
13. Klementieva NV, Bozhanova NG, Mishina NM, Zagaynova EV, Lukyanov KA, Mishin AS. Common fluorescent proteins for single-molecule localization microscopy. *Proc SPIE.* 2015 Jul; 9536 (953609): [6 p.] Доступно по ссылке: <http://dx.doi.org/10.1117/12.2184924>.
14. Murakami M, Ernsting MJ, Undzys E, Holwell N, Foltz WD, Li SD. Docetaxel conjugate nanoparticles that target α -smooth muscle actin-expressing stromal cells suppress breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013 Aug 1; 73 (15): 4862–71.
15. Rosenblum MD, Shivers RR. "Rings" of F-actin form around the nucleus in cultured human MCF7 adenocarcinoma cells upon exposure to both taxol and taxotere. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 2000; 125 (1): 121–31.
16. Bottone MG, Soldani C, Tognon G, Gorrini C, Lazzè MC, Brison O, et al. Multiple effects of paclitaxel are modulated by a high c-myc amplification level. *Exp Cell Res.* 2003 Oct 15; 290 (1): 49–59.
17. Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res.* 1998 Aug 15; 58 (16): 3620–6.
18. Takito J, Otsuka H, Yanagisawa N, Arai H, Shiga M, Inoue M, et al. Regulation of Osteoclast Multinucleation by the Actin Cytoskeleton Signaling Network. *J Cell Physiol.* 2015 Feb; 230 (2): 395–405.
19. Dutartre H, Davoust J, Gorvel JP, Chavrier P. Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J Cell Sci.* 1996 Feb; 109 (Pt 2): 367–77.
20. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364–78.
21. Shen DW, Liang XJ, Gawinowicz MA, Gottesman MM. Identification of cytoskeletal [14C]carboplatin-binding proteins reveals reduced expression and disorganization of actin and filamin in cisplatin-resistant cell lines. *Mol Pharmacol.* 2004 Oct; 66 (4): 789–93.
22. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul; 64 (3): 706–21.
23. Sharma S, Santiskulvong C, Bentolilla LA, Rao J, Dorigo O, Gimzewski JK. Correlative nanomechanical profiling with super-resolution F-actin imaging reveals novel insights into mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Nanomedicine.* 2012 Jul; 8 (5): 757–66.

References

1. Bezanilla M, Gladfelter AS, Kovar DR, Wei-Lih L. Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *J Cell Biol.* 2015; May 11; 209 (3): 329–37.
2. Shutova MS, Alexandrova AY. [Comparative research of normal and transformed fibroblast spreading. The role of microfilament polymerization and actin-myosin contractility]. *Tsitologiya.* 2010; 52 (1): 41–51. Russian.
3. Stevenson RP, Veltman D, Machesky LM. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *J Cell Sci.* 2012; 125 (Pt 5): 1073–9.
4. Groth-Pedersen L, Aits S, Corcelle-Termeau E, Petersen NHT, Nylandsted J, Jäättelä M. Identification of Cytoskeleton-Associated Proteins Essential for Lysosomal Stability and Survival of Human Cancer Cells. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e45381.
5. Chen QY, Xu LQ, Jiao DM, Yao QH, Wang YY, Hu HZ, et al. Silencing of Rac1 modifies lung cancer cell migration, invasion and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity to antitumor drugs. *Int J Mol Med.* 2011 Nov; 28 (5): 769–76.
6. Bonello TT, Stehn JR, Gunning PW. New approaches to targeting the actin cytoskeleton for chemotherapy. *Future Med Chem.* 2009 Oct; 1 (7): 1311–31.
7. Brayford S, Schevzov G, Vos J, Gunning P. The Role of the Actin Cytoskeleton in Cancer and Its Potential Use as a Therapeutic Target. In: Schatten H, editor. *The Cytoskeleton in Health and Disease.* Luxemburg: Springer Science + Business Media; 2015. p. 373–91.
8. Gross SR. Actin binding proteins: their ups and downs in metastatic life. *Cell Adh Migr.* 2013 Mar–Apr; 7 (2): 199–213.
9. Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11 (3): 177–87.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16; 65 (1–2): 55–63.
11. Lukinavičius G, Reymond L, D'Este E, Masharina A, Göttfert F, Ta H, et al. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods.* 2014 Jul; 11 (7): 731–3.
12. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jun; 9 (7): 676–82.
13. Klementieva NV, Bozhanova NG, Mishina NM, Zagaynova EV, Lukyanov KA, Mishin AS. Common fluorescent proteins for single-molecule localization microscopy. *Proc SPIE.* 2015 Jul; 9536 (953609): [6 p.] Available from: <http://dx.doi.org/10.1117/12.2184924>.
14. Murakami M, Ernsting MJ, Undzys E, Holwell N, Foltz WD, Li SD. Docetaxel conjugate nanoparticles that target α -smooth muscle actin-expressing stromal cells suppress breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013 Aug 1; 73 (15): 4862–71.
15. Rosenblum MD, Shivers RR. "Rings" of F-actin form around the nucleus in cultured human MCF7 adenocarcinoma cells upon exposure to both taxol and taxotere. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 2000; 125 (1): 121–31.
16. Bottone MG, Soldani C, Tognon G, Gorrini C, Lazzè MC, Brison O, et al. Multiple effects of paclitaxel are modulated by a high c-myc amplification level. *Exp Cell Res.* 2003 Oct 15; 290 (1): 49–59.

17. Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res.* 1998 Aug 15; 58 (16): 3620–6.
18. Takito J, Otsuka H, Yanagisawa N, Arai H, Shiga M, Inoue M, et al. Regulation of Osteoclast Multinucleation by the Actin Cytoskeleton Signaling Network. *J Cell Physiol.* 2015 Feb; 230 (2): 395–405.
19. Dutartre H, Davoust J, Gorvel JP, Chavier P. Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J Cell Sci.* 1996 Feb; 109 (Pt 2): 367–77.
20. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364–78.
21. Shen DW, Liang XJ, Gawinowicz MA, Gottesman MM. Identification of cytoskeletal [14C]carboplatin-binding proteins reveals reduced expression and disorganization of actin and filamin in cisplatin-resistant cell lines. *Mol Pharmacol.* 2004 Oct; 66 (4): 789–93.
22. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul; 64 (3): 706–21.
23. Sharma S, Santiskulvong C, Bentolila LA, Rao J, Dorigo O, Gimzewski JK. Correlative nanomechanical profiling with super-resolution F-actin imaging reveals novel insights into mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Nanomedicine.* 2012 Jul; 8 (5): 757–66.