РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН

на правах рукописи

БОБКОВ Данила Евгеньевич

ТРОПОМИОЗИН И АЛЬФА-АКТИНИН-4 В СОСТАВЕ МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ, НЕ СВЯЗАННЫХ СО СТРУКТУРАМИ ЦИТОСКЕЛЕТА

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Научный руководитель: д.б.н., проф. Пинаев Г.П. Институт цитологии РАН

Санкт-Петербург 2010 г.

оглавление

1. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ4
2. ВВЕДЕНИЕ
3. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ
4.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ
4.1 Организация актинового цитоскелета в культивируемых клетках10
4.1.1. Основные типы актиновых структур11
4.1.2. Роль актин-связывающих белков в формировании
актиновых структур12
4.1.3 Комплексы адгезии. Связь актиновых структур и сигнальных
молекул13
4.2. Регуляция процессов реорганизации актинового цитосклета14
4.2.1. Перестройки актинового цитоскелета клеток, распластанных на
иммобилизованных лигандах15
4.2.2. Регуляция структуры актинового цитоскелета малыми ГТФ-азами16
4.2.3. Эффект растворимых факторов на динамику системы микрофиламентов
клеток, распластанных на иммобилизованных лигандах
4.2.4. Влияние уровня активных форм кислорода на процессы реорганизации
актинового цитоскелета21
4.3. Структура и функции тропомиозина27
4.4. Альфа-актинин
4.4.1. Структура α-актинина29
4.4.2. Изоформы актинина и их субклеточная локализация
4.4.3. Участие α-актинина в адгезии
4.4.4. Образование комплексов с другими белками
4.4.5. Участие комплексов альфа-актинина в сигнальных системах
4.5. Транскрипционный фактор NF-кВ46
4.5.1. Регуляция активности транскрипционного комплекса NF-кВ47
4.5.2. Сигнальные каскады, вовлеченные в активацию NF-кВ
4.5.3. Участие в адгезии и связь с цитоскелетом
5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ53
5.1. Культивирование клеток53
5.2. Конфокальная иммунофлуоресцентная микроскопия
5.3 Экстракция цитоплазматических белковых комплексов
5.4 Разделение белковых экстрактов методом гель-хроматографии54

5.5. Предобработка клеток формальдегидом55
5.6. Определение состава выделенных цитоплазматических белковых комплексов
5.7. Идентификация белков методом масс-спектрометрии56
5.8. Обработка клеток биологически активными молекулами
5.9. Определение внутриклеточного содержания активных форм кислорода58
6. РЕЗУЛЬТАТЫ60
6.1. Разработка метода выделения цитоплазматических мультимолекулярных
белковых комплексов без нарушения структуры актинового цитоскелета60
6.2. Определение состава мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих
тропомиозин
6.3. Определение состава мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих
альфа-актинин-4
6.4. Изменение состава α-актинин-4 -содержащих комплексов в процессе
реорганизации цитоскелета, вызванной различными сигнальными агентами75
6.5. Корреляция между содержанием в цитозоле тропомиозин-содержащих
комплексов и степенью развитости системы актиновых микрофиламентов77
6.6. Влияние трихостатина на реорганизацию актинового цитоскелета и
распределение тропомиозин-содержащих комплексов
6.7. Изменение уровня активных форм кислорода в процессе реорганизации
актинового цитоскелета
7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ
8. ВЫВОДЫ
9. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
10. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ101
11. ПРИЛОЖЕНИЕ
12. БЛАГОДАРНОСТИ130

1. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

CART	cytoskeleton-associated recycling or transport
CH1	calponin homology domain 1
CH2	calponin homology domain 2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Ep-CAM	epithelium-specific cell-cell adhesion molecule
FAK	focal adhesion kinase
FITC	fluorescein isothiocyanate
GFP	green fluorescent protein
GRK	G protein-coupled receptor kinase
HDAC7	histone deacetylase 7
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ICAM-2	intercellular adhesion molecule 2
IKK	IkB Kinase
JNK	jun-N-terminal kinase
LPA	лизофосфатидиловая кислота
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase scaffolding proteins
MAP	mitogen-activated protein
MEKK1	MEK kinase 1
NF-κB	nuclear factor – κB
NIK	NF-κB-inducing kinase
NLS	nuclear localization signal
NMDA	N-methyl-D-aspartate
OTZ	2,4-окситиазолидин
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride

	5
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
SHR	spectrin homology repeats
TBS	Tris-buffered saline
TNF-α	tumor necrosis factor – α
TRAF2	TNF receptor associated factor
TRITC	tetramethylrhodamine isothiocyanate
YFP	yellow fluorescent protein
ZO-1	zonula occludens-1
АФК	активные формы кислорода
БСА	бычий сывороточный альбумин
БТШ	белок теплового шока
ЭФР	эпидермальный фактор роста

2. ВВЕДЕНИЕ

При действии на клетки в культуре различных биологически активных молекул, таких как эпидермальный фактор роста, фактор некроза опухоли – α, лизофосфатидиловая кислота и других биологически активных молекул, происходит активация транскрипционных факторов, в том числе перемещение рб5субъединицы NF-кВ из цитоплазмы в ядро, изменение экспрессии ряда генов и прочие характерные для проведения сигнала события. Одновременно с этим происходит быстрая реорганизация актинового цитоскелета. Опыт показывает, что практически любые биологически активные агенты при взаимодействии с поверхностными рецепторами клетки вызывают подобный эффект.

Ранее в нашей лаборатории было показано на клетках разного происхождения, что под действием внешних факторов в течение 10-15 мин происходит последовательная разборка системы актиновых структур с последующим восстановлением исходной организации актинового цитоскелета через 30-40 мин. Механизмы таких перестроек цитоскелета до настоящего времени не установлены. Специфичность же восстанавливаемых структур, по-видимому, определяется характером внеклеточного матрикса на котором распластаны клетки. Также остаётся неясным, связаны ли между собой сигнальные события и процессы цитоскелетных перестроек, и если связаны, то каким образом такая связь может осуществляться. Так как при действии различных агентов происходят аналогичные перестройки у клеток разного происхождения, по-видимому, должны существовать универсальные механизмы, регулирующие этот процесс.

При изучении процессов реорганизации цитоскелета было обнаружено, что цитоскелетные белки, которые обычно находятся в составе актин-содержащих структур, выявляются и в цитоплазме в виде отдельных независимых частиц. К таким белкам относятся, в частности, актин-связывающие белки α-актинин-4 и тропомиозин, которые по данным иммунофлуоресценции выявляются В цитоплазме в виде крупных белковых комплексов, не связанных с актиновыми структурами. Функция таких комплексов неизвестна. В литературе высказывается предположение, о том, что эти комплексы вовлечены в процессы реорганизации цитоскелета, а может быть, участвуют и в процессе проведения сигнала. Для выявления их предполагаемых функций, прежде всего надо удостовериться, что

такие мультимолекулярные комплексы действительно существуют, затем определить их белковый состав, а также установить, изменяется ли их состав и распределение в клетке в процессе реорганизации цитоскелета под действием различных внешних индукторов.

3. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель данной работы состояла в выделении из цитоплазмы культивируемых клеток мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих тропомиозин и αактинин-4, определении их состава и возможного его изменения при перестройках цитоскелета под действием различных индукторов.

Для достижения поставленной цели нужно было решить следующие задачи:

- Разработать метод выделения из цитозоля мультимолекулярных белковых комплексов без полного разрушения культивируемых клеток и нарушения структур актинового цитоскелета.
- Провести анализ белкового состава мультимолекулярных комплексов, содержащих α-актинин-4 и тропомиозин.
- Установить, изменяется ли количество и состав этих комплексов в процессе реорганизации актинового цитоскелета под действием эпидермального фактора роста и других биологически активных молекул (трихостатина А, лизофосфатидиловой кислоты, фактора некроза опухоли – α).

Основные положения, выносимые на защиту

- Разработан новый метод выделения цитоплазматических мультимолекулярных белковых комплексов без разрушения структур актинового цитоскелета.
- Установлено, что актин-связывающие белки тропомиозин и α-актинин-4 могут существовать не только в структурах цитоскелета, но и в составе не связанных с ним мультимолекулярных комплексов.
- З. Показано, что в комплексы, содержащие α-актинин-4, входят также p65субъединица транскрипционного фактора NF-кВ, белки теплового шока hsp70 и hsp90, а также pяд других белков – актин, миозин 9, спектрин, плектин и кератины. Состав этих комплексов изменяется при действии на клетки эпидермального фактора роста и фактора некроза опухоли- α.
- 4. В комплексах, содержащих тропомиозин, выявлены p65 субъединица NF-kB, hsp70, hsp90 и миозин 9.
- 5. Установлено, что при действии на клетки ростовых факторов и других внешних лигандов, вызывающих быстрые перестройки цитоскелета, происходят изменения количественного содержания и состава исследуемых белковых комплексов.
- 6. Совокупность полученных данных приводит к заключению о том, что цитоплазматические мультимолекулярные комплексы могут принимать участие в процессах реорганизации цитоскелета и передачи внутриклеточных сигналов.

4. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

4.1 Организация актинового цитоскелета в культивируемых клетках

Актиновый цитоскелет - это сложная система актиновых микрофиламентов, организованных в разные структуры. В процессе многолетних исследований сложилось общепринятое представление о том, что он принимает участие и обеспечивает осуществление ряда важных клеточных процессов. К ним относят поддержание формы клетки, ее миграцию, взаимодействие с субстратом и с другими клетками, цитокинез, процессы эндоцитоза и экзоцитоза и, наконец, участие в проведении внутриклеточного сигнала и регуляции экспрессии генов (Гусев, 2001; Olson, Nordheim, 2010; Small et al., 1998, 2005). Участие в разнообразных процессах обеспечивается разнообразием структур образованных системой актиновых микрофиламентов распределенных в разных участках цитоплазвы с помощью специальных для каждого случая наборов актинсвязывающих белков. Распределение этих структур в клетке и характер их организации позволяет выполнять вышепенечисленные многообразные функции. В мышечных клетках актиновые филаменты участвуют в образовании миофибрилл. В немышечных клетках актиновые филаменты образуют стресс-фибриллы, необходимые для движения клетки и поддержания клеточной архитектуры, а также плотную кортикальную сеть, участвующую в образовании филоподий и микроворсинок. Актиновые структуры клетки очень динамичны. Например, при движении клетки. В кортикальной цитоплазме происходит постоянное динамическое изменение вязкости, которое отражает постоянно происходящую деполимеризацию и полимеризацию актина под мембраной. Образование сложных надмолекулярных актиновых структур в строго определённых компартментах клетки требует наличия системы регуляции, основу которой составляют актинсвязывающие белки.

Состояние цитоскелета клеток, находящихся в составе ткани многоклеточного организма, зависит от сложной комбинации биологически активных молекул, взаимодействующих с поверхностными рецепторами. В культивируемых клетках цитоскелет формируется в процессе распластывания на субстрате и может зависеть от природы субстрата, от состава питательной среды, плотности культуры и

факторов сыворотки крови. Таким образом, хотя клетки в культуре представляют собой упрощенную модель их естественного состояния в животном организме, цитоскелет этих клеток также находится под воздействием сложного комплекса факторов и постоянно изменяется.

4.1.1. Основные типы актиновых структур

Актиновый цитоскелет В немышечных клетках сложную имеет пространственную организацию, состоящую из ряда актин-содержащих структур, характерную для каждого типа клеток. Вместе с тем, все разнообразие наблюдаемых вариантов пространственной организации системы микрофиламентов является результатом взаимодействия фибриллярного актина с разными сочетаниями определеных актин-сыязывающих белков (Small et al., 1998). К актин-содержащим структурам цитоскелета следует отнести:

 Стресс фибриллы - пучки актиновых филаментов с противоположной полярностью. Миозин и α-актинин распределены вдоль стресс фибрилл упорядоченным образом: участки, обогащенные миозином, чередуются с участками, обогащенными α-актинином;

2) Пространственная сеть микрофиламентов. Присутствует в кортексе многих типов животных клеток. Состоит из филаментов, пересекающих друг друга под разными углами. Плотность, а так же степень упорядоченности может варьировать в различных частях одной и той же клетки;

 Микрофиламенты филоподий и микроворсинок - пучки актиновых филаментов с одинаковой полярностью;

4) Арки дугообразные пучки актиновых филаментов С противоположной полярностью на дорзальной поверхности клетки, формирующиеся У основания ламеллоподии И осуществляющие центростремительное перемещение поверхностных рецепторов.

В зависимости от типа клетки и условий внешней среды соотношение между разными группами структур может существенно меняться, что приводит к изменению пространственной организации цитоскелета и соответствующим различиям в форме и подвижности клетки. Все многообразие актиновых структур клетки формируется на основе полимеризации мономеров актина в одиночные филаменты с последующим формированием структур высшего порядка при участии различных актин-связывающих белков на всех этапах этого процесса (Matsudaira, 1994; Theriot, 1994; Puius et al., 1998; Schmidt and Hall, 1998).

4.1.2. Роль актин-связывающих белков в формировании актиновых структур

В немышечных клетках в состав актиновых структур помимо основных структурных элементов актина входит большое число актин-связывающих белков, определяющих их организацию (Winder and Ayscough, 2005). Многие из них существуют одновременно В двух различных взаимообращаемых конформационных состояниях: свободные молекулы находятся в равновесии с другими белками, связанными с филаментами. Благодаря этому может быть достигнута быстрая и эффективная реорганизация системы актиновых филаментов в различных районах клетки на разных этапах клеточного цикла и, например, в ответ на действие внешнего сигнала (Jockusch and Hinssen, 1996). Способность к взаимодействию актин-связывающих белков может меняться под влиянием ряда регуляторных молекул, таких как Ca²⁺ или компоненты фосфоинозитольного цикла, а также под действием протеинкиназ (Janmey, 1994).

Организация актиновых полимеров В сеть микрофиламентов осуществляется при помощи семейства белков, включающего α-актинин, филамин и фимбрин (Hartwig and Kwiatkowski, 1991). Существует несколько изоформ аактинина, связывающих актиновые филаменты в параллельно оганизованные пучки или приводящих к образованию сети актиновых филаментов. Постоянное присутствие α-актинина в фокальных контактах, Z-дисках, стресс фибриллах и сократительных пучках, связанных с плотными фокальными контактами, указывает на его участие как в формировании актиновых структур, так и в процессах клеточной адгезии (Matsudaira, 1994). Сходными свойствами обладают также спектрин, фодрин (неэритроцитарный спектрин) и дистрофин. Спектрин является основой для формирования актиновых филаментов в кортикальной области, а также путем взаимодействия с анкирином связывает актиновые структуры с плазматической мембраной. В последнее время появились данные о наличии во всех эукариотических клетках комплекса актиноподобных белков Arp2/Arp3,

которые вступают во взаимодействие с латеральной поверхностью актиновых филаментов и способствуют формированию новых филаментов, отходящих от основной нити под углом в 70° (Weed and Parsons, 2001).

Для осуществления актиновым цитоскелетом множественных функций необходимо, чтобы сборка филаментов происходила не беспорядочно в цитоплазме клетки, а в строго определенных местах у клеточной мембраны. Такими сайтами нуклеации преимущественно являются мультимолекулярные комплексы фокальные и межклеточные контакты, осуществляющие связь между внешней средой, плазматической мембраной и актиновым цитоскелетом. Компонентами фокальной адгезии являются рецепторы интегринового типа, взаимодействующие одним концом с внеклеточным матриксом, а другим с комплексом подмембранных белков, включая талин, винкулин, α-актинин, паксилин, тензин, зиксин и киназу фокальных контактов (FAK) (Jockusch et al., 1995, Ben-Ze'ev, 1997). Через плотные контакты осуществляются межклеточные взаимодействия. Они образованы кластерами кадеринов, взаимодействующих со стороны цитоплазмы с винкулином, α-актинином, филамином, катенинами, и ERM белками (эзрином, радиксином, моезином) (Geiger et al., 1990, Gautreau et al., 2002). Многие из этих белков фосфоинозитол-связывающий участок и, по-видимому, содержат являются мишенями сигнальных молекул.

Таким образом, характер организации системы микрофиламентов зависит от композиции вовлеченных актин-связывающих белков, что может обеспечивать специфичность изменений в этой системе в ответ на определенное лигандрецепторное взаимодействие. В то же время точные представления обо всех функциях актин-связывающих белков, не связанных в данный момент с цитоскелетом, и о последовательности их вовлечения в процессе формирования определенных актиновых структур в настоящее время отсутствуют.

4.1.3 Комплексы адгезии. Связь актиновых структур и сигнальных молекул

Адгезия клетки к субстрату осуществляется через мультимолекулярные белковые комплексы трансмембранных адгезионных рецепторов, связанных со структурными цитоскелетными белками и сигнальными молекулами. Комплексы

клеточной адгезии активируют внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие морфологию клетки, миграцию, экспресссию генов, рост и дифференцировку. Сложность молекулярных взаимодействий в адгезионных комплексах стала очевидной в последние годы. Например, такие белки, как FAK и винкулин связываются с целым рядом белков и, помимо выполнения других функций, могут служить промежуточным звеном в осуществлении связи между различными белками. Для того, чтобы осуществлять такое множество взаимодействий, сложная сеть молекул должна быть динамичной и гетерогенной по составу. Контакты клетки с субстратом, включая фокальные контакты, обычно формируются при участии рецепторов интегринового типа. Многие внутриклеточные сигнальные ПУТИ активируются клеточной адгезией к специфическим внеклеточным молекулам. Эти процессы проведения сигнала включают фосфорилирование белков по тирозину и активацию MAP киназы, выброс Ca²⁺, изменение pH и запуск инозитольного цикла. В последние годы появилось много новых данных, свидетельствующих о разнообразии этих сигнальных путей, а также о потенциальных механизмах регуляции роста, предотвращения апоптоза, кооперативного взаимодействия между интегринами и рецепторами ростовых факторов (Yamada and Geiger, 1997; Keely et al., 1998). Точные механизмы влияния интегринов на организацию цитоскелета и индукцию сигнала в деталях еще не установлены, однако существуют общие представления о путях взаимодействия интегринов с актиновыми структурами. Ряд потенциально возможных связей и тот факт, что некоторые из них могут регулироваться фосфорилированием в результате агрегации или кластеризации интегринов, позволяет предположить состав белков, включающихся в комплексы адгезии. Прямое взаимодействие с $\beta 1$ субъединицей интегрина было показано для талина, α-актинина и FAK, связывание с цитоплазматическим доменом β2 субъединицей - для филамина и также связывание актина с цитоплазматическим доменом α2 субъединицы (Leung-Hagesteijn et al., 1994).

Взаимодействие интегринов с цитоскелетом осуществляется только после связывания с ним тем или иным лигандом лигандом. Недавние исследования с использованием шариков, покрытых лигандами или антиинтегриновыми антителами позволили проследить за ранними этапами формирования комплексов адгезии после контакта с внеклеточным матриксом. Была установлена последовательность в вовлечении различных молекул в зависимости от состояния интегринов: их кластеризации, взаимодействия с лигандом или того и другого вместе (Miyamoto et al., 1995). Так, тензин и FAK аккумулируются на цитоплазматической стороне мембраны уже после кластеризации интегринов в сопровождении ряда сигнальных молекул, включая Src, Ras, Raf и MAP киназы. Ряд актин-связывающих белков, α-актинин, талин и винкулин, включаются в комплексы адгезии также после кластеризации интегринов. Вероятно, такой формировать длительные, стабилизированные механизм позволяет клетке цитоскелетом комплексы адгезии только в случае стабильного взаимодействия с внеклеточным матриксом. Для вовлечения F-актина и паксилина в комплексы адгезии необходима также тирозинкиназная активность FAK, что обеспечивает следующий уровень регуляции в этой иерархической системе. В последние годы научное сообщество приходит к пониманию того, что ранее принятое разделение на структурные белки и сигнальные молекулы в значительной мере условно. Комплексы адгезии, содержащие цитоскелетные и другие белки, являются местами кластеризации или ассоциации не только структурных элементов цитоскелета, но и компонентов многих сигнальных путей. Образование комплексов белков может способствовать сборке структур цитоскелета с одной стороны и активации сигнальных путей с другой, при участии таких мультифункциональных молекул, как FAK, которая выполняет как механическую роль в связывании ряда сигнальных и цитоскелетных белков, так и функцию киназы (Yamada and Geiger, 1997; Guan, 2010).

Роль фосфорилирования по тирозину в образовании комплексов адгезии до конца не ясна. Ключевой механизм включает связывание SH2 доменов, присутствующих во многих сигнальных и некоторых цитоскелетных молекулах, с фосфорилированными по тирозину сайтами белков (Pawson, 1997, 2007). Это обеспечивает готовый механизм регуляции связывания одного белка с другим при участии тирозинкиназ И тирозинфосфатаз. Баланс между ЭТИМИ ДВУМЯ активностями, возможно, вовлечен в регуляцию многих важных сигнальных путей. Известно, что подавление тирозинкиназ препятствует образованию фокальных контактов (Burridge et al., 1996; Sastry et al., 2000) и что усиление

фосфорилирования по тирозину путем ингибирования фосфатаз ортованадатом или стимуляцией фосфорилирования через ЭФР- рецептор приводит к резким изменениям их структуры (Geiger et al., 1995). Другие виды фосфорилирования также имеют важное значение для процесса образования фокальных контактов. Таким образом, компоненты комплексов клеточной адгезии обладают широким спектром взаимодействий и функций, которые в кооперации участвуют в формировании актиновых структур и проведении сигнала. Комплексы адгезии могут регулироваться как снаружи, так и изнутри клетки. Так, если уровень фосфорилирования специфических компонентов или агрегация и оккупация интегринов могут модулировать цитоскелетные взаимодействия, вовлеченные в адгезию, то накопление сигнальных ферментов и субстратов в непосредственной близости, по-видимиму, приводит к фосфорилированию FAK и активации сигнальных каскадов, включая ERK и JNK пути MAP-киназного каскада (Miyamoto et al., 1995).

4.2. Регуляция процессов реорганизации актинового цитосклета

Наряду с образованием ряда структур актиновый цитоскелет является высоко динамичной системой, быстро реагирующей на внешние воздействия и на процессы, происходящие в клетке, что выражается в быстрой реорганизации его пространственной организации. Эти изменения могут затрагивать или часть существующих структур, или приводить к полной разборке цитоскелета с последующим восстановлением исходного состояния. Вместе с тем, являясь основой внутриклеточного транспорта, актиновые филаменты вместе с моторными белками играют решающую роль в клеточном делении, секреции, фагоцитозе и др. (Минин, Кулик, 2004).

Подобная пространственная реорганизация структур цитоскелета происходит, в частности, при адгезии клеток к субстрату и взаимодействии с белками внеклеточного матрикса. Причем контакт с разными белками приводит к формированию специфической организации актиновых структур для каждого образующегося лиганд-рецепторного комплекса. Сходные реорганизации цитоскелетных структур происходят при взаимодействии клеток с растворимыми ростовыми факторам другими биологически активными И молекулами,

индуцирующими различные сигнальные молекулы и запускающими экспрессию генов. В связи с этими данными, а также обнаруженным прекращением или изменением этих процессов при разборке цитоскелета под дейстием цитохалазина, возникло представление о том что актиновый цитоскелет принимает участие в проведении внутриклеточных сигналов.

4.2.1. Перестройки актинового цитоскелета клеток, распластанных на иммобилизованных лигандах

лаборатории Результаты, полученные ранее В нашей на клетках эпидермоидной карциномы человека А431, демонстрируют специфичность организации структур актинового цитоскелета, формирующихся в одних и тех же клетках при распластывании ИХ на подложках, покрытых различными имобилизованными белками внеклеточного матрикса (Арэ и др., 1997). При распластывании клеток линии А431 на фибронектине в цитоплазме клеток обнаруживаются стресс-фибриллы, на ламинине 2/4 – сеть актиновых филаментов в ламелле, и на антителах к рецептору ЭФР – сеть актиновых филаментов в филоподиях и ламеллах (Are et al., 2001). Соответствующие структуры актинового цитоскелета обнаруживаются у большинства клеток, распластанных в течение 1 ч на данных лигандах, причем, различные типы организации цитоскелета предполагают участие в их организации разных малых ГТФаз (Петухова и др., 2004). Другие исследования проводились на фибробластах (Арэ и др., 1999). Система актиновых микрофиламентов фибробластов представлена главным образом классическими стресс-фибриллами, сконцентрированными в нескольких параллельных субстрату плоскостях. При распластывании на фибронектине фибробласты теряют поляризованность, при этом стресс-фибриллы ориентированы хаотично и образуют многочисленные полигональные структуры. Фибробласты, распластанные на другом белке ВКМ - ламинине, существенно отличаются от клеток, распластанных на фибронектине и сохраняют поляризованность. При распластывании на коллагене III типа клетки принимают полигональную форму и образуют многочисленные ламеллоподии, в которых актиновый цитоскелет представлен сетью микрофиламентов (Арэ и др., 1999).

4.2.2. Регуляция структуры актинового цитоскелета малыми ГТФ-азами

До настоящего времени нет ясности в том, какие механизмы вовлечены в быстрые перестройки структур цитоскелета и каким образом цитоскелет может принимать участие в проведении сигнала. В пользу его возможного участия взаимодействии свидетельствуют многочисленные данные 0 с актинразнообразных связывающими белками сигнальных молекул, а также одновременное участие регуляторных внутриклеточных факторов, как например малых ГТФ-аз, в организации цитоскелета и в сигнальных событиях. В результате серии работ из лаборатории A. Холла (Nobes, Hall, 1995; Ridley et al., 1992) стало известно, что ключевую роль в этой регуляции играют малые ГТФазы из семейства Rho: белки Rac1, Cdc42 и RhoA. Эти небольшие по размеру белки (20- 30 кДа) находяться в одном из двух конформационных состояний- ассоциированными с ГТФ (активная форма), либо связанными с ГДФ (неактивная форма). В активном состоянии ГТФазы взаимодействуют с эффекторным белком до тех пор, пока связанный ГТФ не гидролизуется до ГДФ. Переключение между активным и неактивным состоянием ГТФаз находиться под контролем специальных факторов: активирующих (фактор обмена гуаниловых нуклеотидов, GEF), инактивирующих активирующие ГТФазы, GAP) и ингибиторов обмена (белки гуаниловах нуклеотидов (GDI), которые предохраняют неактивные ГТФазы от контакта с (Ertienne-Manneville, Hall, 2002). мембраной Общая схема регуляции внутриклеточных процессов такова, что высшие сигналы не влияют непосредственно на эффекторные элементы, а передаются сначала в общую интегрирующую систему, основными элементами которой являются Rho белки (Kjoller, Hall, 1999). Таким образом, каждый внешний сигнал преобразуются в сумму заданным образом локализованных и активированных ГТФаз. ГТФазы в свою очередь модулируют активность и локализацию своих эффекторов, порождая каскад сигналов, приводящих к реорганизации цитоскелета, и, в конечном счете, изменениям в поведении клеток (Bishop, Hall, 2000; Ridley, 2001; Etienne-Manneville, Hall, 2002).

4.2.3. Эффект растворимых факторов на динамику системы микрофиламентов клеток, распластанных на иммобилизованных лигандах.

Молекулярный механизм актиновых перестроек и роль филаментов в сигналинге сейчас интенсивно исследуется. В физиологических условиях поведение клеток определяется иммобилизованными постоянно представленными факторами, такими как белки внеклеточного матрикса и растворимые активные молекулы, а также факторы роста, гормоны и пептиды. Показано, что за прикреплением и распластыванием клеток A431 на иммобилизованных лигандах следует реорганизаия микрофиламентарной системы, которая определяется типом субстрата. Ранее в нашей лаборатории было показано, что у клеток с мало развитым актиновым цитоскелетом в течение 10 мин после действия внешних факторов цитоскелет может полностью разбираться и затем снова собираться в течение часа, образуя структуры, характерные для клеточной линии и каждого конкретного сигнального агента (рис. 1).



Рис. 1. Изменение архитектуры цитоскелета клеток A431 (вверху) и HEK 293 (внизу) при воздействии 20 мкМ LPA.Актиновый цитоскелет окрашен родаминфаллоидином.

В 3Т3 фибробластах образование филоподий, ламелл и стресс-фибрилл зависит от действия разных малых ГТФаз cdc42, rac и rho соответственно

(Machesky and Hall, 1996). Интегрин-зависимая адгезия приводит к активации p21 киназы, с последующей индукцией деятельности rac и cdc42 (Price et al., 1998). Cdc42 и rac также необходимы для формирования сайтов прикрепления к внеклеточному матриксу в макрофагах (Allen et al., 1997).

Таким образом, клеточная адгезия на различных иммобилизованных лигандах может включать активацию различных типов rho семейств малых ГТФаз с последующей специфической реорганизацией системы микрофиламентов. EGF, LPA и брадикинин активируют малые ГТФазы rac, rho, cdc42 соответственно. (Ridley et al.,1992; Ridley and Holl, 1992; Kozma et al., 1995; Bretsher and Aquado-Velasco, 1998.) Известны клеточные ответы на эти факторы посредством специфических рецепторов. Клетки A431 имеют много рецепторов к EGF (Haigler et al., 1978), а также поверхностных рецепторов к LPA и брадикинину (Van der Bend et al., 1992).

Лизофосфатидиловая кислота (LPA) имеет широкий спектр биологических эффектов. Она продуцируется тромбоцитами и высвобождается при их активации в процессе коагуляции (Gerrard and Robinson, 1989). Действие LPA является специфичным для каждого типа клеток и зависит от ее концентрации (Moolenaar, 1995). LPA активирует специфический тип рецепторов, связанных с G-белками, вызывает опосредованное фосфолипазой C мобилизацию ионов Ca^{2+} (Tigyi and Miledi, 1992), а также включает, таким образом, различные сигнальные пути. Существует как минимум 5 серпентиновых рецепторов, связанных с G-белками (GPCRs – G-protein coupled receptors) активируемых LPA. Данные рецепторы относятся к особому суперсемейству Edg (endothelial differentiation gene) или LP (lysophospholipid). G-белки лизофосфолипидных рецепторов регулируют широкий спектр внутриклеточных процессов, от быстрых морфологических изменений, до долгосрочной стимуляции пролиферации. Например, под их контролем находится поддержание Ca²⁺ гомеостаза и соответственно Ca²⁺-зависимые процессы, перестройки цитоскелета, пролиферация, миграция и адгезия. Эффектом сигнальных путей, активируемых LPA, являются: усиление образования стрессфибрилл и фокальных контактов; повышение уровня цАМФ и Са2+ в клетке. Лизофосфатидиловая кислота активирует малую ГТФ-азу Ras и RhoA, отвечающие инициацию сигнала деления и регуляцию актинового цитоскелета, за

соответственно. Особенный интерес для нас представляет способность LPA активировать RhoA – ассоциированный сигнальный путь и вызывать фосфорилирование белков по тирозину одновременно с запуском перестроек цитоскелета: LPA индуцирует быстрое образование актиновых стресс-фибрилл и фокальных контактов (Ridley and Hall, 1992).

Таким образом, лизофосфатидиловая кислота является сигнальной молекулой, оказывающей подобное ростовым факторам и гормонам действие на широкий спектр жизненно важных процессов, одним из основных эффекторов, для которой является актиновый цитоскелет, его архитектура и динамическое равновесие. Кроме того, накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что характер и сроки перестроек актиновых структур под влиянием разнообразных биологически активных молекул однотипны, и следовательно должен быть универсальный механизм приводящий к разборке цитоскелета. Имеющиеся данные о влиянии на полимеризацию актина свободных форм кислорода дают основу возможного вовлечения подобного механизма на начальных этапах перестройки актиновых структур. В то же время должны существовать и механизмы их быстрого восстановления до исходного или измененного состояния. В настоящее время отсутствуют даже предположения по этому поводу.

4.2.4. Влияние уровня активных форм кислорода на процессы реорганизации актинового цитоскелета.

Одним из возможных универсальных механизмов регуляции процессов реорганизации актинового цитоскелета может быть изменение уровня активных форм кислорода. В пользу такого предположения служат накопленные к настоящему времени данные об их регулирующем действии на различные внутриклеточные системы, а также первые исследования, результаты которых позволяют связать рассмотренные процессы реорганизации цитоскелета с этими механизмами (Sue Goo Rhee et al., 2003).

Основная масса молекулярного кислорода, потребляемого клетками, восстанавливается в <u>митохондриях</u> до воды, окисляя органические субстраты в цепях переноса электронов. Меньшая часть кислорода расходуется на неполное

окисление органических соединений. Наконец, заметная часть кислорода в ходе окислительно-восстановительных реакций превращается в так называемые активные формы кислорода (АФК) - свободно-радикальные частицы и молекулы, которые возникают на пути одноэлектронного восстановления кислорода. В частности, к активным формам кислорода относится перекись водорода, которая постоянно образуется в живой клетке как продукт нормального метаболизма кислорода. В клетках млекопитающих нет ферментов, которые бы восстанавливали кислород до перекиси водорода. Однако несколько ферментативных систем NADPH-оксидаза, (ксантиноксидаза, циклоксигеназа И д**р**.) продуцируют супероксид (ион молекулы кислорода с неспаренным электроном), который спонтанно или под действием фермента супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода. При повышенном образовании в клетке перекись водорода вызывает оксидативный стресс, тогда как в субтоксических концентрациях H₂O₂ может служить внутриклеточным мессенджером. Показано, что во многих клеточных линиях H_2O_2 образуется в ответ на различные внеклеточные сигналы, включая цитокины (TGF-b, TNF-a, IL), пептидные ростовые факторы (PDGF, EGF, VEGF, bFGF и инсулин) и агонисты рецепторов, связанных с тримерными Gбелками (GPCR) - ангиотензин II, тромбин, LPA, гистамин, брадикинин. При этом избирательное подавление образования H₂O₂ в клетках приводит к блокаде от PDGF, EGF и ангиотензина II. Участие H₂O₂ во сигнальных путей внутриклеточном сигналинге неоднократно подтверждено различными исследователями. Однако пути синтеза H₂O₂ в клетке и механизмы, лежащие в основе передачи сигнала с помощью H₂O₂, остаются неизученными.

Рецептор-опосредованная продукция H₂O₂ в основном изучена на некоторых специализированных клетках, обладающих фагоцитарной активностью. Показано, что В фагоцитах под действием различных факторов активируется многокомпонентный NADPH -оксидазный комплекс, ответственный за перенос электронов с NADPH на O₂ с последующей генерацией супероксиданиона, который спонтанно или ферментативно дисмутирует в H₂O₂. В нейтрофилах активность NADPH -оксидазного комплекса регулируется малой GTP-азой Rac2, а в макрофагах - Rac1. Таким образом, Rac белки контролируют уровень активных форм кислорода (Engers et al., 2005). Обмен GDP, связанного с Rac, на GTP

катализируется фактором GEF, который в свою очередь активируется инозитол-3фосфатом, являющмся продуктом активности PI3-киназы. Клетки, не обладающих фагоцитарной активностью, продуцируют AФK в значительно меньших концентрациях по сравнению с фагоцитирующими. Прямые аналоги NADPH – оксидазного комплекса фагоцитов в клетках, не обладающих фагоцитарной активностью, не известны. Однако, не так давно было выявлено несколько новых типов NADPH- оксидаз нефагоцитирующих клеток, некоторые из которых стимулируют продукцию H_2O_2 в ответ на GPCR лиганды и пептидные факторы роста.

Рядом исследователей в последние годы показано, что H₂O₂ может контролировать динамику актиновых микрофиламентов в клетке, влияя тем самым на такие важные клеточные функции, как миграция, деление, межклеточные взаимодействия и др. (Fiaschi et al, 2006). О молекулярных механизмах, ведущих к этим изменениям в системе актинововых микрофиламентов клетки, известно мало. Показано, что in vitro актин может служить непосредственной мишенью для H_2O_2 (Theriot, 1998). Кроме того, обнаружено, что актин является одним из белков, наиболее подверженных окислительной модификации in vivo в ответ на предоставление клетке оксидантов. (Dalle-Donne, 2001). Эксперименты, направленные на изучение эффекта окисления мышечного альфа-актина in vitro (Jockusch et al. 1995), не выявили каких-либо значимых изменений, тогда как эксерименты, проведенные на немышечных бета/гамма-изоформах актина. являются более показательными. Это связано с тем, что одним из важнейших отличий между альфа-актином и бета/гамма- актином является число цистеиновых остатков, тиоловые группы которых чувствительны к H₂O₂. Молекула мышечного актина содержит 5 остатков цистеина (Cys-10, -217, - 257, -285 и -374). Немышечные бета/гамма-актины содержат два дополнительных цистеиновых остатка - Cys-17 и Cys-272. Однако Cys-10 в этих актинах заменен на Val-10, и общее количество цистеиновых остатков равно 6. Кроме того, показано, ЧТО цистеин в положении 272 немышечного бета-гамма-актина является наиболее реактивным цистеином, при этом у мышечного альфа-актина и немышечных изоформ беспозвоночных в позиции 272 находится другая аминокислота (Lassing et al., 2007).

Эксперименты, проведенные на немышечном бета/гамма-актине, показали, что окислительные модификации актина могут приводить к абсолютной потере его способности к полимеризации, а также блокировать взаимодействие актина с профилином, приводя тем самым к деполимеризации актиновых филаментов (Kabsch et al., 1990). Эффект окисления актина зависит от концентрации ионов кальция (Theriot, 1998). Таким образом, в условиях in vitro были воспроизведены процессы, которые могут происходить в клетках при передаче внеклеточного сигнала при участии перекиси водорода.

Перекись водорода должна действовать как высоко эффективный вторичный мессенджер, так как время ее действия сильно ограничено: восстановительные системы (каталазы, глутатион пероксидазы и др.), активно работающие в клетке, быстро элиминируют АФК. По той же причине место продукции H_2O_2 должно совпадать с местами преобразования актиновых микрофиламентов. Прямое взаимодействие основных источников АФК в клетке – NADPH-оксидазных комплексов и липоксигеназ – с актином подтверждено рядом исследователей (Weisinger et al., 2007; Moldovan et al., 2006). Показано также, что появление АФК во времени и пространстве коррелирует с изменениями системы микрофиламентов (Fechheimer et al., 1993).

Все имеющиеся на сегодняшний день данные говорят о том, что АФК могут являться одним из важнейших регуляторов динамики актинового цитоскелета, а следовательно и многих клеточных процессов, так или иначе связанных с системой микрофиламентов. Объяснение молекулярных основ перестроек актинового цитоскелета в ответ на появление АФК требует не только понимания механизмов сборки-разборки микрофиламентов при окислительно-восстановительных реакциях in vitro, но также объяснения роли многочисленных регуляторных белков, взаимодействующих с актином in vivo.

Антиоксидантная система включает низкомолекулярные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты. К первым относятся гидрофильный восстановленный глутатион (GSH) и аскорбиновая кислота, которые находятся в водной фазе клетки и защищают вещества гиалоплазмы и матрикса митохондрий, а гидрофобные антиоксиданты защищают мембраны. К антиоксидантным ферментам относяться

супероксиддисмутаза, селеновая глутатионпероксидаза и каталаза, глутатионтрансферазы, а также фосфолипидгидропероксид.

Глутатион, (2-амино-5-{[2-[(карбоксиметил)амино]- 1-(меркаптометил)-2оксоэтил]амино}-5-оксопентаноевая кислота γ-глутаминил-цистсинил-глицин, трипептид, образованный остатками трёх аминокислот — <u>глутаминовой кислоты</u>, <u>цистеина</u> и <u>глицина</u>. Глутатион содержится во всех живых организмах и имеет важное значение для окислительно-восстановительных реакций в связи со способностью сульфгидрильной группы (SH—) цистеина вступать в обратимую реакцию:

$$\begin{array}{c} -2H \\ 2GSH \xrightarrow{\rightarrow} GS - SG \\ \leftarrow \\ +2H \end{array}$$

В клетке тиоловые группы находятся в восстановленном состоянии (SH). Присутствие глутатиона в клетке приводит к тому, что он восстанавливает любую дисульфидную связь (S-S), образующуюся между цистеинами цитозольных белков. При этом восстановленная форма глутатиона GSH превращается в окисленную GSSG. Восстанавливается окисленный глутатион под действием фермента глутатионредуктаза, которая постоянно находится в клетке в активном состоянии и индуцируется при оксидативном стрессе. Отношение восстановленный/окисленный глутатион внутри клетки является одним из важнейших параметров, который показывает уровень оксидативного стресса. Соотношение оксидантов и антиоксидантов в клетке осуществляет редоксрегуляцию, очень важную во всех биологических процессах. Один из агентов, способных внутриклеточный синтез глютатиона-2-оксо-4влиять на тиазолидинкарбоксильная кислота (OTZ). ОТZ увеличивает уровень глутатиона внутри клетки за счет образования L-цистеина. Изменение уровня АФК и параллельное изменение содержания в клетке глутатиона показана в ряде работ (Lord-Fontaine, Averil, 1999; Chung et al., 1990).

Для выяснения механизмов однотипных преобразований актинового цитоскелета под влиянием разнообразны лигандов представляется важным установить, вовлечена ли в регуляцию этих процессов система активных форм кислорода.

Помимо поиска универсального механизма преобразований актинового цитоскелета перед исследователями в последнее время возникает и другой немаловажный вопрос. Каким образом обеспечиваются чрезвычайно быстрое восстановление структур разобранных под действием разнообразных агентов? При адгезии культивируемых клеток к субстрату их распластывание и формирование структур актинового цитоскелета занимает в лучшем случае несколько (4-5) часов, а при действии перечисленных факторов разобранный цитоскелет через 30 минут. Следовательно, восстанавливается уже есть основание предположить, что в этом процессе могут участвовать уже подготовленные к такой функции белковые комплексы. Однако до настоящего времени никаких прямых литературных поддерживающих опровергающих подобное данных или предположение не существует.

В процессе изучения структуры и функции цитоскелета было обнаружено, белки некоторые актин-связывающие помимо что выполнения своих ортодоксальных функций организации актиновых структур и участия в их деятельности, выявляются кроме того в цитоплазме в несвязанном с цитоскелетом состоянии. К ним, в частности, относится тропомиозин, обнаруженный в виде независимых частиц. Кроме того, в результате проводимых в лаборатории исследований взаимодействия транскрипционного фактора NF-kB с цитоскелетом обнаружено, ОН взаимодействует с альфа-актинином ЧТО И может транслоцироваться в ядро и, следовательно, покидать актин-содержащие структуры или существовать в этом комплексе независимо от них. Также было известно, что альфа-актинин может выявляться в фокальных контактах и других прямо не связанных с актином комплексах. Знакомство с литературой, посвященной свойствам этих белков, показывает в случае тропомиозина, что он присутствует в клетках в виде целого набора изоформ разного молекулярного веса и разной Более того, степени взаимодействия с актином. при злокачественной трансформации клеток происходит смена изоформ, влияющих на стабильность и динамику актиновых структур. Альфа-актинин образует комплексы с рядом белков, осуществляющих взаимодействие с адгезивными рецепторами и молекулами, выполняющими сигнальные функции. Таким образом, можно предположить, что тропомиозин и альфа-актинин могут входить в состав независимых от цитоскелета комплексов, принимающих участие в реорганизациях актинового цитоскелета.

4.4. Структура и функции тропомиозина

Тропомиозин - это эволюционно консервативный альфа-спиральный актинсвязывающий белок, он димеризуется с образованием палочковидных суперспиралей, которые укладываются вдоль центральной канавки F-актиновых микрофиламентов и участвуют в поддержании их структуры. В мышечных и немышечных клетках тропомиозин контролирует взаимодействие актиновых фибрилл с миозином, регулируя сокращение (Brown and Cohen, 2005).

Поскольку тропомиозины регулируют набор актин-связывающих белков, вовлечённых в работу цитоскелета, то смена разных изоформ в клетке неразрывно связана с характером организации актинового цитоскелета, определяя его динамические свойства и стабильность (Lindberg et al., 2008, O'Neill et al., 2008). Так, менее развитую организацию актинового цитоскелета, характерную для трансформированных И раковых клеток. связывают с заменой высокомолекулярных изоформ тропомиозина низкомолекулярными (Miyado et al., 1997; Gunning et al., 2008). Эти данные дают основания предполагать, что характер пространственной организации и стабильность актинового цитоскелета может зависеть от типа синтезируемых в данных условиях конкретных изоформ При этом восстановление экспрессии тропомиозина. высокомолекулярных ингибированию онкогенных тропомиозинов приводит к проявлений И восстановлению нормального клеточного фенотипа (Gunning et al., 1997). Так, тропомиозин-1 считается онкосупрессором: например, показано, ЧТО его экспрессия приводит к нормализации фенотипа src- и ras-трансформированных фибробластов и в этом процессе принимает участие сигнальный путь Rho (Prasad et al., 1999; Shah et al., 2001). При помощи совместного действия ингибитора ДНКметилтрансферазы 5-аза-2'-дезоксицитидина ингибитора И деацетилаз трихостатина А удалось увеличить экспрессию тропомиозина-1 в клетках

карциномы лёгкого и ras-трансформированных фибробластах. Экспрессия тропомиозина-1 в клетках карциномы лёгкого приводит к Rho-зависимому восстановлению нормального цитоскелета и чувствительности к аноикизу (Bharadwaj et al., 2002, 2005). В дрожжах Schizosaccharomyces pombe экспрессируется единственная изоформа тропомиозина – Cdc8, и на протяжении всего клеточного цикла 80% белка ацетилировано, что значительно увеличивает его сродство с актином. Ацетилированный Cdc8 ингибирует связывание миозина с актином (Skoumpla et al., 2007). Отдельная молекула тропомиозина слабо взаимодействует с F-актином. Стабильное связывание обеспечивается за счёт полимеризации тропомиозинов голова-к-концу в спираль на поверхности актиновой фибриллы. Тропомиозины без N-концевых ацетильных остатков или с делетированными концами не способны к полимеризации и взаимодействию с актином (Johnson and Smillie, 1977; Urbancikova and Hitchcock-DeGregori, 1994).

Обычно тропомиозин находится в клетке в связанном с актиновыми структурами виде, в немышечных клетках в основном в составе стресс-фибрилл (Lazarides, 1975). Вместе с тем, при иммунофлуоресцентном анализе цитоскелета с помощью антител к тропомиозину, его обнаружили не только в составе актиновых структур, но и в виде независимых от них крупных частиц, распределенных в цитозоле, в том числе в ламеллах и филоподиях, где обычно интенсивно полимеризуется актин (Hillberg et al., 2006; Grenklo et al., 2008).

Молекулярная организация и функциональная роль этих частиц в настоящее время неизвестны. Вполне возможно, что они вовлечены в процесс реорганизации цитоскелета под влиянием внешних лигандов и являются предшественниками будущих актиновых структур, а также могут принимать участие в проведении внутриклеточных сигналов. Для того. чтобы выяснить в какой мере тропомиозиновые частицы связаны с осуществлением этих процессов необходимо, прежде всего, определить их белковый состав и проследить за динамикой тропомиозиновых комплексов в процессе перестроек актинового цитоскелета.

В данной работе были использованы нормальные и трансформированные клетки с разной степенью развитости актинового цитоскелета (Арэ и др., 1999) для оценки количества и размера содержащихся в них тропомиозиновых частиц.

Так как из литературы известно, что характер взаимодействия тропомиозина с актином может изменяться в зависимости от степени его ацетилирования (Cho et al., 1990), то от этого может зависеть образование тропомиозиновых частиц, изменение их количества и состава.

Формирование подобных независимых частиц или белковых комплексов может также происходить в процессе различных перестоек актинового цитоскелета и являться одним из этапов передачи сигнала или транспортировки сигнальных молекул от мембраны клетки в ядро. В связи с проводимыми в нашей лаборатории исследованиями, впервые продемонстрировавшими взаимодействие транскрипционного фактора NF-kB с альфа-актинином и транслокацией этих молекул в ядро, возникло предположение, что они могут образовывать также независимые от цитоскелета комплексы. Многофункциональность альфа-актинина и его способность вступать в контакты с разнообразными молекулами может быть результатом его мобильности.

4.3. Альфа-актинин

4.3.1. Структура α-актинина

α-Актинин - широко распространённый актин-связывающий белок. Он содержит четыре спектриновых повтора и считается наиболее примитивным белком в спектриновом суперсемействе, к которому относятся также α - и β спектрины, дистрофин и утрофин. Известны его изоформы скелетных и гладких мышц и немышечные изоформы α-актинина. Различные изоформы были выявлены методом пептидных карт (Bretcher et al., 1979), а полная последовательность αактинина, состоящая из 897 аминокислот была определена клонированием и секвенированием кДНК. Молекулярная масса мономера составляет 94-103 кДа. В домена: состав белка входит три высококонсервативных (1) наиболее консервативный амино-терминальный участок, содержащий два кальпонинподобных актин-связывающих домена: CH1 и CH2, (2) центральный регион, состоящий из четырех спектрин-подобных α-спиральных повторов (SHR - spectrin homology repeats), которые участвуют во взаимодействии мономеров между собой, но также могут осуществлять связь с другими молекулами (Djinovic-Carugo et al., 2002), (3) карбокси-терминальный домен, содержащий один или два кальцийсвязывающих мотива (EF-hands), в зависимости от изоформы (Arimura et al., 1988, Miillake et al., 1989). α -Актинин формирует гомодимеры из двух антипараллельно направленных субъединиц, и по крайней мере две изоформы, α -актинин 2 и 3, могут образовывать гетеродимеры (Dixson et al., 2003). Структура димера, в котором два актин-связывающих участка разделены жестким стержнем из спектриновых повторов, обуславливает способность α -актинина к формированию упорядоченных сетей, пучков или разветвлённых пучков из актиновых микрофиламентов (Djanovic-Carugo et al., 1999, Pelletier et al., 2003).

4.3.2. Изоформы актинина и их субклеточная локализация

настоящее время у высших позвоночных известно B четыре гена. кодирующие альфа-актинины 1, 2, 3 и 4 (Critchley and Flood, 1999). Считается, что первым в результате генной дупликации появился α-актинин-2, а затем в результате дивергенции – альфа-актинины 1, 3 и 4. (Dixson et al., 2003). Ген ACTN1 дает три изоформы альфа-актинина путем тканеспецифичного альтернативного сплайсинга. Немышечная/цитоскелетная изоформа содержит два EF мотива. В транскрипте оказывается немышечный экзон, кодирующий 27 аминокислот, которые образуют С-конец первого EF мотива. Гладкомышечная изоформа содержит единственный EF мотив. Гладкомышечный экзон кодирует 22 отличные от немышечной изоформы аминокислоты. Описана также изоформа из мозга взрослых крыс, при транскрипции которой оба экзона комбинируются, образуя последовательность специфичную для мозга (Kremerskothen et al., 2002). Эта изоформа экспрессируется в мозге взрослых животных, особенно в гиппокампе и кортикальных нейронах и не обнаружена в эмбриональном мозге. Связывание немышечной изоформы с актином ингибируется кальцием, а связывание гладкомышечной изоформы не зависит от кальция, особенности изоформы из мозга пока неизвестны. Изоформа немышечного альфа-актинина-4 (ACTN4) была клонирована из различных онкогенных клеточных линий и имеет 80% гомологию к продуктам гена ACTN1 (Honda et al., 1998). Высокий уровень экспрессии альфаактинина 4 наблюдается в подоцитах. Гены ACTN2 и ACTN3 кодируют две скелетно-мышечные изоформы. Ген ACTN2 экспрессируется в скелетных и сердечной мышцах, тогда как ген ACTN3 экспрессируется только в скелетных мышцах. Мышечные изоформы формируют часть сократительного аппарата, заякоривая актиновые тонкие филаменты в Z-линиях и плотных телах в поперечнополосатых и гладких мышцах соответственно.

Отмечены различия в субклеточной локализации немышечных изоформ альфа-актинина. Актинин-1 локализуется вдоль стресс-фибрилл и участвует в связывании микрофиламентов, он обнаружен в фокальных и межклеточных контактах. Актинин-4 значительно меньше концентрируется вдоль стресс-фибрилл и не был обнаружен в фокальных и межклеточных контактах; белок локализуется в основном в цитоплазме и может мигрировать в ядро при воздействии вортманнина или цитохалазина, а в некоторых клеточных линиях он постоянно локализуется в ядре (Honda et al., 1998). В целом если актинин-1 ассоциирован с более стабильными клеточными структурами, то актинин-4 – с более динамичными, например, с областями активного раффлинга (Araki et al., 2000), также он был обнаружен в экзосомах, секретируемых мезотелиомными клетками (Hegmans et al., 2004). Альфа-актинин-4 участвует в фаго-, эндо- и макропиноцитозе в макрофагах, стимулированных колоний-стимулирующим фактором (Araki et al., 2000).

Имеются различные данные о ядерной локализации этого белка. Так, удаление 71 аминокислоты на С-конце α-актинина-4, кодируемого плазмидой, содержащей GFP, приводит к постоянной ядерной локализации этого белка (Gonzalez et al., 2001). В отличие от α-актинина-1, экспрессия α-актинина-4 вызывает миграцию Мутации в гене ACTN4 (К/Е в положении 228, Т/І - 232, S/P - 235), клеток. который локализован на 19q13 хромосоме человека, могут приводить к неспецифическому поражению почек. Уровень экспрессии α-актинина-4 и его подоцитах субклеточная локализация В зависит от уровня глюкозы И гликозилированных конечных продуктов в среде, что связывают с цитоскелетными перестройками в подоцитах в условиях диабета (На, 2006). Мутантный α-актинин-4 имеет большее сродство к актину in vitro, чем белок дикого типа. Известно, что мутация в гене альфа-актинина-4, приводящая к повышенному сродству к фибриллярному актину, приводит к серьезным почечным дисфункциям (Kaplan et al., 2000). Актинин-4 открыт недавно (Honda et al., 1998), и его функциональная роль и структурные особенности ещё достаточно мало изучены.

Протеолитическое расщепление мышечного α-актинина трипсином или термолизином приводит к появлению устойчивого к расщеплению фрагмента с мол. массой 53 кДа и термолизин-устойчивого полипептида с мол. массой приблизительно 27 кДа (Bretcher et al., 1979). Фрагмент 27 кДа является актинсвязывающим доменом актинина. В клетке альфа-актинин, вероятно, находится под строгим контролем протеаз, но протеолитическое расщепление этого белка изучено плохо. Имеются данные, что фрагменты альфа-актинина обладают биологической активностью. Так, 31 кДа амино-терминальный фрагмент альфаактинина, получивший название мактинин, выявленный в культуральной среде клеток миелоидной лейкемии HL-60 после добавления очищенного альфа-актинина (Mane et al., 1991), стимулирует созревание моноцитов в макрофаги. Интактный αактинин не обладал подобной активностью (Masri et al., 1999, Luicart et al., 1999). Дальнейшие исследования этой группы показали, что мактинин образуется только под действием урокиназы, и не образуется под действием других сериновых, цистеиновых и металлопротеаз (Luikart et al., 2002). Недавно при помощи двухгибридного анализа была выявлена изоформа α-актинина-4 с вырезанным участком 89-478 аминокислотных остатков, который содержит часть домена CH-1, все домены CH-2 и SHR домены 1 и 2. Такие короткие изоформы α-актинина-4 локализуются в клетках HeLa преимущественно в ядре (Chakraborty et al., 2006). Имеются данные о том, что микроинъекция флуоресцентно меченных фрагментов α-актинина 27 кДа и 53 кДа приводит к накоплению их в ядре, но авторы считали это артефактом (Pavalko and Burridge, 1991). На возможную функциональную роль фрагментов α-актинина в ядре может указывать тот факт, что 31 кДа фрагмент гладкомышечного α-актинина, полученный под действием урокиназы, вызывает созревание моноцитов в макрофаги (Luikart et al., 2002).

Для исследования динамики α-актинина в стресс-фибрилах и фокальных контактах использовались микроиньекции флюоресцентно-меченного белка. Полное восстановление флюоресценции после фотовысвечивания участка в участках фокальной адгезии происходило примерно за 20 минут, а в стрессфибрилах за 30-60 минут. Фотовысвеченные участки осуществляли центростремительное движение вдоль стресс-фибрилл со скоростью 0,24±0,12 нм/мин (McKenna et al., 1985, McKenna et al., 1986). На Swiss 3T3 клетках, экспрессирующих GFP-плазмиду с альфа-актинином (αAGFP), были продемонстрированы более высокие темпы обмена: порядка 15 минут для обеих структур (Edlund et al., 2001). Стимуляция эпителиальных клеток (BSC-1) форболовым эфиром после микроиньекции α-актинина приводила к быстрой реорганизации актиновых структур. После стимуляции появлялись раффлы, содержащие большое количество иньецированного актинина. α-Актинин при этом исчезал из фокальных контактов быстрее, чем из стресс-фибрил и раньше, чем разбирались (Meigs et al., 1986). Bo фокальные контакты многих трансформированных клетках после разборки стресс-фибрил и фокальных контактов α-актинин выявляется в составе агрегатов. Динамика белка в таких агрегатах была исследована на почечных клетках крысы методом фотовысвечивания после микроиньекции флюоресцентно-меченого актинина: структуры оказались высокодинамичными, способными очень быстро изменять размер и положение. Темпы обмена актинина в агрегатах также оказались необычно высоки: восстановление после высвечивания происходило за 11 секунд (Stickel et al., 1987).

4.3.5. Участие α-актинина в адгезии

α-Актинин участвует в формировании различных комплексов клеточной адгезии, включая фокальные контакты, поясковые десмосомы, полудесмосомы, участки адгезии лимфоцитов и такие специализированные клеточные структуры, как синапсы и структуры в подошве подоцитов. Снижение уровня экспрессии αактинина-4 в подоцитах приводит к ухудшению адгезии клеток к базальной мембране в нефронах и к субстратам (коллаген IV и ламинин 10/11) в культуре, также снижается сила связи между интегринами и цитоскелетом (Dandapani et al., 2006). специфично Альфа-актинин И прямо взаимодействует С цитоплазматическими доменами β 1 и β 3 интегринов (Otey et al., 1990, Cattelino et al., 1999). Эти данные позволяют предположить, что комплекс α-актинин-βвзаимодействие интегрин может осуществлять актиновых филаментов с плазматической мембраной и фокальными контактами. Это подтверждается, в частности, тем что при микроинъекции фрагментов α-актинина 27 кДа и 53 кДа происходит разрушение актиновых структур, вероятно потому, что фрагменты препятствуют эндогенному α-актинину взаимодействовать и с актином и с интегринами (Pavalko et al., 1991). Показано и взаимодействие α-актинина с пептидом, соответствующим части цитоплазматического домена β2-интегрина (CD18) in vitro. CD18 также соосаждается с α-актинином из активированных хемотоксическим пептидом FMLP и ФНО-а нейтрофилов. Это взаимодействие временно, наблюдается через 5-10 мин после активации и снижается до остаточного уровня к 20 мин (Pavalko and LaRoche, 1993). В покоящихся лейкоцитах β2-интегрины постоянно связаны с актиновыми структурами через талин. Активация клеток индуцирует протеолиз талина и открепление актиновых структур от β2-интегрина. Это временное явление, вслед за которым следует новое прикрепление микрофиламентов к интегринам через α-актинин. Эксперименты по мутагенезу цитоплазматического домена β2-интегрина показали, ЧТО ЭТО связывание регулируется конформационными изменениями интегрина (Sampath et al., 1998).

В межклеточных контактах фибробластов α-актинин взаимодействует с комплексом Е-кадгерин/катенин. С этим комплексом в эпителиальных клетках кроме α-актинина взаимодействует И винкулин. В N-И Е-кадгерин экспрессирующих клетках α-актинин образует иммунопреципитаты с α- и βкатенинами только в присутствии α-катенина. Это взаимодействие не зависит от присутствия актина (Lewis et al., 1995). Интересно, что α-катенин имеет гомологию с винкулином, который взаимодействует и с актином и с α -актинином (Knudsen et al., 1995, Herrenknecht et al., 1991). α-Актинин-4 образует комплексы с β-катенином в клетках линии SW480, перекрывая при этом сайт связывания Е-кадгерина, а уровень такого связывания зависит от уровня экспрессии Е-кадгерина: α-актинин начиниет коиммунопреципитировать с β-катенином в тех клетках эпителиальных опухолей, которые перестают экспрессировать Е-кадгерин И начинают инфильтрировать строму (Hayashida et al., 2005). Пептид из 25 аминокислот, соответствующий цитоплазматическому домену молекулы межклеточной адгезии-2 (ICAM-2), связывает α-актинин из плацентарного лизата. При этом не наблюдалось взаимодействие с винкулином, талином и спектрином. Очищенный αактинин взаимодействует с Результаты прямо ЭТИМ пептидом. иммунофлюоресценции показали, что α-актинин и ICAM-2 солокализуются в

эндотелиальных клетках (Nafaguchi et al., 1991). Для поиска цитоскелетных белков, взаимодействующих с ICAM-1, использовался такой же метод. Синтезированный пептид из 28 аминокислот, соответствующий цитоплазматическому домену ІСАМ-1, взаимодействовал с α-актинином, но не с талином, винкулином и тензином. Очищенный α-актинин солокализуется с белком ICAM-1 в лимфоидных клеточных линиях (Carpen et al., 1992). Методом двухгибридного анализа было показано, что обе немышечные изоформы α-актинина - первый и четвёртый – взаимодействуют с цитоплазматическим доменом ICAM-1, и это взаимодействие играет значительную роль в адгезивных свойствах лейкоцитов, оно совершенно необходимо для того, чтобы лейкоциты могли выходить сквозь стенки кровеносных сосудов в ткани (Celli et al., 2006). L-селектин прямо взаимодействует с α-актинином, но не с талином или винкулином. Интересно, что талин способствует взаимодействию αактинина и L-селектина, но сам этот белок с ними не связывается. Винкулин связывается с этим комплексом только в присутствии α-актинина (Heiska et al., 1996). В фокальных контактах α-актинин взаимодействует с трансмембранным протеогликаном синдеканом-4, связывая его с системой микрофиламентов клетки. Белки взаимодействуют независимо от β-интегринов. α-Актинин и синдекан-4 имеют сходную локализацию, коиммунопреципитируют и связываются в опытах in vitro (Greene et al., 2003).

4.3.6. Образование комплексов с другими белками

Винкулин связывается с α-актинином в области спектрин-подобных повторов, но не с актин-связывающим доменом. С использованием серий GST конструкций был определен связывающий участок на С-конце (аминокислотные остатки 713-749), который перекрывает первый из двух кальций-связывающих EF-мотива (McGregor et al., 1994).

α-Актинин взаимодействует с белками, содержащими LIM домен: зиксином и белками семейства CRP. Зиксин - актин-связывающий белок, обнаруживается в фокальных контактах. При удалении α-актинин-связывающего сайта ассоциация зиксина с фокальными контактами значительно снижается, и этот факт проясняет физиологическую роль взаимодействия α-актинин-зиксин. Двугибридный анализ показал, что N-концевой домен зиксина (аминокислотные остатки 1-42) взаимодействует с центральными спектрин-подобными доменами α-актинина (Li and Trueb, 2001). Интересен и тот факт, что как зиксин, так и α-актинин-4 при определенных условиях обнаруживаются в ядре, но неизвестно, взаимодействуют ли они там,. С α-актинином специфично и прямо взаимодействует цистеин-богатый белок, имеющий LIM домен (CRP). За взаимодействие отвечает последовательность из 18 аминокислотных остатков в N-концевом глицин-богатом домене (Pomiès et al., 1997, Harper et al., 2000).

 α -Актинин способен связываться с белками семейства Enigma/Cypher, которые характеризуются наличием N-концевого PDZ-домена, связывающегося с другими цитоскелетными белками, и C-концевого LIM мотива, который может связываться с киназами. Так, новый актинин-связывающий белок ALP с мол. массой 39 кДа был обнаружен в скелетных мышцах. Высокий уровень экспрессии этого белка наблюдается только в Z-линии, где он взаимодействует с α -актинином-2. Двугибридный анализ показал, что PDZ домен ALP связывается со спектринподобными повторами α -актинина-2 (Xia et al., 1997). Другой PDZ-LIM белок CLP-36 локализуется вдоль стресс-фибрилл в немышечных клетках. Этому способствует взаимодействие PDZ домена CLP-36 со спектрин-подобными повторами α актинина. Показано взаимодействие обеих немышечных изоформ с CLP-36 (Vallenius et al., 2000).

Масс-спектрометрическими методами недавно было показано взаимодействие α-актинина-4 с PDZ-содержащим белком семейства MAGUK (membrane-associated guanylate kinase scaffolding proteins) - ZO-1 (zonula occludens-1). Кроме того, эти два белка коиммунопреципитируют как из культивируемых клеток, так и из тканей мозга, печени и сердца. ZO-1 является компонентом различных межклеточных контактов, где он взаимодействует с широким спектром трансмембранных и примембранных белков, включая окклюдины, различные изоформы катенинов и коннексинов, белки синаптических контактов. Множественные PDZ-домены, входящие в структуру ZO-1, позволяют ему выступать скаффолдом для сигнальных и структурных молекул, но особенно примечательно то, что ZO-1 содержит и NLSпоследовательности, посещает челночным образом ядро и может там связываться с Y-box транскрипционным фактором ZONAB (Chen et al., 2006).
Было идентифицировано новое семейство актинин-связывающих белков: миотилин, миопалладин и палладин сходны по структуре и каждый обладает несколькими копиями IgC2 домена. Миотилин и миопалладин локализованы в Zдисках поперечно-полосатой мускулатуры и играют важную роль в организации саркомеров (Otey and Carpen, 2004). Белок палладин с мол. массой 90-92 кДа, экспрессирующийся в фибробластах, солокализуется с α-актинином в стрессфибрилах, фокальных контактах, межклеточных контактах и эмбриональных Zлиниях. Этот белок также образует иммунопреципитаты с α-актинином. Антисмысловые PHK-конструкции к PHK этого белка вызывают разборку цитоскелета (Parast et al., 2000).

Актинин-2 связывается также с дистрофином (Hance et al., 1999) и CapZ (Рара et al., 1999). ВЕRР белок, экспрессирующийся в мозге, и способный связываться с хвостовым доменом миозина V, прямо взаимодействует с α -актинином-4 (El-Husseini et al., 2000). На клетках HeLa было показано, что α -актинин-4 вместе с ассоциированным с эндосомами белком hrs, белком BERP и миозином V образуют белковый комплекс CART [cytoskeleton-associated recycling or transport], который предположительно осуществляет связь эндосом, содержащих трансферриновый рецептор, с актиновым цитоскелетом и играет таким образом важную роль в рециклировании этих эндосом (Yan et al., 2005).

С а-актинином-4 взаимодействуют также белок межклеточных контактов BP180 (Gonzalez et al., 2001) и белок MAGI-1 в подоцитах (Patrie et al., 2002). Недавно было показано, что а-актинин ассоциирован с белком теплового шока (БТШ) 20 (Tessier et al., 2003). Кроме того, а-актинин-4 формирует тройной комплекс с Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназой 2 и денсином-180, постсинаптическим белком нейронов центральной нервной системы (Walikonis et al., 2001). Ca²⁺-зависимое взаимодействие а-актинина-4 с PDZ-белком E3KARP требуется для Ca²⁺-зависимового ингибирования Na⁺/H⁺ насоса 3 типа (NHE3), ответственного за абсорбцию NaCl и NaHCO₃ в кишечнике и проксимальных почечных канальцах. (Kim et al., 2002).

Иммунопреципитация и масс-спектрический анализ позволили выявить целый ряд белков, с которыми взаимодействует α-актинин-4 в клетках линии 22RV1 – это β/γ актин, кальмодулин, тяжёлая цепь клатрина, тяжёлая цепь немышечного

миозина, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин (hnRNP) A1 и SH3-доменсвязывающий белок G3BP. Также было обнаружено взаимодействие с α актинином-4 динамина, адаптина- δ , β -NAP и p47A. Показано, что α -актинин-4 принимает участие в регуляции пузырькового транспорта (Hara et al., 2006). Было обнаружено, что α -актинин-4 выявляется в ядрах клеток линии HEK293 в числе белков, взаимодействующих с андрогеновым рецептором, и в комплексе с ним обнаруживаются тяжёлая цепь клатрина и протеинкиназа С δ . При этом α -актинин-4 и протеинкиназа С δ могут играть роль регуляторов транскрипции, опосредованной андрогеновым рецептором. Авторы говорят о мультимолекулярном комплексе («специфическом белковом модуле»), с которым связывается андрогеновый рецептор и который обуславливает его надлежащую активность и регуляцию (Jasavala et al., 2006).

Интересную роль α -актинин играет в патогенных процессах, вызываемых *E.coli*. Бактерия встраивает в плазматическую мембрану эпителиальной клетки хозяина белок Tir, являющийся рецептором для мембранного белка *E.coli* интимина. Tir же связывается с α -актинином, осуществляя непосредственную связь с актиновым цитоскелетом и обеспечивая его перестройку для нужд патогена (Goosney et al., 2000).

4.3.7. Участие комплексов альфа-актинина в сигнальных системах

Очевидно, что являясь элементом таких динамичных структур в клетке, как фокальные контакты, или же осуществляя связь между трансмембранными белками И актиновыми микрофиламентами, актинин должен обладать соответствующими системами регуляции. Можно выделить четыре основных механизма регуляции α-актинина: связывание фосфатидилинозитоловых интермедиатов, воздействие протеаз, фосфорилирование тирозинкиназой FAK и связывание кальция.

α-Актинин из исчерченной мускулатуры содержит большое количество эндогенного фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата, в то время как белок из гладкой мускулатуры связывает только небольшое его количество. PIP2 регулирует связывание α-актинина и F-актина (Fukami et al., 1992). Регуляторная субъединица PI3-киназы 85 кДа (p85) образует иммунопреципитаты с α-актинином из лизатов

клеток NIH/3T3. В отсутствии PIP2 α -актинин связывает всю молекулу p85, тогда как в присутствии PIP2 – только пролин-богатый регион p85 (Shibasaki et al., 1994). В клетках линии Balb/с 3T3 α -актинин, связаный с цитоскелетом, содержит PIP2, тогда как белок, находящийся в цитозоле, не содержит PIP2. Уровень связанного с α -актинином PIP2 снижается после стимуляции клеток PDGF и восстанавливается в течение часа после стимуляции. Активация PI3-киназы приводит к разборке фокальных контактов и перераспределение α -актинина и винкулина в Triton X-100 – растворимую фракцию. Фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, продукт PI3-киназы, связывается с α -актинином в PDGF – обработанных клетках, при этом снижается сродство α -актинина к β 1 и β 3-интегринам (Greenwood et al., 2000).

α-Актинин фосфорилируется по тирозину в ответ на стимуляцию Тклеточного рецептора (Egerton et al., 1996). В дальнейшем фосфорилированный αактинин был обнаружен в активированных тромбоцитах, где цитоскелетная изоформа фосфорилируется киназой фокальных контактов FAK в положении Туг12. Фосфорилирование по Туг12, остаток которого находится в EF1 домене, приводит к снижению сродства α-актинина и F-актина, также как и замена на глутаминовую кислоту в этом положении (Izaguirre et al., 1999, Izaguirre et al., 2001). Физиологический смысл, как и в случае с РІРЗ, состоит, вероятно, в значительных перестройках при адгезии клеток, которая сопровождается активацией FAK и, вполне возможно, в модуляции α-актинина как скаффолдбелка В ЭТОМ важном В жизни клетки процессе. Путь утилизации ϕ осфорилированного α -актинина неизвестен; возможны дефосфорилирование с помощью фосфотирозинпротеинфосфатаз или деградация.

Серин/треонин протеинкиназа МЕКК1, которая является активатором МАР киназ и транскрипционного фактора NF-кB, взаимодействует с α-актинином, что было показано двух-гибридным анализом. МЕКК1 коиммунопреципитирует с α-актинином из лизатов клеток 293. Показана и солокализация МЕКК1 и α-актинина вдоль стресс-фибрилл и в фокальных контактах. Для связывания не требуется киназная активность МЕКК1, белок с мутациями в каталитическом домене также локализован на стресс-фибриллах. (Christerson et al., 1999). МЕКК1 может модулировать активность протеазы кальпаина, которая помимо протеолиза таких

белков, как талин или винкулин, может влиять на включение α-актинина в фокальные контакты (Otey and Carpen, 2004).

РКN – серин/треониновая протеинкиназа, имеющая каталитический домен, гомологичный протеинкиназе С, взаимодействует с α-актинином Это было обнаружено при помощи двугибридного анализа. За связывание с α-актинином отвечает N-концевой район PKN, не пересекающийся с RhoA-связывающим доменом. PKN связывает третий спектрин-подобный домен в мышечной и способна Ca²⁺-зависимо немышечной изоформе α-актинина. PKN также связываться с EF-мотивом немышечной изоформы α-актинина и Ca²⁺-независимо – с мышечной изоформой. PKN фосфорилировала N-терминальную область αактинина В присутствии 40 мкМ арахидоновой кислоты, но более предпочтительные субстраты для этой киназы G-актин и кальдесмон (Mukai et al., 1997).

α-Актинин-4 физически и функционально взаимодействует с серин/треониновой протеинкиназой АКТ1, регулируя критическим образом её локализацию и работу. Так, сайленсинг гена *ACTN4* при помощи миРНК приводит к снижению уровня фосфорилирования АКТ1, блокирует перемещения АКТ1 к мембране и ингибирует пролиферацию клеток (Ding et al., 2006).

Было установлено, что α -актинин является потенциальным ингибитором всех членов семейства GRK (киназы рецепторов, связанных с G-белками). В присутствии кальмодулина и α -актинина GRK5 фосфорилирует растворимые, но не связанные с мембранами субстраты. Напротив, в присутствии PIP2 и α -актинина GRK5 фосфорилирует связанные с мембранами, но нерастворимые в цитоплазме субстраты. Таким образом, PIP2 и кальмодулин регулируют взаимодействие α актинина и GRK in vivo (Freeman et al., 2000).

Кальмодулин обратный имеет эффект α-актинину И В случае с NMDA (N-метил-D-аспартат) рецептором. нейротрансмиттерным Кальцийсвязанный кальмодулин замещает α-актинин, связанный с NMDA рецептором, что вызывает перераспределение рецептора. Двугибридный анализ показал, что центральный домен α-актинина связывается с цитоплазматическими доменами обеих NR1 и NR2B субъединиц NMDA рецептора (Wyszynski et al., 1997).

Двугибридным методом было показано взаимодействие α-актинина и белка рабфилина-3А, который является мишенью Rab3A малого GTP-связывающего белка. Рабфилин-3A участвует в Ca²⁺-зависимом экзоцитозе. За связывание ответственны спектриновые повторы α-актинина. Комплекс α-актинин/рабфилин-3A способствует связыванию микрофиламентов в пучки, а Rab3A препятствует образованию этого комплекса (Kato et al., 1996).

Было обнаружено совместное перераспределение α-актинина и протеинкиназ СβІ и βΙΙ. Однако, не было показано прямого взаимодействия α-актинина и протеинкиназы Сβ (Niggli et al., 1999). Другая изоформа протеинкиназы С – эпсилон - после стимуляции арахидоновой кислотой кардиомиоцитов мигрирует в область Z-линии, одним из главных компонентов которой является α-актинин. Но прямого взаимодействия также не показано.

Наконец, совсем недавно Chakraborty et al. обнаружили, что 1 и 4 изоформы αактинина взаимодействуют с гистоновыми деацетилазами класса IIa. Были картированы взаимодействующие участки на С-конце α-актинина-4 и 72-172 аминокислотные остатки на гистоновой деацетилазе 7 (HDAC7). Область связывания α-актинина-4 на HDAC7 при этом значительно перекрывается с областью связывания транскрипционного фактора MEF2A Таким образом, αактинин-4 конкурирует с MEF2A за связывание HDAC7 и регулирует его транскрипционную активность: например, при увеличении экспрессии α-актинина-4 больше экспрессируется и TAF55 – одна из мишеней для MEF2. Таким образом, доказанным является тот факт, что α-актинин-4 может работать в ядре как корегулятор транскрипции (Chakraborty et al., 2006).

Таким образом, большое количество работ в последние несколько лет, в которых обнаруживаются всё новые α -актинин-связывающие белки (**таблица 3.1.**), позволяют предполагать, что α -актинин функционирует не только как белок, способствующий стабилизации актиновых филаментов, но и как важный молекулярный скаффолд, обеспечивающий взаимодействие ряда ключевых сигнальных белков с актиновым цитоскелетом, а также может принимать участие в регуляции транскрипции. Известные вторичные мессенджеры, такие как внутриклеточный Ca²⁺, PIP2 и PIP3, регулируют межбелковые взаимодействия α -актинина, сигнальных белков и актинового цитоскелета.

Помимо своей главной функции латерального связывания актиновых филаментов, немышечный α-актинин взаимодействует с трансмембранными рецепторными молекулами и может действовать как адапторный белок, организуя содержащие LIM-, PDZ-, Ig C2 (Ід-подобные)белки, домены. Наличие собственных доменов (кальпонин-гомологичного домена И спектриновых повторов) позволяет α-актинину взаимодействовать с целым рядом белков. Со спектриновыми повторами альфа-актинина могут связываться цитоплазматические домены интегринов, ICAM, L-селектин, Ep-CAM (epithelium-specific cell-cell adhesion molecule) (Balzar et al., 1998), металлопротеазы ADAM12 (Cao et al., 2001) и NMDA рецептора. Во всех этих взаимодействиях связывающий сайт на цитоплазматическом домене этих белков был картирован до относительно короткого основного пептида. Кристаллическая структура стержневого домена αактинина, основой которой являются спектриновые повторы, выявила представленные на поверхности кислые аминокислоты (Ylanne et al., 2001), с которыми могут взаимодействовать эти основные пептиды.

Внутриклеточная локализация двух немышечных изоформ альфа-актинина различна. α-Актинин-1 преимущественно локализуется в областях фокальных и межклеточных контактов и вдоль стресс фибрилл. α-Актинин-4 локализуется в активно движущихся структурах клетки, в областях интенсивного раффлинга, кортикального актина, может взаимодействовать со стресс фибриллами; участвует В процессах макропиноцитоза И фагоцитоза; И только эта изоформа обнаруживается в ядре. Между изоформами наблюдается высокая гомология, особенно в областях спектриновых и актин-связывающих доменов, и обе изоформы имеют общую регуляцию Ca²⁺ и фосфоинозитидами. Вопрос о различной локализации изоформ остается открытым. Участие актинина-4 в активно движущихся структурах и белковых комплексах, а также его роль в регуляции различных клеточных процессов позволяет предполагать, что этот белок более быстро регулируется основными сигнальными механизмами клетки, чем актинин-1, представленный, в основном, в стабильных клеточных структурах. Будучи одним из основных регуляторов клеточной адгезии, α-актинин-4 может играть ключевую роль в канцерогенезе и метастазировании, от него же зависит

надлежащее функционирование белкового фильтра, которых образуют в почках подоциты.

Всё вышесказанное свидетельствует о том, что α-актинин может представлять собой один из ключевых элементов актинового цитоскелета, принимающих участие в передаче сигнала с поверхности клетки в ядро. α-Актинин-4 образует комплексы с большим количеством различных белков, и его конкретная функция во многом может зависеть от партнёров, с которыми он в данный момент взаимодействует. При этом, несмотря на большое количество взаимодействий α-актинина с различными сигнальными молекулами, остаётся неясной та роль, которую он выполняет в сигнальных процессах, и каким образом она осуществляется.

Таблица 3.1

Белок	Комментарии	Ссылки	
актин-связывающие белки			
винкулин	белок фокальных контактов, может	Belkin and Koteliansky,	
	связываться с плазматической мембраной	1987	
зиксин	белок фокальных контактов, обнаружен в ядре	Li and Trueb, 2001	
палладин	белок фокальных контактов	Parast and Otey, 2000	
титин	структурный компонент саркомеров	Young et al., 1998	
белки клеточной адгезии			
β1-,β ₃ -	участие в адгезии	Otey et al., 1990, Cattelino	
субъединицы		ct al., 1999	
интегринов			
β2-субъединица	участие в адгезии	Pavalko and LaRoche, 1993	
интегрина			
ICAM-1	участие в адгезии	Carpen et al., 1992	
ICAM-2	участие в адгезии	Heiska et al., 1996	
L-селектин	участие в адгезии	Pavalko et al., 1995	
синдекан 4	трансмембранный гликопротеин,	Greene et al., 2003	
	взаимоденствует с интегринами		

Белки, связывающиеся с немышечными изоформами α-актинина

сигнальные белки			
FAK	этой киназой актинин фосфорилируется по тирозину	Izaguirre et al., 2001	
РІЗ-киназа	85 кДа субъеденица соосаждается с	Shibasaki et al., 1994	
PKN	серин/треониновая протеинкиназа	Mukai et al., 1997	
MEKK1	Серин/треонин протеинкиназа, активатор МАР киназ и транскрипционного фактора NF-кВ	Christerson et al., 1999	
NF-κB	фактор транскрипции, солокализуется и совместно перераспределяется в ядро с α- актинином	Бабаков и др., 2004	
ERK		Leinweber et al., 1999	
CRP1	цистеин-богатый белок, имеющий LIM домен	Pomies et al., 1997	
GRK	α-актинин является потенциальным ингибитором всех членов семейства GRK	Freeman et al., 2000	
Рабфилин ЗА	мишень Rab3A малого GTP- связывающего белка	Kato et al., 1996	
AKT1	серин/треониновая протеинкиназа, связывается с а-актинином-4 – критический регулятор локализации и функционирования киназы	Ding et al., 2006	
прочие белки			
ADAM 12	металлопротеаза	Cao et al., 2001	
CLP-36	PDZ-LIM белок	Vallenius et al., 2000	
α-катенин		Knudsen et al., 1995	
β-катенин	связывается с а-актинином-4, сайт связывания перекрывается с Е- кадгенином	Hayashida et al., 2005	
ZASP/Cypher		Faulkner et.al., 1999	
MAGI-1	белок в подоцитах	Patrie et al., 2002	
E3KARP	PDZ-белок	Kim et al., 2002	
Tir	белок <i>E.Coli</i> , участвует в инвазии патогена	Goosney et al., 2000	
денсин	комплекс в синапсах	Walikonis et al., 2001	
BP180		Gonzalez et al., 2001	
ADIP		Asada et al., 2003	
A2A Rc	комплекс в синапсах	Burgueno et al., 2003	

БТШ 20		Tessier et al., 2003
BERP	белок, экспрессирующийся в мозге, и способный связываться с миозином V	El-Husseini et al., 2000
CaMKII	комплекс в синапсах	Walikonis et al., 2001
iNOS	регуляция активности NO синтазы при гипоксии в макрофагах	Daniliuc et al., 2003
Gplb-IX	гликопротеин кровяных пластинок	Feng et al., 2002
hrs	белок, ассоциированный с эндосомами	Yan et al., 2005
ZO-1	PDZ-содержащий белок, ходит в ядро	Chen et al., 2006
β/γ актин		Hara et al., 2006
кальмодулин		Hara et al., 2006
клатрин, динамин, адаптин-δ, β-NAP, p47A		Hara et al., 2006
миозин		Hara et al., 2006
hnRNP A1		Hara et al., 2006
G3BP		Hara et al., 2006
андрогеновый рецептор		Jasavala et al., 2006

Поскольку из литературы известно, что МЕКК1, являясь одним из активаторов транскрипционного фактора NF-kappaB, взаимодействует с альфа-актинином (Christerson et al., 1999), то возникло предположение, что NF-kappaB также может являться участником альфа-актинин –содержащих комплексов, связывая воедино процессы цитоскелетных перестроек и изменения экспрессии генов.

4.5. Транскрипционный фактор NF-кВ

Транскрипционный фактор NF-кВ индуцирует экспрессию ряда генов в клеточных линиях в ответ на большое число внешних и внутренних стимулов. Впервые NF-кВ был описан в 1986 году как ядерный фактор В-лимфоцитов, связывающийся с участком энхансера каппа-цепей иммуноглобулина. В дальнейшем участки связывания NF-кВ были обнаружены в промоторах многих генов. Выяснилось, что круг стимуляторов NF-кВ необычайно широк и включает форболовые эфиры, ростовые факторы, цитокины, активированные формы клеточных и вирусных онкогенов, УФ-облучение, бактериальные продукты и вирусные инфекции (Baldwin, 1996).

В настоящее время охарактеризованы члены семейства NF-кB/Rel и IкB. Для членов семейства NF-кB/Rel характерно наличие Rel- гомологичного домена (RHD, примерно 300 аминокислот) на N-конце, который участвует в ДНК связывании, димеризации и взаимодействии с IкB. Семейство IкB объединяет наличие множественных копий анкиринового повтора (около 30 аминокислот) на C-конце, которые взаимодействуют с Rel участком NF-кB (Baldwin, 1996).

Активный ДНК-связывающий NF-кВ - это димер. Наиболее изучен классический NF-кВ - гетеродимер р50 и р65, хотя описано много других гомо- и гетеродимеров. Разные димеры имеют свои особенности, включая сайты узнавания ДНК, специфичость клеточного типа, субклеточную локализацию, взаимодействие с разными формами IкB, различные пути активации. Все это увеличивает возможности NF-кВ в регуляции экспрессии разных генов.

Ингибиторный белок ІкВ удерживает NF-кВ в цитоплазме в неактивной форме, маскируя при этом NLS (nuclear localization signal) - последовательность ядерной локализации (Baeuerle and Baltimore, 1988, Liou and Baltimor, 1993). При активации происходит фосфорилирование и убиквитинизация ІкВ с последующей деградацией на протеосомах, а освобожденный NF-кВ выходит из комплекса с субъединицей ингибиторной И перемещается В ядро, где активирует соответствующие гены (Palombella et al., 1994). Такой механизм регуляции позволяет получить чрезвычайно быстрый ответ клетки на действие стимула. В экспериментах с использованием GFP и YFP конструкций было показано, что при действии на клетки линии HeLa ингибитором ядерного экспорта лептомицином В

даже в нестимулированных клетках как NF-кB, так и IкBα накапливаются в ядре, что может говорить о возможности постоянного «челночного» перемещения этих молекул между ядром и цитоплазмой. Авторы предлагают модель, в которой комплекс NF-кB-IкB диссоциирует в цитоплазме, затем субъеденицы поотдельности импортируются в ядро и там реассоциируют, причём диссоциация является лимитирующей стадией во всём процессе (Birbach et al., 2002).

4.5.1. Регуляция активности транскрипционного комплекса NF-кВ

Круг стимуляторов NF-кВ необычайно широк и включает форболовые эфиры, ростовые факторы, цитокины, активированные формы клеточных и вирусных онкогенов, УФ-облучение, бактериальные продукты и вирусные инфекции (Tam et al., 2001). Подробный обзор данных об индукторах NF-кВ и генах, активируемых этим транскрипционным фактором, представлен на интернет-сайте лаборатории Т. (www.nf-kb.org). Такое разнообразие Гилмора индукторов, способных активировать NF-кВ, в принципе говорит о способности совершенно различных путей передачи сигнала в клетке конвергировать на единой мишени – цитозольном комплексе NF-кВ/ІкВ. Исследование молекулярных механизмов этого явления поможет ответить на ряд фундаментальных вопросов, касающихся "перекреста" между многочисленными путями внутриклеточной передачи сигналов.

Механизм активации NF-кВ можно в общем виде представить следующим (1) NF-ĸB образом: стимуляция клеток индукторами приводит К фосфорилированию ингибиторного белка семейства ІкВ (для ІкВ-α - по остаткам серина 32 и 36), (2) фосфорилированный ІкВ подвергается убиквитинизации (ІкВ-а - по остаткам лизина 21 и 22), и (3) эти события вызывают быструю протеосомой 26S и активируют NF-кВ (Hu, 2003). деградацию ингибитора Потенциальные активаторы NF-кВ способны индуцировать почти полную деградацию молекул ІкВ (особенно ІкВ-α) в течение нескольких минут.

Ферменты, убиквитинизирующие фосфорилированный по N-терминальному концу IкВ-α, конститутивно активны и, следовательно, специфическая регуляция деградации ингибиторного белка и активации NF-кВ происходит на уровне фосфорилирования. Поиски IкВ-специфичной киназы привели к обнаружению высокомолекулярного IкВ/IKK киназного комплекса (IKK - IкB Kinase). Этот

комплекс был выделен из TNF- α -индуцированных клеток и оказался чувствителен к большинству индукторов NF-кВ. Уровень активности IKK определяет кинетику протеолитической деградации IкВ- α , а в его составе обнаружено большое число разных полипептидов. Идентифицировано три субъединицы IKK, непосредственно связанные с его киназной активностью: каталитические полипептиды IKK α и IKK β , и регуляторная – IKK γ /NEMO. Нативные комплексы IKK, выделенные из клеток млекопитающих, состоят из IKK- α и IKK- β - гомо- или гетеродимеров и неопределенного количества IKK- γ (Zandi and Karin, 1999, Karin and Ben-Neriah, 2000).

Активность транскрипционного фактора NF-кВ регулируется составом гомоили гетеродимеров ІКК комплексов, имеющих различающиеся мишени и активирующихся через разные сигнальные каскады. Возможно, в качестве мишеней разные димеры используют различные ингибиторные молекулы семейства ІкВ. Члены семейства ІкВ обладают разным сродством к разным Rel/NFκВ димерам, и таким образом, опосредованно участвуют В регуляции транскрипции генов – мишеней через комплексы Rel/NF-кВ. Наконец, сам ядерный фактор Rel/NF-кВ может быть представлен разными участниками димерных транскрипционных комплексов, имеющих различное сродство к элементам различных групп генов. Таким образом, активность всех белков, которые участвуют в сигнальном пути NF-кB, сложна, многокаскадна и зависит от специфичности и интенсивности работы большого числа регуляторов.

4.5.2. Сигнальные каскады, вовлеченные в активацию NF-кВ

В активации NF-кВ могут участвовать почти все известные сигнальные пути, причем их специфичность зависит от типа клеток и стимула. Наиболее изучен специфический сигнальный каскад, индуцированный в клетках при воздействии TNF-α. Важным компонентом этого каскада является NF-кВ-индуцирующая киназа MAP3K – NIK. Эта киназа способна прямо взаимодействовать с адапторным белком TRAF2 (TNF receptor associated factor), связанным с рецептором TNF-α и через активацию IKK участвовать в регуляции NF-кВ. С помощью двугибридного анализа NIK-киназа была обнаружена в комплексе с субъединицей IKK-β (Regnier et al., 1997). Было показано, что эта киназа способна фосфорилировать IKK-β по остатку серина в положении 176 (каталитический домен) и активировать комплекс IKK (Nakano et al., 1998).

Другой киназой, выявленной в ассоциации с комплексом IKK, является MEKK1 (Yin et al., 1998). Обе субъединицы IKK киназы содержат в каталитических доменах последовательность Ser-X-X-Ser (X – любой аминокислотный остаток), которая является канонической для активации киназой MEKK1. Сверхэкспрессия NIK или MEKK1 усиливает способность IKK-комплекса фосфорилировать молекулы IkB и активировать NF-кB (Ling et al., 1998).

Недавно была обнаружена ещё одна ІКК-ассоциированная киназа. Было показано, что в клетках линии 293, HeLa и карциноме ME-180 в активации NF-кВ фактором TNF-α также может участвовать PI3-киназа (PI3K), действующая через Akt-киназу, которая способна напрямую фосфорилировать IKK-α (Ozes et al., 1999). В этих клетках оба каскада, TRAF2-NIK и PI3K-Akt, кооперируются в процессе фосфорилирования ІКК субъединиц. С другой стороны, в фибробластах кожи человека PI3K-Akt путь не влияет на TNF-α-индуцированную активацию NF-кВ. Показано, что ростовые факторы сыворотки, в частности фактор роста тромбоцитов, активируя пролиферацию одновременно супрессируют апоптоз. Стимуляция пролиферации фибробластов фактором PDGF индуцирует экспрессию протоонкогена с-тус и может одновременно приводить к активации двух процессов – пролиферации и апоптоза. Однако, апоптоз блокируется активацией антиапоптотического каскада Ras-PI3K-Akt-IKK-NF-кВ (Romashkova and Makarov, 1999). Таким образом, пролиферативный сигнал от фактора роста тромбоцитов, включающий проапоптотический ген с-тус, и антиапоптотический сигнал, в точке NF-кВ. Эти данные в определенной мере расходятся, по-видимому, помогают понять, почему трансформация клеток так зависит от активации NF-кВ – фактора, который одновременно может работать и как пролиферативный посредник, и как антиапоптотический (Kucharczak et al., 2003).

Стрессорные воздействия на клетку (ультрафиолетовое облучение, оксидативный стресс) активируют JNK и p38-киназные пути, которые также являются активаторами NF-кB. Универсальными регуляторами активности транскрипционных факторов семейства Rel служат активные формы кислорода. В большинстве клеточных линий активность NF-кB, индуцированная различными

стимулами, блокируются с помощью различных антиоксидантов (Meyer et al., 1993).

4.5.3. Участие в адгезии и связь с цитоскелетом

Существует ряд работ, указывающих на то, что NF-кB, с одной стороны, ГТФазами, активируется белками внеклеточного матрикса И малыми принимающими участие в регуляции структуры актинового цитоскелета (Qwarnstrom et al., 1994; Perona et al., 1997; Xu et al., 1998), a с другой, стимулирует адгезию и миграцию клеток (Yebra et al., 1995; Benoliel et al., 1997). Было показано, что процессы адгезии регулируют активность NF-кВ, и что изменения его активности коррелируют с перестройками актинового цитоскелета (Zhu et al., 1998). Эти данные дают основание предполагать возможность непосредственного участия NF-кВ в процессах адгезии и формирования структуры актинового цитоскелета.

Относительно взаимодействия NF-кВ со структурами цитоскелета имеются только немногочисленные косвенные данные. Так, например, было показано, что разрушение системы микротрубочек различными агентами (нокодазолом, колхицином и др.) приводит к активации NF-кB, а таксол (агент, стабилизирующий микротрубочки) блокирует индукцию NF-кВ в тех же условиях. В то же время разрушение актинового цитоскелета цитохалазином D не вызывает сходного результата. Авторы делают вывод 0 специфическом участии системы микротрубочек в регуляции активности транскрипционного фактора (Rosette and Karin, 1995). С другой стороны, в нашей лаборатории было показано, что транскрипционный фактор NF-кВ солокализуется с актиновыми структурами: стресс-фибриллами И фокальными контактами. Кроме того. NF-ĸB взаимодействует с фибриллярным актином in vitro (Are et al., 2000).

Ранее в нашей лаборатории было показано, что α-актинина-4 и рб5 субъединица NF-kappaB солокализуются в цитоплазме клеток A431 и совместно мигрируют в ядро под действием ЭФР (Бабаков и др., 2003). Предобработка клеток A431 цитохалазином перед действием ЭФР, усиливает накопление рб5 в ядерных экстрактах этих клеток, что позволяет говорить о роли актинового цитоскелета как скаффолда для сигнальных молекул, входящих в состав комплекса NF-кB.

Транспорт в ядро α-актинина-4 под действием цитохалазина был отмечен не для всех типов клеток. Механизм транспорта α-актинина-4 в ядро под действием этих агентов совершенно не изучен. Можно предполагать, что снижение сродства к актиновым филаментам за счёт разрушения актинового цитоскелета цитохалазином или изменения уровня фосфатидилинозитолфосфатов в результате действия вортманнина приводит к перераспределению α-актинина-4 в цитоплазму и затем в ядро. С другой стороны, не исключен ограниченный протеолиз α-актинина и транспорт его фрагментов.

Ряд авторов на основании того, что действие цитохалазина не препятствует транспорту NF-кВ в ядро, делают вывод о неучастии актинового цитоскелета в этом процессе (Garcia-Garcia et al., 2001, Chen et al., 2003). По нашему мнению, действие цитохалазина на актиновый цитоскелет неоднозначно. Разборка актиновых филаментов цитохалазином одновременно освобождает большое количество актин-связывающих белков и сигнальных комплексов. В таком случае наши данные о совместном перераспределении α-актинина-4 и рб5 в ядро под действием цитохалазина могут говорить в пользу существования сигнального комплекса, содержащего эти белки, который перемещается в ядро при откреплении от актинового цитоскелета. С другой стороны, имеются данные о важной роли внутриклеточного Ca2+ для транспорта NF-кВ в ядро. Введение внутриклеточных хелаторов Ca2+ полностью блокирует транспорт NF-кВ в ядро (Chen et al., 2003). Но хорошо известно, что взаимодействие клеточных изоформ α-актинина с актином как раз регулируется Ca2+, что тоже говорит в пользу α-актинина как белка, опосредующего взаимодействие NF-кВ и актина.

Таким образом, несмотря на большое число работ, появившихся в последнее время, и посвященных транскрипционному фактору NF-kappaB, ответственные за его регуляцию специфические компоненты сигнальных каскадов в большей степени неизвестны. Также мало известно о его цитоплазматической локализации, путях транспорта в ядро и взаимодействии с цитоскелетом. Так как NF-кВ участвует в регуляции жизненно важных клеточных процессов, изучение регуляции его активности может быть важно для понимания процессов клеточной пролиферации, трансформации, дифференцировки и апоптоза.

Совокупность имеющихся в литературе фактов приводит к предположению о том что существующие в цитоплазме независимые от цитоскелета актинсвязывающие белки могут принимать участие в процессах реорганизации цитоскелета под влиянием внешних лигандов и являться предшественниками возникающих новых структур, а также являться посредниками в процессах передачи внутриклеточныъх сигналов. Для того чтобы приблизится к пониманию функций подобных независимых белковых комплексов необходимо установить их состав и поведение во время перестройки актиновых стуктур и при проведении сигналов в клетках под влиянием внешних агентов.

5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1. Культивирование клеток

В работе использованы нормальные эмбриональные фибробласты крысы REF, иммортализованные ранним районом E1A аденовируса 5-го типа человека и трансформированные E1A в комплементации с онкогеном cHa-ras (Поспелова и др., 1990), а также клетки линий A431 и HeLa, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии PAH). Клетки культивировали в среде Дальбекко (DMEM, Биолот) с добавлением 10% сыворотки крови эмбрионов коров (Биолот) при 37⁰C в атмосфере 5% CO₂.

5.2. Конфокальная иммунофлуоресцентная микроскопия

Выявление распределения актина, тропомиозина и р65 субъединицы NF-кВ В препаратах распластанных клеток проводили методом непрямой иммунофлуоресценции. Клетки снимали с поверхности культуральных сосудов смесью растворов 0.25% трипсина и 0.02% версена в соотношении 3:7, после чего 1.6×10⁴ клеток наносили в 100 мкл суспензии на покровные стёкла и культивировали в течение ночи при 37°С в атмосфере 5 % СО₂. Затем клетки фиксировали 3%-ным формалином на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, пермеабилизовали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 на PBS 15 мин при комнатной температуре и наносили первые моноклональные антитела мыши против тропомиозина, р65-субъединицы транскрипционного фактора NF-kB (Sigma, США) или альфа-актинина-4 (ImmunoGlobe, Германия), а затем окрашивали вторыми кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши, коньюгированными с FITC или TRITC (Sigma, США), в течение 40 мин при комнатной температуре. Структуры актинового цитоскелета выявляли окраской родамин-фаллоидином или FITC-фаллоидином в течение 10 мин при 37°С. В качестве заключающей среды использовали Mounting medium (Pharmacia Biotech., Швеция). Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL. Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм и HeNe-лазер с длиной волны 543 нм. Применяли раздельное

сканирование для каждого сигнала. Совмещение двух сигналов проводили с помощью компьютерной программы Leica Confocal Software.

5.3. Экстракция цитоплазматических белковых комплексов

Экстракцию белковых комплексов проводили с помощью разработанной методики быстрого локального лизирования мембраны клеток SF-буфером, позволяющей выделять белки без разрушения цитоскелета. Детали разработанного метода приведены в разделе «Результаты».

5.4. Разделение белковых экстрактов методом гель-хроматографии

Для выявления мультимолекулярных белковых комплексов клетки лизировали SF-буфером, быстрый и медленый экстракты фильтровали через фильтр с размером пор 0.45 мкм (Millipore, США) и наносили на колонку superose Healthcare, CIIIA) высокоэффективной 6HR (GE В системе жидкостной (Pharmacia, хроматографии Pharmacia System Швеция). Предварительную калибровку колонки осуществляли с помощью набора белков с разной молекулярной массой (Amersham, Швеция): рибонуклеаза А (MW 13700). овальбумин (MW 48100), альбумин (MW 67000), альдолаза (MW 184000), каталаза (MW 232000), ферритин (MW 401400), тиреоглобулин (MW 669000), а также декстран голубой 2000 (MW 2000000). В процессе хроматографии выяснилось, что сахароза и Тритон X-100, которые входят в состав SF-буфера, препятствуют разделению, поэтому элюцию проводили F-буфером (100 мМ NaF, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ К-фосфатный буфер рН 7.0), не содержащим этих компонентов. Скорость элюции была 0.2 мл/мин, фракции собирали на льду по 0.4 мл. Относительное количество белка в подвижной фазе на выходе из колонки регистрировали в динамическом режиме с помощью оптического детектора UV-1 (Pharmacia) при длине волны 280 нм. К собранным фракциям добавляли 0.05%-ный дезоксихолат натрия и 5%-ную трихлоруксусную кислоту, замораживали и осаждали белки 5-минутным центрифугированием при 15000 g.

5.5. Предобработка клеток формальдегидом

Для того, чтобы сохранить целостность выделяемых нестабильных мультимолекулярных белковых комплексов была применена прижизненная предобработка клеток формальдегидом в сверхнизких концентрациях (30 и 100 мкМ). Клетки при этом выживают и продолжают активно функционировать, а формальдегид образует обратимые сшивки между близко лежащими (порядка 2 Å) Растворы готовили следующим образом: формальдегид 38% (Sigma, белками. США) разводили до 1М концентрации (≈ в 12,7 раза), затем 1мкл 1М раствора разводили в 1мл PBS, и этот 1мл 1мМ раствора разводили в 32 мл среды DMEM без сыворотки. Конечный 30 мкМ раствор формальдегида нагревали до 37°С перед добавлением к клеткам. Клетки перед экспериментом промывали тёплым раствором PBS, добавляли к ним приготовленный 30 мкМ раствор и оставляли на 10 минут в инкубаторе в стандартных условиях (37°С, 5 % СО2). Затем формальдегид отбирали и останавливали реакцию 125мМ раствором глицина на PBS в течение 10 минут при комнатной температуре. После этого клетки лизировали буфером, содержащим 100 мМ NaF, 50мМ KCl, 2мМ MgCl2, 10мМ фосфатный буфер pH 7.6, 1mM EGTA, 1M сахарозу, 1% Triton-X100 и протеазные ингибиторы.

5.6. Определение состава выделенных цитоплазматических белковых комплексов

Осажденные из фракций после хроматографического разделения белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS (Laemmli, 1970). Использовали 12.5%-ный гель. После электрофореза гель окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым или переносили на мембрану Immobilon-P (Millipore, CША) (Towbin, 1979). Перенос белков с геля на мембрану проводили в Трис-глициновом буфере pH 8.3, с 10%-ным метанолом и 0.1%-ным SDS. Иммуноблотинг проводили в соответствии с ECL Western blotting protocols (Amersham). Мембрану промывали 20 мин буфером TBST (25 мМ Трис-HCl pH 7.4, 150 мМ NaCl и 0.1% Твина-20) с последующим блокированием 5%-ным обезжиренным сухим молоком, разведенным на TBST, в течение 1 ч. Для усиления сигнала при иммуноблотинге использовали субстраты SuperSignal West

Dura Extended Duration Substrate (Pierce, США). Хемилюминесцентное излучение регистрировали при помощи системы ChemiDoc (Bio-Rad, CША). В работе использовали моноклональные антитела мыши против высокомолекулярных изоформ тропомиозина, тубулина и бета-актина (Sigma, США), поликлональные кроличьи антитела против р65-субъединицы транскрипционного фактора NF-кВ (Abcam, Англия), α-актинина-4 и α-актинина-1 (Santa Cruz, США). В качестве вторых антител использовали кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши, и козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). При проведении иммунопреципитации для удаления неспецифически связывающихся белков в полученные в результате гельфильтрации фракции предварительно добавляли сефарозу с пришитым белком G (Amersham, Швеция) из расчета 50 мкл на 1 мл и инкубировали, аккуратно 4°C. перемешивая, 1 Ч при После инкубации сефарозу осаждали центрифугированием при 2000 g, к супернатанту добавляли антитела и инкубировали, аккуратно перемешивая, в течение ночи при 4°C. Затем добавляли сефарозу с белком G и инкубировали, аккуратно перемешивая, в течение 4 ч при 4°С. Образовавшиеся комплексы с сефарозой осаждали центрифугированием при 2000 g, промывали 4 раза раствором PBS и разделяли методом электрофореза с последующим иммуноблотингом. При сравнительном анализе содержания белков в электрофоретических пробах нагрузки выравнивали по количеству общего белка в пробе, определённого методом Мэрион Брэдфорд (Bradford, 1976).

5.7. Идентификация белков методом масс-спектрометрии

Для последующей масс-спектрометрии проводили гидролиз белка трипсином в полиакриламидном геле. Для этого кусочек геля размером 1-2 мм³ для удаления красителя дважды промывали путем инкубации в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃ в течение 30 мин при 37°С. После удаления раствора, для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 12 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 12 ч при 37°С, затем к раствору добавляли 8 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Полученный раствор с пептидами использовали для получения MALDI-масс-спектров. Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили следующим образом: гидролизаты растворяли в 5 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде, на мишень 1 раствора образца И 0.3 наносили смесь МКЛ МКЛ раствора 2.5дигидроксибензойной кислоты (Aldrich, 10 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле в воде с 0.5%-ной трифторуксусной кислотой) и высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на тандемном MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моде после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005 %. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков млекопитающих с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха И возможной модификации цистеинов акриламидом.

5.8. Обработка клеток биологически активными молекулами

100 мкл суспензии клеток (в концентрации 1×10^5 кл/мл среды) наносили на чистые обезжиренные покровные стекла или на силиконизированные стекла, покрытые фибронектином, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5 % CO2. Через 1 ч (для клеток, распластанных на фибронектине) и через сутки (для клеток, распластанных на чистых стеклах) среду меняли на свежую, содержащую LPA, ЭФР или TNF- α в определенной концентрации, и снова помещали клетки в инкубатор. Рабочие растворы LPA, ЭФР или TNF- α получали из исходных растворов, содержащих 1мг/мл LPA, ЭФР или TNF- α , и 10 нг/мл БСА. Исходные растворы разводили до необходимой концентрации (20 нг/мл LPA, 10 нг/мл ЭФР, 10 нг/мл TNF- α) средой DMEM (Биолот, РФ) без сыворотки. Срок действия LPA, ЭФР или TNF- α составлял 5, 10 и 30 минут. 5.9. Определение внутриклеточного содержания активных форм кислорода

Данная часть работы проводилась совместно с Отделом внутриклеточной сигнализации и транспорта ИНЦ РАН.

При измерении внутриклеточного содержания активных форм кислорода (АФК), для того чтобы вызвать цитоскелетные перестройки на клетки А431 действовали LPA, кроме того, для подавления образования АФК использовали 2,4окситиазолидин (OTZ). Для этого перед экспериментом среду, в которой культивировались клетки, меняли на свежую, содержащую 10mM ОТZ. Для получения рабочего раствора ОТ дбрали навеску сухого ОТ и растворяли в 0,9% NaCl, затем доводили 2N NaOH до pH=7-8. Полученный раствор разводили до концентрации 10mM в среде DMEM с сывороткой или без неё. Клетки стимулировали ОТZ в течение 4 часов. При этом сначала раствор ОТZ добавляли в чашки Петри с полной питательной средой, в которых культивировали клетки, на 2.5 часа. Далее клетки снимали раствором трипсин-версена в соотношении 3:7, дважды отмывали центрифугированием (1000 об/ мин., ПО 5 мин.) в бессывороточной среде, содержащей ОТZ. Затем на силиконизированные стекла, покрытые фибронектином, наносили по 100 мкл суспензии клеток (1 х 105 кл/мл) и инкубировали ещё 1 час. После этого клетки либо фиксировали сразу (контрольные клетки), либо стимулировали LPA в течение 5, 10 и 30 минут (в зависимости от экспериментальной точки), а затем фиксировали.

Внутриклеточное содержание ΑФК определяли по изменению флуоресценции АФК-зависимого зонда H2DCF-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate). Это проникающее в клетку вещество представляет собой неполярное и нефлуоресцирующее соединение. Внутри клетки в результате гидролиза образуется нефлуоресцентное соединение DCFH, которое в присутствии АФК (главным образом, перекиси водорода) окисляется до флуоресцирующего аналога DCF (dichlorofluorescein). Увеличение интенсивности флуоресценции пропорционально образованию АФК. Зонд использовали в концентрации 4 мкМ. Флуоресценцию возбуждали светом 490 нм и регистрировали при 520 нм. Клетки инкубировали в течение 5 мин с H2DCF-DA, после чего измеряли интенсивность флуоресценции отдельных клеток. Измерения производили в растворе Хенкса, pH 7.4 при 37 °C.

Интенсивность флуоресценции H2DCF-DA в одиночных клетках измеряли с помощью флуориметрической установки, которая состояла из люминесцентного микроскопа, снабженного ртутной лампой постоянного тока ДРШ-250-2, необходимыми светофильтрами И фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Усиленный сигнал через 12-разрядный аналого-цифровой преобразователь L-154 (L-card, Москва) записывали на жесткий диск персонального компьютера для последующего анализа. Фотометрическая камера представляла собой плоский капилляр, верхней плоскостью которого являлось покровное стекло с клетками, обращенными поверхностью вниз. Использовали объектив Н1 100 (Карл Цейсс, Йена). После опытов жизнеспособность клеток оценивали по их способности окрашиваться трипановым синим. Полученные данные обрабатывались В программе Microsoft Office Excel. Результаты, представленные в виде графиков, получены при измерении не менее чем 30 клеток в 5-7 идентичных сериях экспериментов.

6. РЕЗУЛЬТАТЫ

6.1. Разработка метода выделения цитоплазматических мультимолекулярных белковых комплексов без нарушения структуры актинового цитоскелета.

В распластанных на стекле фибробластах REF было обнаружено большое количество частиц, окрашиваемых антителами к тропомиозину (рис. 2), поэтому именно эти клетки явились основным объектом для выделения белковых комплексов, включающих актин-связывающие белки, не связанные с цитоскелетом. Для выделения этих частиц нами был разработан метод быстрой экстракции.



Рис. 2. Частицы тропомиозина в цитоплазме фибробласта REF.

А – фибробласт REF, актин окрашен красным, тропомиозин – зелёным. Жёлтый – колокализация белков. Б – отмеченная рамкой область на большем увеличении. Синяя стрелка – выявленные антителами против тропомиозина частицы в цитоплазме.

Стандартные методы выделения цитоплазматических белков включают сталию полного разрушения клеток с последующей экстракцией буферами. Механическое воздействие и соответствующими детергенты, используемые при такой процедуре, могут приводить к разрушению или изменению состава выделяемых комплексов. Для того чтобы получить их в максимально неповреждённом виде, нами был разработан новый метод выделения, позволяющий сохранить целостность выделяемых частиц без нарушения структур цитоскелета. Суть метода заключается в образовании локальнах разрушений

плазматической мембраны и быстром выделении цитоплазматических белковых комплексов с применением особого лизирующего SF-буфера pH 7.0 (100 мМ NaF, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ фосфатный буфер, 1 мМ EGTA, 1 М сахароза, 1 % Тритон X-100, 0.1 мМ PMSF), сохраняющего исходное соотношение между мономерными и полимерными формами актина (Blikstad and Carlsson, 1982). Чашку с монослоем клеток промывали PBS, после чего PBS тщательно отбирали, затем ее ставили на лед и на поверхность клеток каплями наносили небольшое количество SF-буфера, достаточное чтобы локально лизировать клеточные мембраны, но не разрушить клетку полностью (из расчёта 100 мкл на одну чашку 100 мм в диаметре). В ходе анализа разных сроков воздействия было установлено, что для подобной обработки клеток достаточно 1 мин, после чего цитоплазматические белки способны выходить в окружающую среду. Для увеличения количества выделяемых комплексов быструю экстракцию проводили в течение 3 мин. Затем чашку наклоняли (схема на рис. 3) и в течение 1 мин собирали буфер с вышедшими из клеток белками цитозоля («быстрый» экстракт), который при необходимости переносили на следующую промытую PBS чашку с клетками, чтобы повысить концентрацию белка в получаемом экстракте. Процедура последовательного переноса лизирующего буфера с чашки на чашку позволяла накопить достаточное для дальнейшей хроматографии количество белка без его разбавления буфером.



Рис. 3. Быстрая экстракция белков лизирующим SF-буфером. А, Б, В – Состояние клеток A431 до лизирования (А), во время первого нанесения лизирующего буфера (Б) и после отбора быстрого экстракта (В). Клетки промывали PBS (Г), лизирующий SF-буфер наносился на 3 мин (Д), затем чашку наклоняли и экстракт собирали в течение 1 мин (Е; «быстрый экстракт»: 1 на схеме). Масштабный отрезок – 50 мкм.

Для того чтобы убедиться в том, что высокомолекулярные комплексы вышли из клеток, на оставшиеся после получения быстрого экстракта клетки повторно наносили SF-буфер, проводили лизис в течение 10 мин на льду, собирали разрушенные клетки скребком; затем из них центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин осаждали тритон-нерастворимую фракцию (цитоматрикс), а супернатант отбирали («медленый» экстракт). Для стабилизации выделяемых комплексов применяли описанный в литературе метод предварительной обработки клеток формальдегидом для образования сшивок между взаимодействующими белками, который используется обычно для выделения белковых комплексов и комплексов белков с нуклеиновыми кислотами. Для этого в клеточную среду на 10 формальдегид в концентрации 30 мин добавляли мкМ, затем реакцию останавливали добавлением 0.125 М раствора глицина в PBS на 10 мин при

комнатной температуре и далее проводили экстракцию белковых комплексов нанесением SF-буфера.

Прежде всего, необходимо было выяснить, возможно ли выделить белковые комплексы, не связанные с актиновыми структурами, без полного разрушения клеток с помощью разработанного метода, а также установить, остаются ли частицы в клетках после быстрой экстракции. Наблюдения за клетками A431 в процессе обработки SF-буфером (*A*,*Б*,*B* на рис. 3) и данные иммунофлуоресценции свидетельствуют о том (рис. 4), что после быстрой экстракции клетки остаются распластанными и сохраняют исходную структуру цитоскелета, а ядра остаются неповреждёнными. При этом тропомиозиновые частицы после быстрой экстракции перестают выявляться в области цитоплазмы моноклональными антителами против высокомолекулярных изоформ тропомиозина.



Рис. 4. Сохранение структуры актинового цитоскелета при быстрой экстракции цитоплазматических белков.

Клетки A431 до (A, C) и после (B, D) быстрой экстракции. Красным окрашен актин, зелёным – тропомиозин (A, B) и p65 субъединица NF-кB (C, D). Масштабный отрезок – 10 мкм.



Рис. 5. Сравнение профилей элюции «быстрого» и «медленного» экстрактов и содержания тропомиозина во фракциях.

1, 2 – гель-хроматография и вестерн-блот фракций «быстрого» (1) и «медленного» (2) экстрактов из клеток REF. ТМ – окраска моноклональными антителами против тропомиозинов, Ас – окраска моноклональными антителами против бета-актина. 800, 400 и 50 кДа – калибровочные молекулярные массы фракций.

Для проверки эффективности выделения мультимолекулярных белковых комплексов с помощью нового разработанного метода была проведена сравнительная оценка результатов быстрой экстракции и повторной, медленной экстракции тех же клеток с помощью гель-хроматографии на колонке Superose 6 (профили элюции 1 и 2 на рис. 5). Проведенный электрофоретический анализ с последующим вестерн-блотом показал, что при быстрой экстракции несколько высокомолекулярных изоформ тропомиозина и актин выявляются в области 500-800 кДа. В «медленных» экстрактах из полностью разрушенных клеток после быстрой экстракции комплексов, содержащих тропомиозин, В высокомолекулярной области обнаружено не было, что свидетельствовало о том, что они действительно были выделены в процессе быстрой экстракции. Актин после медленной экстракции выявлялся только в низкомолекулярной области, соответствующей мономерному белку (рис. 5).

6.2. Определение состава мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих тропомиозин.

Для того чтобы выяснить, какие eщë белки входят В состав высокомолекулярных комплексов, содержащих тропомиозин, но не связанных с цитоскелетом, была проведена иммунопреципитация моноклональными антителами против высокомолекулярных изоформ тропомиозина из объединенных фракций 13-16, полученных после гель-хроматографии быстрого экстракта из фибробластов. В этих фракциях содержались комплексы, соответствующие молекулярным массам в пределах 500-800 кДа.



Рис. 6. Выделение из цитозоля фибробластов тропомиозиновых частиц и анализ их белкового состава. Анализировали состав иммунопреципитата из фракций выделенных рамкой.

А – электрофореграмма после гель-фильтрации цитозоля фибробластов, полученного методом быстрой экстракции (М – маркер). Б – определение с помощью вестерн-блота фракций, содержащих тропомиозин (14-17 – номера фракций, соответствующие молекулярным массам 500-800 кДа). Г – тропомиозин в составе выделенных с помощью моноклональных антител высокомолекулярных комплексов, вестерн-блот. В – выявленные с помощью масс-спектрометрии белки в составе тропомоизиновых комплексов (электрофорез). L – положительный контроль, клеточный лизат, mAb – моноклональные антитела TM311, IP – преципитат, sup – супернатант после преципитации.

При электрофоретическом разделении полученного иммунопреципитата помимо трёх белковых полос в области 35-40 кДа, соответствующих изоформам тропомиозина, были дополнительно выявлены ещё мажорные полосы в областях 70, 90 и 200 кДа. Участки геля, соответствующие мажорным полосам, были вырезаны и с помощью масс-спектрометрии было установлено, что полоса в области 200 кДа соответствует миозину-9 (немышечная изоформа 1), а полосы 70 и 90 кДа соответствуют hsp70 и hsp90 (рис. 6).

6.3. Определение состава мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих альфа-актинин-4.

Аналогичный подход к выделению мультимолекулярных белковых комплексов, но содержащих не тропомиозин, а альфа-актинин-4 и р65 субъединицу транскрипционного фактора NF-кB, был применен к клеткам A431, в которых были обнаружены эти белки в состоянии не связанном с цитоскелетом. Для стабилизации выделяемых комплексов был применён метод формальдегидной сшивки.



Рис. 7. Структура актинового цитоскелета в клетках A431, распластанных на фибронектине, выявленная на разных сроках обработки клеток 30 мкМ формальдегидом. Окраска FITC-фаллоидином. Контроль – не стимулированные клетки; 5 мин, 10 мин, 30 мин – клетки через 5, 10 и 30 минут после добавления 30 мкМ формальдегида.

Используя малые (30 мкМ) концентрации формальдегида для стабилизации мультимолекулярных комплексов, мы проверили, как влияют такие воздействия на жизнеспособность клетки. Обнаружено, что при таких воздействиях клетки претерпевают специфические изменения цитоскелета, но остаются живыми и активно функционирующими (рис. 7). В контроле клетки, окрашенные FITCфаллоидином, обладают типичной для A431 структурой актинового цитоскелета со стресс-фибрилами и радиальными актиновыми пучками. Через пять минут после добавления 30 мкМ формальдегида в клетках начинаются активные цитоскелетные перестройки, приводящие к образованию большого количества тонких вытянутых филоподий. Через 10 минут после добавления формальдегида в клетках происходит полная разборка актиновых пучков, на периферии обнаруживается множество коротких выростов, а через полчаса клетки начинают восстанавливать исходный фенотип, включая стресс-фиблиллы и радиальные пучки актина, по периферии образуется ламелла. Сходные результаты были получены при действии формальдегида в концентрации 100 мкМ (данные не представлены). Таким образом, несмотря на активные перестройки цитоскелета, к 30 минутам после добавления 30 мкМ формальдегида клетки приближаются к исходному (как до воздействия) состоянию. При выделении комплексов мы действовали на клетки формальдегидом 10 мин, затем реакция останавливалась добавлением 0.125 М глицина на 10 мин, и таким образом вместе с промежуточными отмывками общее время воздействия на клетки составляло 30 мин, и к началу выделения методом быстрой экстракции мультимолекулярный комплексов, содержащих альфаактинин-4, актиновый цитоскелет снова находился в исходном состоянии.



Рис. 8. Выявленные во фракциях после гель-фильтрации белки α-актинин-1 (аА1), α-актинин-4 (аА4), р65-субъединица NF-кВ (р65), тубулин (Tub) и тропомиозин (TM).

В процессе предыдущих исследований нашей лаборатории было установлено, что α-актинин-4 солокализуется в цитоплазме и совместно мигрирует в ядро с рб5субъединицей транскрипционного фактора NF-кВ (Бабаков и др, 2004), а полноразмерный α-актинин-4 и фрагменты α-актининов 1 и 4 выявляются во фракции белков, прочно связанных с хроматином (Большакова и др., 2008). Эти данные давали основание предполагать, что α-актинины могут принимать участие в проведении сигнала, поэтому было решено провести анализ наличия этих белков в высокомолекулярных фракциях при гель-хроматографическом разделении Тритон X-100 – растворимой фракции лизата клеток A431. При анализе полученных фракций методом иммуноблотинга было обнаружено, что белок рб5 обнаруживается с разной интенсивностью во фракциях 12–17. При этом наибольшее количество данного белка выявляется во фракциях 13 и 15, 16 (рис. 8). α -Актинин-1 был выявлен в высокомолекулярной области порядка 800 кДа (фракции 11–14 на рис. 3), а α -актинин-4 в большем количестве в 15 фракции. В связи с тем, что р65 способен взаимодействовать с обеими изоформами, то такое двойное распределение вполне объяснимо. Таким образом, было установлено, что в одних и тех же фракциях одновременно обнаруживаются белки р65, α -актинины 1 и 4. Так как в этой высокомолекулярной области может находиться ряд различных мультимолекулярных комплексов, то для того чтобы выяснить, входят ли альфаактинин-4 и р65 в состав одного комплекса, был применён метод перекрестной иммунопреципитации антителами против этих белков из высокомолекулярных фракций, полученных после гель-хроматографического разделения лизата клеток линии A431. В результате иммунопреципитации поликлональными антителами против альфа-актинина-4 и р65 из фракций были выделены комплексы, сходные по интенсивности и расположению электрофоретических полос (рис. 9).



Рис. 9. Электрофоретическая картина разделения иммунопреципитатов из фракций 12-16. Дорожки: М – маркер; Ab – негативный контроль, поликлональные кроличьи антитела к α-актинину-4; aA4, p65 – комплексы, осажденные антителами против α-актинина-4 и p65-субъединицы NF-кB.

Иммуно-блотинг показал, что при иммунопреципитации из объединённых высокомолекулярных фракций антителами против α-актинина-4 в комплексе с ним действительно выявляется белок рб5. α-Актинин-4 при этом представлен на блоте двумя полосами, соответствующими полноразмерному белку и меньшему количеству его фрагмента 75 кДа. При иммунопреципитации из фракций антителами против рб5, в выделенном белковом комплексе выявляется α-актинин-

4, который в большей степени представлен фрагментом 75 кДа, но не выявляется αактинин-1 (рис. 10). Таким образом показано, что р65 входит в комплекс только с 4 изоформой α-актинина.



Рис. 10. Вестерн-блот анализ иммунопреципитатов, осажденных антителами против α-актинина-4 (IP: aA4) и p65-субъединицы NF-кВ (IP: p65); в комплексе с p65 выявлены α-актинин-4 (aA4; белая стрелка – полноразмерный, чёрная стрелка – фрагмент 75 кДа), тубулин (Tub) и тропомиозин (TM), не выявлен α-актинин-1 (aA1).

Так как при гель-хроматографическом разделении на колонку наносился лизат клеток А431, полученный по обычной методике, включающей стадию полного разрушения клеток, возникло опасение, что мультимолекулярные комплексы могут разрушаться в процессе выделения или изменять свой состав в результате присоединения посторонних белков, исходно входящих в структуры цитоскелета. Поэтому далее мультимолекулярные комплексы были выделены из быстрого экстракта с применением предварительной формальдегидной сшивки близко расположенных белков, без разрушения клеток и разделения на колонке. Были сопоставлены электрофореграммы, полученные при разделении комплексов, содержащих α-актинин-4, выделенные из суммарной высокомолекулярной фракции после гель-хроматографии, и из быстрого экстракта с применением формальдегидной сшивки. При этом оказалось, что комплексы сходны по трём полосам в области 70 и 90 кДа, содержащим белки теплового шока и α-актинин, но в выделенных из быстрых экстрактов комплексах есть дополнительные полосы как
в низко-, так и в высокомолекулярной области (рис. 11). Это подтвердило исходное предположение о том, что в процессе разрушения клеток часть белков могут исчезать из состава комплексов. Всего было обнаружено 15 белковых полос с массами от 40 до 500 кДа в комплексах α-актинина-4, выделенных из быстрого экстракта с применением формальдегидной сшивки. В результате массспектрометрического анализа (см. Приложение) удалось идентифицировать белковый состав 11 из них (рис. 11). Это оказались плектин-1, спектрин, миозин-9, α-актинин-4, β-актин, цитоскелетные изоформы кератинов I и II типов (18, 5 и 6А), тубулин, а также белки семейства белков теплового шока – hsp70 и hsp90. Так как суммарная масса всех обнаруженных белков значительно превышала допустимую массу данного мультимолекулярного комплекса, то очевидно, что эти белки входят в состав разных комплексов, включающих α-актинин-4. В дальнейшем планируется выяснить, в состав каких комплексов входят обнаруженные белки.



Рис. 11. Сравнение белкового состава комплексов, выделенных с применением (бэ) и без применения (фр) формальдегидной сшивки, и масс-спектрометрический анализ белков, входящих в состав альфа-актинин-4 содержащего комплекса, полученного с применением метода быстрой экстракции цитоплазматических белков с предварительной формальдегидной сшивкой. В связи с тем, что тубулин был идентифицирован методом массспектрометрии в составе комплекса, содержащего альфа-актинин-4, а из литературы известно, что ингибиторная субъединица транскрипционного фактора NF-кВ может взаимодействовать с микротрубочками (Crepieux et al., 1997), на тубулин было обращено особое внимание. Вестерн-блот анализ показал, что тубулин выявляется практически во всех фракциях, полученных после гельфильтрации обычного лизата клеток A431 (рис. 8). Для того чтобы установить, действительно ли тубулин входит в состав исследуемых высокомолекулярных комплексов, был проведён вестерн-блот анализ. Тубулин выявился в комплексах, содержащих p65, но не был обнаружен в комплексах, содержащих α-актинин-4 (рис. 10). Возможно, тубулин входит в состав комплексов с α-актинином-4 только при активации клеток.

Ввиду того, что миозин-9 был также обнаружен нами ранее в составе выделенных из фибробластов комплексов, содержащих тропомиозин, было решено проверить наличие тропомиозина в комплексах, выделенных из клеток A431. При анализе фракций, полученных в результате гель-фильтрации Тритон X-100 – растворимой фракции лизата клеток A431, оказалось, что тропомиозин выявляется в тех же высокомолекулярных фракциях, что и белки р65 и альфа-актинины (рис. 8). При дальнейшей иммунопреципитации антителами против р65 и α -актинина-4 из этих высокомолекулярных фракций было найдено, что тропомиозин входит в состав комплексов, содержащих р65, но отсутствует в комплексах, содержащих α актинин-4 (рис. 10). Видимо, р65 может независимо связываться с обоими актинсвязывающими белками, а миозин-9 входит в различные комплексы, как содержащие тропомиозин, так и содержащие альфа-актинин-4. Таким образом, существует ряд высокомолекулярных комплексов, включающих различные варианты взаимодействующих белков.

В связи с высказанным ранее предположением об участии исследуемых нами комплексов в перестройках актинового цитоскелета, нужно было определить, изменяют ли они свой состав во время действия на клетки различных агентов, вызывающих быструю реорганизацию структур актинового цитоскелета.

6.4. Изменение состава α-актинин-4 -содержащих комплексов в процессе реорганизации цитоскелета, вызванной различными сигнальными агентами.

Из быстрых экстрактов, выделенных из контрольных и стимулированных эпидермальным фактором роста клеток А431, были получены методом иммунопреципитации комплексы, содержащие α-актинин-4, и с применением массспектромерии проанализирован их белковый состав. Обнаружено, что при воздействии на клетки эпидермального фактора роста состав мультимолекулярных комплексов изменяется через 10 мин, что соответствует стадии разборки цитоскелета. На электрофореграмме комплекса появляется новая полоса. принадлежащая тубулину, а также происходит накопление белка в полосах, соответствующих α-актинин-4 и hsp70. Уровень hsp90, кератина I и актина заметно не изменялся. Методом вестерн-блот в составе выделенных мультимолекулярных комплексов обнаружено наличие р65 и показано, что в контрольных клетках содержится полноразмерный белок, а после действия ЭФР в комплексе с αактинином-4 обнаруживаются также и два его фрагмента 55 и 25 кДа (рис. 12).



Рис. 12. Изменение состава α-актинин-4 -содержащих комплексов при действии на клетки ЭФР. Электрофореграмма и вестерн-блот; М – маркер, Ab – поликлональные антитела против альфа-актинина-4, К – имминопреципитат из контрольных клеток, О – иммунопреципитат из клеток после 10 мин действия ЭФР. Стрелками обозначены белковые полосы, идентифицированные при помощи масс-спектрометрии.



Рис. 13. Изменение состава α-актинин-4 -содержащих комплексов при действии на клетки ТNF-α. Электрофореграмма; М – маркер, Ab – поликлональные антитела против альфа-актинина-4, К – имминопреципитат из контрольных клеток, О – иммунопреципитат из клеток после 10 мин действия TNF-α. Стрелками обозначены белковые полосы, идентифицированные при помощи масс-спектрометрии.

Другим агентом, приводящим к аналогичным изменениям в составе мультимолекулярного комплекса, не связанного с цитоскелетом и содержащего αактинин-4, оказался фактор некроза опухоли-α. При стимуляции клеток TNF-α было обнаружено, что через 10 мин также появляется новая полоса, принадлежащая тубулину, и происходит накопление белка по сравнению с его содержанием в контроле в полосах, соответствующих α-актинину-4 и hsp70. Уровень hsp90, кератина I и актина и в этом случае заметно не изменялся (рис. 13). Таким образом, на стадии разборки цитоскелета при действии различных сигнальных агентов наблюдается сходное изменение состава свободных мультимолекулярных комплексов, содержащих альфа-актинин-4.

В связи с тем, что в комплексах, содержащих р65 и α-актинин-4, изменяющих свой состав при реорганизации цитоскелета под влиянием внешних агентов, было обнаружено появление тропомиозина, было необходимо выяснить

распространяется ли данное явление и на поведение тропомиозин-содержащих комплексов, выявленных ранее в фибробластах.

6.5. Корреляция между содержанием в цитозоле тропомиозинсодержащих комплексов и степенью развитости системы актиновых микрофиламентов.

Для того, чтобы оценить, в какой мере наличие содержащих тропомиозин мультимолекулярных комплексов может быть связано со степенью развитости актинового цитоскелета, было определено содержание тропомиозина в цитоплазме нормальных, иммортализованых и трансформированных фибробластах крысы, которые, как было показано ранее (Аре и др. 1999), существенно различаются по организации цитоскелета. Электрофоретический анализ с последующим вестернблотингом демонстрирует, что в быстрых экстрактах из нормальных (REF) и иммортализованных (Е1А) фибробластов содержится большое и примерно равное количество тропомиозина, а в трансформированных клетках (E-Ras) оно значительно ниже. В то же время после удаления быстрых экстрактов в осадке разрушенных клеток, содержащем структуры цитоскелета, прослеживается снижение содержания тропомиозина в иммортализованных клетках и практически полное отсутствие в трансформированных (рис. 14). Таким образом по мере снижения степени развитости актинового цитоскелета действительно происходит перераспределение тропомиозина из актин-содержащих структур в комплексы, сосредоточенные в цитозоле. Для того чтобы выяснить, в каких белковых комплексах сосредоточен обнаруженный в цитозоле тропомиозин, был проведен гель-хроматографический анализ, который показал, что в тритон-растворимой фракции лизата (соответствующей быстрому экстракту) из иммортализованных фибробластов E1A тропомиозин выявляется в основном в высокомолекулярной области распределения. Кроме того, он содержится в незначительных количествах и во фракциях, содержащих комплексы с меньшей молекулярной массой (рис. 15).



Рис. 14. Вестерн-блот анализ содержания тропомиозина в цитозоле (слева) и цитоматриксе (справа) нормальных (REF), иммортализованных (E1A) и трансформированных (E-Ras) фибробластов крысы.



Рис. 15. Распределение актина (Actin) и тропомиозина (ТМ) во фракциях после гель-фильтрации Тритон X-100 -растворимой фракции лизата иммортализованных фибробластов. Цифры – примерный молекулярный вес частиц в соответствующих фракциях.

6.7. Влияние трихостатина на реорганизацию актинового цитоскелета и распределение тропомиозин-содержащих комплексов.

Ранее в литературе было показано, что при совместном действии на клетки ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-аза-2'-дезоксицитидина и ингибитора гистоновых деацетилаз трихостатина А в клетках происходит усиление синтеза некоторых цитоскелетных белков (Mielnicki et al., 1999). Поэтому для того, чтобы выяснить в какой мере наблюдаемые изменения содержания в цитозоле исследуемых клеток высокомолекулярных изоформ тропомиозинов могут зависеть от подобного воздействия, было оказано совместное и раздельное действие этих агентов на клетки A431, обладающих слабо развитым цитоскелетом. Действие деметилирующего агента оказалось слабее, чем совместное действие агентов, но сильнее всего ответ был получен в случае применения только одного трихостатина А. Через сутки после его действия, уровень содержания высокомолекулярных изоформ тропомиозинов значительно увеличивался (рис. 16).



Рис. 16. Увеличение содержания тропомиозинов в цитозоле клеток A431 после совместного и раздельного действия ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-аза-2'-дезоксицитидина (0.9 мкМ) и ингибитора гистоновых деацетилаз трихостатина A (50 нг/мл). Время действия – 24 ч.



Рис. 17. Клетки HeLa в контроле (А) и через сутки после действия 500 нг/мл трихостатина (В). Окраска на актин зелёная, на тропомиозин - красная. Масштабный отрезок – 20 мкм.

Так как трихостатин А подавляет активность деацетилаз, то в данных условиях эксперимента увеличение содержания тропомиозина в клетках могло сопровождаться и его ацетилированием, способствующим, как известно, более прочному взаимодействию с фибриллярным актином. Для того чтобы проверить, связано ли увеличение содержания тропомиозинов в клетках к изменениям в структуре актинового цитоскелета, действию трихостатина-А были подвергнуты клетки линии HeLa, обладающие, как все раковые клетки, слабо развитым цитоскелетом. Оказалось, что трихостатин А в довольно высокой концентрации 500 нг/мл вызывает через сутки появление в клетках большого количества стрессфибрилл, а сами клетки приобретают фибробластоподобную морфологию (рис. 17).

В связи с полученными результатами важно было установить, может ли подобная реорганизация актиновых структур сопровождаться изменениями в содержании тропомиозиновых частиц в цитозоле. Обычно, как было показано выше, при действии на клетку разнообразных внешних лигандов, индуцирующих сигнальные процессы, в ней происходят быстрые перестройки актинового цитоскелета. В данном случае в качестве действующего агента был использован трихостатин А, который вызывает, с одной стороны, подобные перестройки, а с другой, как было показано выше, повышает содержание тропомиозина в клетке.

Следует отметить, однако, что длительное действие высоких концентраций трихостатина помимо перестроек цитоскелета вызывало также последующее открепление от субстрата и гибель значительной части популяции клеток. Поэтому для проведения планируемых экспериментов было необходимо, прежде всего, найти оптимальные концентрации трихостатина, вызывающие повышение содержания в клетках тропомиозина, но не сопровождающиеся их откреплением от субстрата. На клетках A431 и трансформированных фибробластах (E-ras) было определено влияние разных концетраций трихостатина на уровень содержания тропомиозина и на их жизнеспособность. Оказалось, что через 24 ч максимальное увеличение содержания тропомиозина при сохранении жизнеспособности клеток происходит после действия на них 50 нг/мл трихостатина (рис. 18). Поэтому в дальнейших экспериментах была использовали именно эта концентрация трихостатина.



Рис. 18. Вестерн-блот анализ содержания тропомоизина в цитозоле клеток после стимуляции трихостатином А в различных концентрациях. Использовались трансформированные (E-Ras) фибробласты и клетки эпидермоидной карциномы (A431). Цифры – концентрация трихостатина А в культуральной среде (нг/мл), 0 – нестимулированные клетки. Время стимуляции – 24 ч.



Рис. 19. Вестерн-блот анализ содержания HMW изоформ тропомиозинов в цитозоле клеток на разных сроках после стимуляции трихостатином А (50 нг/мл).

Использовались иммортализованные (E1A) и трансформированные (E-Ras) фибробласты, а также клетки линии эпидермоидной карциномы (A431). ТМ – окраска моноклональными антителами против HMW тропомиозинов. Цифры – время в минутах после стимуляции (0 – нестимулированные клетки).

Электрофоретический анализ с последующим вестерн-блотингом показал, что в иммортализованных (E1A) и трансформированных (E-ras) фибробластах, а также в клетках A431 под действием 50 нг/мл трихостатина A в течение 30 мин, когда обычно происходят быстрые перестройки цитоскелета и формирование стрессфибрилл, наблюдается последовательное снижение содержания тропомиозина в цитозоле (рис. 19).





вестерн-блотов. В течение часа после действия трихостатина уровень тропомиозина в цитозоле (В) снижается, а в цитоматриксе (Г) увеличивается. У.е. – условные единицы по данным денситометрии.

Для сопоставления изменений содержании мультимолекулярных В комплексов, содержащих тропомиозин, с этапами реорганизации актинового цитоскелета действию трихостатина А были подвергнуты нормальные фибробласты REF, содержащие большое количество таких комплексов. Данные иммунофлуоресценции показывают, что через 10 мин после действия трихостатина происходит снижение количества свободных тропомиозиновых частиц в цитоплазме и появление более крупных агрегатов рядом со стресс-фибриллами (рис. 20). Наряду с этим анализ динамики распределения тропомиозина между цитоплазматической и цитоскелетной фракциями после обработки клеток трихостатином демонстрирует, что в быстром экстракте из этих клеток, содержащем не связанные с клеточными структурами цитоплазматические белки и белковые комплексы, количество тропомиозина постепенно снижается в течение часа. В то же время содержание белка в осадке увеличивается (рис. 20). Полученные результаты свидетельствуют В пользу ранее высказанного предположения о том, что тропомиозин из мультимолекулярных комплексов может переходит в прочно связанную с цитоскелетом форму, возможно за счёт ацетилирования.

Поскольку тропомиозин ранее был обнаружен В составе мультимолекулярного комплекса, содержащего р65, мы предположили, что при действии на клетки REF трихостатина А, приводящего к изменению размера и количества тропомиозиновых частиц, этот белок также должен выявляться в составе частиц более крупного размера. Действительно, при иммунофлюоресценции антителами против р65 прокрашиваются в цитоплазме частицы большего размера через 10 минут после действия трихостатина по сравнению с контролем. Для подтверждения этих данных был применили метод гель-хроматографии. Вестерн-блот анализ фракций, полученных после гельхроматографического разделения лизата клеток REF, продемонстрировал, что в контрольных клетках большая часть белка p65 выявляется В составе низкомолекулярных фракций, соответствующих массе мономерного белка. После же действия трихостатина А р65 начинает накапливаться в высокомолекулярных фракциях, и через 30 минут почти весь белок выявляется в области, соответствующей комплексам с массой 700-800 кДа (рис. 21).



Рис. 21. Изменение размера комплексов, содержащих р65, в фибробластах при действии трихостатина А.

Таким образом, было установлено, что при действии на клетки различных агентов наряду с быстрыми перестройками актинового цитоскелета происходит изменение состава, количества И размера цитоплазматических мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих актин-связывающие и сигнальные белки и не связанных с цитоскелетными структурами. Заключительная часть работы была посвящена выяснению возможных механизмов, регулирующих эти процессы. Поскольку из литературы известно, что окисление актина может приводить к потере его способности полимеризоваться (Lassing et al., 2007), был проведён сравнительный анализ внутриклеточного содержания активных форм кислорода в клетках, находящихся на разных стадиях реорганизации актинового цитоскелета.

6.6. Изменение уровня активных форм кислорода в процессе реорганизации актинового цитоскелета.

Так как из литературы известно, что активные формы кислорода (АФК) оказывают влияние на процессы полимеризиции актина (Dalle-Donne et al., 2001), был проведён анализ содержания АФК в клетках при действии сигнальных факторов, вызывающих реорганизацию актинового цитоскелета. При действии LPA (20 нг/мл) на клетки A431 уже через 5 мин наблюдается разборка актинового цитоскелета и через полчаса он собирается обратно. Уровень АФК в клетке измеряли с помощью флуоресцентного зонда на сроках, соответствующих основным стадиям реорганизации цитоскелета. Обнаружено, что через 10 мин после стимуляции клеток A431 LPA в концентрации 20 нг/мл одновременно с разборкой актинового цитоскелета наблюдается увеличение уровня АФК и затем через 30 мин этот уровень снижается, когда цитоскелет снова собран. Для того чтобы установить, связаны ли между собой процессы изменения уровня АФК в клетке и цитоскелетных перестроек, мы использовали вещество, способное подавлять образование АФК. Обработка клеток A431 антиоксидантом окситиазолидином (предшественник синтеза глутатиона) приводит к снижению уровня АФК в клетках и одновременно к подавлению разборки цитоскелета в ответ на стимуляцию LPA (20 нг/мл) в течение 10 минут (рис. 22).



Рис. 22. Изменение внутриклеточного уровня АФК при реорганизациях цитоскелета, вызыванных LPA.

7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Весь комплекс проведенных в данной работе исследований доказывает, что кратковременное, локальное разрушение плазматической мембраны клеток позволяет быстро извлекать из них находящиеся в цитоплазме белки и мультимолекулярные белковые комплексы без разрушения структур цитоскелета. При этом сами клетки остаются прикрепленными к субстрату и даже практически не изменяют своей формы.

Основной целью настоящей работы, ради которой, собственно говоря, и был разработан ЭТОТ новый оригинальный метод быстрой экстракции цитоплазматических белковых комплексов, было выяснение белкового состава и возможной роли обнаруженных ранее в клетках белковых частиц, не связанных со структурами актинового цитоскелета, но содержащих актин-связывающие белки тропомиозин и альфа-актинин-4. С помощью гель-хроматографии и вестерн-блот анализа было показано, что после быстрой экстракции в клетках действительно больше не остается мультимолекулярных комплексов, содержащих тропомиозин. В процессе детальной разработки метода выделения тропомиозиновых частиц было обращено внимание на тенденцию снижения их содержания в цитоплазме при действии на клетки ростовых факторов (Genklo at al. 2008). Отсюда возникло предположение о том, что они могут принимать участие в регуляции реорганизации актиновых структур, а также что в состав этих же комплексов могут входить и сигнальные молекулы, вовлечённые в эти процессы. Проведенные далее исследования показали, что тропомиозиновые частицы действительно представляют собой сложные белковые комплексы с высокой молекулярной массой, включающие помимо тропомиозина и актина ряд других молекул. В качестве первого шага на ПУТИ выяснения ИХ полного состава были идентифицированы выявленные при электрофорезе мажорные белки, которыми оказались hsp70, hsp90 и миозин-9. Обнаруженные в составе тропомиозиновых частиц белки теплового шока могут принимать участие в формировании белковых комплексов, поддержании их стабильности или в обеспечении их взаимодействия с другими комплексами. В частности, оба этих белка способны связываться с микротрубочками (Liang and MacRae, 1997). Комплексы белков-субстратов и hsp90

образуются обычно АТФ-зависимым образом с участием системы шаперонов hsp90/hsp70, которая потенциально способна взаимодействовать с сотнями, если не тысячами, различных белков (Pratt, Toft, 2003), поэтому не удивительно, что эти белки теплового шока обнаружены нами в составе как тропомиозин-, так и альфаактинин-4- содержащих комплексов.

Наибольший интерес представляет выявление в комплексе с тропомиозином миозина-9. В отличие от мышечного миозина, взаимодействующего с актином в виде димера из двух полипептидных цепей (шагающий механизм из двух миозиновых головок), миозин – 9 перемещается вдоль актиновой фибриллы в виде полипептидной Это было одиночной цепи. доказано путём прямого микроскопического наблюдения за передвигающимся по нанесённым на стекло фибриллам актина миозином, который был сшит с зелёным флуоресцирующим белком (GFP). Предполагается гусеничный механизм подобного перемещения (Nishikawa et al., 2006). Молекулы миозина, лишённые хвостового домена двигаются по актиновым фибриллам в сторону минус-конца (Inoue et al., 2002), а полноразмерные – к плюс-концу (O'Connell and Mooseker, 2003). Миозин-9 особенно интересен тем, что В его хвостовом участке содержится последовательность, гомологичная белку, активирующему ГТФазы (GAP) (Post et al., 1998, Bähler, 2000). GAP стимулируют ГТФазную активность малых ГТФаз Rho. Белки Rho, в свою очередь, регулируют процесс формирования стрессфибрилл (Hall, 2005), а также через Rho-киназу, которая ингибирует фосфатазу регуляторных лёгких цепей, регулируют активность самих миозинов (Воротников и др., 2009). Таким образом, миозин-9 является регулятором Rho и моторной сигнальной молекулой, принимающей активное участие в организации актинового цитоскелета. Это подтверждается также и экспериментами по прижизненной микроскопии, в которых было выявлено, что миозин-9 привлекается в клетке к местам, где происходит активная полимеризации актина – ламеллоподиям, раффлам и филоподиям (van den Boom et al., 2007).

Способность тропомиозина агрегировать in vitro была показана достаточно давно. Так, выделенный из мышц кролика тропомиозин агрегирует в растворе с низкой ионной силой с образованием частиц, размеры которых уменьшаются от 135000 до 65000 Да по мере добавления солей (при рН 6.5 ионную силу изменяли

от 0.1 до 1.1) (Tsao et al., 1951). В связи с этим не удивительно, что тропомиозин и в цитоплазме может образовывать агрегаты. Однако конкретная функция этих агрегатов остаётся неясной. Вполне возможно, что они принимают активное участие в перестройках актинового цитоскелета, регулируя процесс полимеризации актина и одновременно являясь и затравками для формирования актиновых микрофиламентов. Сравнение распределения тропомиозина во фракциях после гель-хроматографии экстрактов ИЗ нормальных И иммортализованных фибробластов показывает, что при изменении типа организации и степени развитости актинового цитоскелета изменяется также и размер тропомиозиновых частиц, содержащихся в цитоплазме. Возможно, что при этом могут меняться белковый состав и свойства этих частиц. Полученные в ходе исследования данные поведении этих частиц в фибробластах говорят о том, что при перестройках 0 цитоскелета действительно может иметь место изменение количества тропомиозиновых комплексов.

Одним из механизмов, отвечающих за изменение количества и состава содержащих актин-связываюшие белки комплексов. могут быть посттрансляционные модификации белков. В частности, может изменяться степень ацетилирования молекул тропомиозина, так как было показано, что трихостатин в течение короткого времени действия на клетки приводит к ацетилированию цитоплазматических белков независимо OT изменения экспрессии соответствующих генов (Blagosklonny et al., 2002). Ранее было показано, что ацетилирование тропомиозинов приводит к повышению его способности связываться с актином. В таком случае если трихостатин способствует ацетилированию тропомиозина за счет подавления активности деацетилаз, то последний может переходить из свободных цитоплазматических частиц в прочно связанную с цитоскелетом форму. В пользу этого предположения свидетельствуют, В частности, данные иммунофлуоресцентного анализа фибробластов, показывающие снижение содержания тропомиозина в цитозоле клеток различных линий под действием трихостатина.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют в пользу высказанного предположения о возможности участия тропомиозиновых комплексов в перестройках цитоскелета.



Рис. 23. Целомоциты морской звезды до и через 10 мин после активации кальцием. Тропомиозин окрашен зелёным, актин в контрольных клетках окрашен красным. Ядра окрашены синим.

С этими данными согласуются результаты предварительных экспериментов, проведенных на другой клеточной системе, а именно на целомоцитах морской звезды, в которых под действием ионов кальция происходит в течение нескольких быстрое формирование развитой системы МИНУТ актиновых структур С последующим образованием сети взаимодействующих клеток и активным ee сокращением. При иммунофлуоресцентном анализе тропомиозин выявляется в цитоплазме покоящихся распластанных целомоцитов в виде отдельных частиц, сходных с обнаруженными в фибробластах (рис. 23). Для того чтобы выяснить, изменяется ли их состав при перестройках цитоскелета, вызванных добавление кальция, с помощью иммунопреципитации моноклональными антителами против тропомиозина из тритон X-100 - растворимой фракции тотального лизата целомоцитов были выделены комплексы и проанализировано изменение их состава. В активированных кальцием клетках по сравнению с контрольными появляется полоса в области 130 кДа и исчезают полосы в области 200 кДа и ряд полос в низкомолекулярной области, где предположительно может находиться тропомиозин. Видимо, входящий в состав частиц тропомиозин вовлекается в организацию быстро возникающих цитоскелетных структур. Методом массспектрометрии в составе этих комплексов был идентифицирован актин.

Несмотря на наличие всех представленных результатов, поддерживающих высказанные предположения, необходимо проведение дальнейших исследований для получения прямых доказательств изменения степени ацетилирования тропомиозина в комплексах и их непосредственного влияния на полимеризацию актина. Остаётся открытым также вопрос, в какой степени может изменяться белковый состав тропомиозиновых частиц, и какие ещё белки в них входят.

Аналогичные результаты были получены при выделении и анализе мультимолекулярных комплексов, содержащих альфа-актинин, из клеток А-431. Эти клетки, обладая слабо развитыми структурами актинового цитоскелета, демонстрируют выраженные перестройки цитоскелета в ответ на действие растворимых или иммобилизованных на подложке факторов. В клетках линии А431 при распластывании на фибронектине формируется характерная структура цитоскелета, представленная множеством стресс-фибрилл. Так как ранее в нашей лаборатории было установлено, что и р65 субъединица транскрипционного фактора NF-кB, и α-актинин в цитоплазме распределяются вдоль стресс-фибрилл и в фокальных контактах (Are et al., 2000), а при реорганизации цитоскелета под действием ЭФР оба белка обнаруживаются также в раффлах (Большакова и др., 2009) и транслоцируются в ядро, то возникло предположение, что эти белки также могут существовать в цитоплазме в виде независимых от структур цитоскелета частиц (мультимолекулярных белковых комплексов). Поэтому была выбрана именно эта клеточная модель для изучения поведения выделяемых комплексов при проведении сигнала с поверхности клетки в ядро.

Так как исследуемые комплексы могут быть нестабильными и быстро распадаться при обычных способах выделения, был применен метод обратимой белков формальдегида, сшивки низкими концентрациями позволяющий стабилизировать комплексы во время экстракции. В литературе есть примеры применения формальдегида для создания сшивок такого между близко находящимися белками, а также между белками и нуклеиновыми кислотами (Vasilescu et al., 2004, Baschong et al., 1983, Speit et al., 2000, Solomon and Varshavsky, 1985, Metz et al., 2004, Jackson, 1999, Orlando, 2000). Ввиду того, что формирование искомых комплексов происходит под мембраной и на начальных этапах проведения сигнала, было решено, что их можно выделить, используя

быструю экстракцию в сочетании с предобработкой клеток микромолярными количествами формальдегида. К настоящему времени известно, ЧТО все биологически активные молекулы при взаимодействии с клеткой вызывают перестройки цитоскелета, и формальдегид в использованных нами концентрациях продемонстрировал такое же действие, поэтому сроки предобработки клеток формальдегидом и затем глицином, останавливающим реакцию образования сшивок, были подобраны таким образом, чтобы к моменту экстракции структуры цитоскелета оказывались вновь собранными. Наряду с этим в ходе экспериментов было показано, что клетки после воздействия формальдегида остаются живыми и Сравнение белкового активно функционирующими. состава комплексов, выделенных из необработанных и обработанных формальдегидом клеток, позволило установить, что действительно после образования формальдегидных сшивок удаётся выделить в комплексе с альфа-актинином большее количество различных белков. При этом на сроках, соответствующих стадии разборки цитоскелета, выделенные из цитоплазмы клеток не связанные с цитоскелетом комплексы, содержащие в том числе и сигнальные белки, отличаются по белковому составу от комплексов, выделенных из клеток с собранным цитоскелетом. В связи с большим числом белков и высокой молекулярной массой выделенных комплексов, содержащих альфа-актинин-4, стало ясно, что они представляют собой не один, а ряд различных комплексов, включающих такие белки как плектин-1, спектрин, миозин-9, β-актин, цитоскелетные изоформы кератинов I и II типов, тубулин, а также белки семейства белков теплового шока – hsp70 и hsp90. Эти белки, которые удалось идентифицировать с помощью массспектрометрии, будут способствовать проведению дальнейших исследований, направленных на выяснение конкретного состава и функциональнй роли отдельных комплексов. Что касается наличия кератинов в составе выделенных комплексов, необходимо подчеркнуть, что это не является результаом загрязнения в процессе приготовления пробы для масс-спектрометрического анализа, а вполне ожидаемые участники таких комплексов, так как клетки, из которых они были выделены, эпидермального происхождения. Миозин-9 находили и ранее в составе содержащих тропомиозин комплексов, выделенных из фибробластов, а его предплагаемая функция описана выше – являясь молекулярным мотором, он

одновременно может участвовать в регуляции динамики цитоскелета с привлечением элементов Rho-зависимых сигнальных путей. Плектин и спектрин участвуют в структурной организации цитоскелета, в частности, в организации стресс-фибрилл, фокальных контактов и подмембранной сети актиновых филаментов, и являясь мультидоменными белками сами могут выступать в роли скаффолдов при образовании цитоплазматических белковых комплексов (Broderick and Winder, 2005; Andra et al., 1998). Система шаперонов hsp70/hsp90 видимо способствует стабильности мультимолекулярных комплексов.

Обнаруженные изменения состава содержащих альфа-актинин комплексов под действием ростовых факторов одновременно с реорганизациями актинового цитоскелета являются основой для дальнейшего изучения роли этих комплексов в процессах проведения сигнала. Исследования реорганизации актинового цитоскелета клеток A431 под действием ЭФР проводились и ранее (Chinkers et al., 1979; Are et al., 2001). ЭФР в первые минуты взаимодействия с рецепторами вызывает заметные изменения в системе актиновых микрофиламентов кортикальной области. Во всех случаях это действие выражалось в быстром образовании ламеллы по всему периметру клетки, к 10 мин действия ЭФР актиновые структуры разбирались, а к 30 мин – собирались заново. α-Актинин солокализуется с актиновыми структурами и участвует в организации актинового цитоскелета, но также способен взаимодействовать со значительным количеством других молекул, в том числе и сигнальных, белков, и в частности с рб5 субъединицей транскрипционного фактора NF-kappaB. Так как в данной работе использовали лизирующий SF-буфер, для которого ранее было показано, что он не приводит к изменению соотношения G- и F-актина в лизате и сохраняет структуры актинового и тубулинового цитоскелета (Blikstad et al., 1982), полученные результаты свидетельствуют о том, что α-актинин и р65, помимо взаимодействия со структурами цитоскелета, действительно могут находиться в цитозоле в составе высокомолекулярных комплексов, значительно превышающих их суммарную массу. При этом было выявлено, что в состав этих комплексов входят также другие белки. Это наводит на мысль о возможном участии α-актинина в сигнальных процессах. Совокупность разрозненных литературных данных, данных накопленных в нашей лаборатории в этой области и результатов настоящей

равоты, позволяет выдвинуть гипотезу согласно которой взаимодействие NFkappaB с актиновым цитоскелетом, нахождение его в составе независимых комплексов с альфа-актинином и транслокация их обоих в ядро могут являться последовательными этапами единого процесса, который относят к участию цитоскелета к проведению внутриклетоного сигнала. Ядерные комплексы альфаактинина-4 и NF-kappaB исследуются в настоящее время в нашей лаборатории, задачей же данного исследования была попытка обнаружить и охарактеризовать такие комплексы, находящиеся в цитоплазме клеток, в том числе исследовать другие белки, которые могут входить в контакт с альфа-актинина-4 и NF-kappaB и способствовать их последовательному переходу из одного функционального состояния в другое. Изучение механизмов этих превращений в рамках данной работы не завершено, однако намечены подходы к дальнейшему решению этой задачи, которые потребуют привлечения разнообразных новых методов.

Таким образом, обнаружение в высокомолекулярной фракции экстракта из клеток A431 p65, альфа-актинина-4 и тропомиозина, а также нескольких других сигнальных и цитоскелетных белков может означать что подобные комплексы вовлечены в разнообразные сигнальные процессы. Возможно, что белки актинового цитоскелета являются скаффолдом для разнообразных каскадов сигнальной системы клетки, конечным звеном которой является активация транскрипции ряда генов.

В связи с тем, что сходные перестройки цитоскелета происходят при действии на клетки любых внешних факторов индуцирующих сигнальных процессы, возникает предположение о существовании единого универсального механизма, приводящего к запуску процесса быстрой разборки цитоскелета.

В связи с появившимися в литературе данными о том (Lassing et al., 2007), что свободные формы кислорода подавляют полимеризацию актина, а также способствуют его деполимеризации, вполне возможно, что наблюдаемые реорганизации цитоскелета зависят от изменения уровня АФК в клетке. Проверке этого предположения была посвящена заключительная часть работы, в которой было установлено, что действительно существует корреляция между состоянием цитоскелета и окислительно-восстановительным статусом клетки.

В качестве вещества, вызывающего перестройки ситемы микрофиламентов, была выбрана лизофосфатидиловая кислота. Известно, что этот ростовой фактор, наряду со многими другими, вызывает изменения в системе актиновых микрофиламентов в культивируемых клетках (Ridley et al., 1992). Несмотря на то, что существует множество данных, описывающих реорганизацию актинового цитоскелета в ответ на изменение факторов микроокружения, механизмы и причины таких перестроек остаются неизвестными. Многочисленные работы, направленные на изучение действия LPA, описывают изменения в организации актинового цитоскелета как минимум через 2 часа после стимуляции (51, 54). В настоящей работе исследования проводились уже через 5 минут после воздействия LPA. Такой ранний ответ клеток на добавление LPA может свидетельствовать о том, что включается некоторая быстрая метаболическая система вызывающая биохимические преобразования внутри клетки. В наших собственных экспериментах было показано, что на пятой минуте после добавления LPA начинается разборка ранее сформированного актинового цитоскелета, а уже через 10 минут цитоскелет фактически всех клеток разбирается полностью. Клетки принимают аморфные формы, сжимаются, на поверхности появляются многочисленные микроворсинки, а цитоплазма заполнена агрегатами актина. Однако, через 30 минут после стимуляции клеток LPA можно наблюдать формирование новой сети микрофиламентов. Таким образом, ранее существующий цитоскелет в клетках сменяется на другой в результате действия внеклеточного агента. Почему это происходит? Ранее в нашей лаборатории было показано, что характер пространственной организации актинового цитоскелета B культивируемых немышечных клетках зависит от типа лиганд-рецепторных взаимодействий, при этом реорганизация сформированного цитоскелета под влиянием разнообразных факторов микроокружения состоит в изменении набора и сочетания определенных актиновых структур (Петухова и др., 2004). Таким образом, ответ клеток на появление нового внеклеточного фактора (LPA) перестройкой цитоскелета является вполне оправданным.

Если рассматривать цитоскелет как скаффолд, на котором собираются комплексы сигнальных молекул, то реорганизация актиновых структур может являться необходимым условием для замещения этих комплексов на другие,

соответствующие новому сигналу, который вызывает определенный клеточный ответ.. При появлении нового внеклеточного сигнала должен сформироваться новый сигнальный каскад. Это возможно либо путем пошаговой перестройки предыдущего сигнального пути, либо путем полного его разрушения и создания нового. С точки зрения скорости и затрат энергии более вероятен вариант. Таким образом, можно предположить, что при появлении в среде LPA ранее сформированный цитоскелет, являющийся непосредственным звеном сигнального разбирается, и начинается формирование нового сигнального каскада, пути, запущенного LPA, с участием цитоскелетных белков. Подобная теория перепрогаммирования сигнальных путей могла бы объяснить феномен разборки ранее сформированного и сборки нового цитоскелета в ответ на взаимодействие клеток с LPA и другими внешними агентами. Недавно было обнаружено, что на динамику актина in vitro могут влиять активные формы кислорода (55), которые, как известно, являются вторичными мессенджерами многих сигнальных каскадов. На основании появившихся данных нами было сделано предположение о том, что активные формы кислорода могут быть ответственными за разборку актинового цитоскелета в ответ на связывание клеткой внеклеточных лигандов. Для того, чтобы проверить это предположение, было выбрано несколько экспериментальных точек, каждой из которых соответствовали клетки линии А431 на определенном сроке стимуляции LPA в определенной концентрации. В клетках каждой временной точки был измерен уровень АФК и параллельно проанализирована организация цитоскелета. Результаты подтвердили наши предположения. Была установлена значительная корреляция между уровнем АФК в клетке и состоянием актинового цитоскелета. Клеткам с повышенным уровнем АФК соответствовали клетки с разобранным цитоскелетом. Клеткам с нормальным уровнем АФК соответствовали клетки с еще не разобранным или уже вновь собранным цитоскелетом. Таким образом, было показано, что повышение уровня АФК и разборка цитоскелета в клетках происходит в одно и то же время. Мы полагаем, что АФК, которые синтезируются в ответ на появление внеклеточного фактора, действуют либо непосредственно, либо активируют биохимические реакции разбирающие акиновые структуры. В литературе показано, что окисление β/γактина может приводить к потере его способности полимеризоваться. Также

окисление актина препятствует взаимодействию с профилином и вызывает деполимеризацию F-актина. Окисляясь, актин формирует антипараллельный гомодимер с межмолекулярной S-S связью по цистеину 374. Специфическим образом актин окисляется перекисью водорода по цистеину 272 – это максимально реактивный к H_2O_2 остаток у β/γ актина, что определяет специфичность окисления актина перекисью, других модификаций актина обнаружено не было (Lassing et al., 2007). Генерация H_2O_2 – обычное явление при запуске сигнала при действие на клетки ростовых факторов, при этом изменения уровня АФК часто коррелируют с изменениями системы микрофиламентов, а также связаны с изменениями концентрации кальция (Hong, Moon, 2006) и с кинетикой роста филоподий и ламеллоподий (Watanabe, 2002; Small, Stradal, 2002).

Результаты экспериментов на клетках, обработанных 2,4-окситиазолидином – предшественником синтеза глутатиона – свидетельствуют о том, что подавление образования активных форм кислорода в клетке исключает ранний ответ клетки на предъявление лизофосфатидиловой кислоты, который проявляется в разборке ранее сформированного цитоскелета. Таким образом, есть основания считать, что деградация актиновых структур происходит только в кислых условиях, т.е. в присутствии активных форм кислорода.

Результаты экспериментов проведенных в настоящей работе лишь косвенно указывают на возможные причины и механизмы перестроек актинового цитоскелета в ответ на действие внеклеточных факторов. В дальнейших экспериментах планируется уделить особое внимание этим проблемам.

Таким образом, совокупность результатов, полученных в ходе выполнения настоящей работы, свидетельствует о наличии В цитоплазме сложных мультимолекулрных комплексов содержащих актин-связывающие белки И сигнальные молекулы, но не связанных непосредственно со структурами цитоскелета. Состав и распределение в клетке этих комплексов изменяется при перестройках цитоскелета под влиянем внешних лигандов, что может быть связано с их участием в процессах реорганизации актинового цитоскелета, а также в осуществлении некоторых стадий проведения внутриклеточного сигнала. Индукцией наблюдаемых преобразований может быть повышение в клетке уровня активных форм кислорода.

8. ВЫВОДЫ

- Разработанный новый метод позволяет быстро выделять цитоплазматические белковые комплексы путем образования локальных пор в плазматической мембране и без разрушения клеток и структур цитоскелета.
- 2. Выделенные из цитоплазмы разных клеток не связанные с цитоскелетом частицы, содержащие тропомиозин и альфа-актинин, являются мультимолекулярными белковыми комплексами с молекулярной массой в пределах 500-800 кДа и включают в себя ряд цитоскелетных и сигнальных белков, а также белки теплового шока.
- При действии на фибробласты и клетки эпидермоидной карциномы A431 биологически активных молекул — трихостатина, эпидермального фактора роста и фактора некроза опухоли – α, вызывающих реорганизацию актинового цитоскелета, происходит изменение количества и состава белковых комплексов содержащих троиомиозин и α-актинин-4.
- 4. Повышение уровня активных форм кислорода коррелирует с разборкой структур актинового цитоскелета в клетках А431.
- 5. Совокупность полученных данных об изменении содержания цитоплазматических белковых комплексов, их состава, наличии в них сигнальных молекул и прераспределении тропомиозина между цитоплазмой и цитоскелетом под влиянием внешних факторов свидетельствует в пользу их участия в процессах формирования актиновых структур и передачи внутриклеточных сигналов.

9. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

Бабаков В.Н., **Бобков Д.Е.,** Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Подольская Е.П., Пинаев Г.П.

Альфа-актинин-4 и субъединица p65/RelA транскрипционного фактора NF-kB в клетках A431 локализуются совместно и мигрируют в ядро при действии эпидермального фактора роста // Цитология. -2004.- Т.46,- №12.- С.1065-1073.

Бобков Д.Е., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П.

Мультимолекулярные комплексы, содержащие p65 субъединицу фактора NF-кВ и белки цитосклета в клетках A431 // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 2-4 июня 2009 г., Сборник статей, том 2, С. 417-422.

Бобков Д.Е., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П.

Мультимолекулярные комплексы, содержащие p65 субъединицу фактора NF-кВ и белки цитосклета в клетках A431 // Биологические мембраны. – 2010.- Т.27.- №1.- С.1-5.

Тезисы:

Бабаков В.Н., **Бобков Д.Е.,** Кропачёва И.В., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Пинаев Г.П. Альфа-актинин и р65 субъединица транскрипционного фактора NFkappaB солокализуются и совместно перераспределяются в клетках линии A431 // Цитология.- 2003.- Т.45.- №9.- с.847.

Babakov V., Smirnova I., **Bobkov D.**, Petukhova O., Turoverova L., Kropacheva I., Podolskaya E., Pinaev G.

NF- κ B Transcription Factor Interacts With α -Actinin Isoforms // FEBS special meeting on cytoskeletal dynamics, Helsinki, June 12-16, 2004, p.38.

Бабаков В.Н. Подольская Е.П., **Бобков Д.Е.**, Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П.

Альфа-актинин взаимодействует с p65-субъединицей транскрипционного фактора NF-kappaB // III Съезд биофизиков России, Воронеж, 24-29 июня 2004 г., Тезисы докладов, Т.1, С.6-7.

Бобков Д.Е., Айзенштадт А.А., Пинаев Г.П.

Определение белкового состава мультимолекулярных сигнальных комплексов, включающих сигнальные молекулы и элементы цитоскелета // 11-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 29 октября – 2 ноября 2007 г., Сборник тезисов, с.71.

Бобков Д.Е., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П.

Новый метод быстрого выделения из цитозоля мультимолекулярных белковых комплексов, включающих цитоскелетные и сигнальные молекулы // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», Казань, 23-27 июня 2009 г., Тезисы докладов, с.287.

Бобков Д.Е., Айзенштадт А.А., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П. Белки теплового шока 70 и 90 входят в состав комплексов, содержащих р65субъединицу фактора NF-kB и белки цитоскелета в клетках А431 // Цитология.-2010.- Т.52.- №3.- с.255.

Бобков Д.Е., Айзенштадт А.А., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П. Выделение и анализ белкового состава тропомиозиновых частиц, содержащихся в цитозоле эмбриональных фибробластов крысы // Цитология.- 2010.- Т.52.- №3.-С.255-256.

10. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Арнаутов А.М., Никольский Н.Н. Транспорт в ядро изоформ p42 и p44 МАР киназы, вызванный фактором роста, требует наличия интактного цитоскелета // Цитология.- 1998.- Т.40.- С.639-647.

Аре А. Ф., Воронкина И. В., Пинаев Г. П. Зависимость пространственной организации цитоскелета от типа лиганд- рецепторных комплексов, образующихся при адгезии культивируемых клеток к разным субстратам. // В кн.: II съезд биохимического общества РАН: Тез. стендовых сообщ.- 1997.- т.1.- С.253-254.

Арэ А. Ф., Поспелова Т. В., Пинаев Г. П. Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного матрикса // Цитология. - Т. 41.- N 8. - 1999. - С.707-715.

Бабаков В.Н., Бобков Д.Е., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Подольская Е.П., Пинаев Г.П. Альфа-актинин-4 и субъединица p65/RelA транскрипционного фактора NF-kB в клетках A431 локализуются совместно и мигрируют в ядро при действии эпидермального фактора роста // Цитология. - 2004.- Т.46,- №12.- С.1065-1073.

Большакова А.В., Петухова О.А., Пинаев Г.П., Магнуссон К.-Е. Сравнительный анализ способов субклеточного фракционирования для выявления альфа-актинина 1 и альфа-актинина 4 в клетках А431 // Цитология.- 2009.- Т. 51.- № 2.- С.122-129.

Воротников А.В., Щербакова О.В., Кудряшова Т.В., Тарасова О.С., Ширинский В.П., Пфитцер Г., Ткачук В.А. 2009. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 95(10) : 1058-73.

Галкин В.Э., Туроверова Л.В., Константинова И.М., Пинаев Г.П. 26Sрибонуклеопротеиновый комплекс (26S-протеасома) непосредственно взаимодействует с фибриллярным актином // Цитология.- 1998.- Т.40.- С.618-626.

Гусев Н.Б. Движение немышечных клеток и реорганизация актиновых микрофиламентов // Соросовский образовательный журналю- 2001.- №7.- С. 9-16.

Минин А.А., Кулик А.В. Внутриклеточный транспорт. Принципы регуляции // Успехи биологической химии. - 2004.- Т.44. – С.225-262.

Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачёва И. В., Пинаев Г. П. Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A431, распластанных на иммобилизованных лигандах// Цитология.- 2004.- T.46(1).- с.5-15.

Поспелова Т.В., Кислякова Т.В., Медведев А.В., Светликова С.Б., Поспелов В.А. 1990. Цитология. 32 (1) : 148-155.

Allen W.E., Jones G.E., Pollard J.W., Ridley A.J. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages // J. Cell Sci.- 1997.- Vol.110 (Pt 6).- P.707-720.

Andra K., Nikolic B., Stocher M., Drenckhahn D., Wiche G. Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells // Genes Dev.- 1998.- No.12.- P.3442-3451.

Araki N., Hatae T., Yamada T., Hirohashi S. Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinocytosis in mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging // Journal of Cell Science.-2000.- V.113.- P.3329-3340.

Journal of Cell Science.-2000.- V.115.-1.5529-5540.

Are A.F., Galkin V.E., Pospelova T.V., Pinaev G.P. The p65/RelA subunit of NF-κB interacts with actin-containing structures // Exp. Cell Res.- 2000.- Vol.256.- P.533-544.

Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. Attachment of A431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system // Cell Motility and Cytoskelet.- 2001.- Vol.48.- P.24-36.

Arimura C., Suzuki T., Ynagisawa M., Hanada Y., Masaki T. Primary structure of chicken skeletal muscle and fibroblast α -actinin deduced from cDNA secuences // Eur. J. Biochem.- 1988.- Vol.177.- P.649-655.

Asada M., Irie K., Morimoto K., Yamada A., Ikeda W., Takeuchi M., Takai Y. ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions // J. Biol. Chem.- 2003.- Vol.278(6).- P.4103-4111.

Baldwin A.S. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights // Annu. Rev. Immunol.- 1996.- Vol.14.- P. 649-683.

Balzar M., Bakker H.A., Briaire-de-Bruijn I.H., Fleuren G.J., Warnaar S.O., Litvinov S.V. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule // Mol .Cell. Biol.- 1998.- Vol.18.- P.4833-4843.

Baeuerle P.A., Baltimore D. IκB: a specific inhibitor of the NF-κB transcription factor // Science.- 1988.- Vol.242.- P.540-546.

Bähler M. Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules?2000. Biochim. Biophys. Acta. 1496(1) : 52-9.

Baschong W., Baschong-Prescianotto C., Kellenberger E. Reversible fixation for the study of morphology and macromolecular composition of fragile biological structures // Eur J Cell Biol.- 1983.- V.32(1).- P.1-6.

Belkin A.M., Koteliansky V.E. Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and alpha-actinin with cytoskeletal proteins // FEBS Lett.- 1987.- Vol.220.- P.291–294.

van der Bend R.L., de Widt J., van Corven E.J., Moolenaar W.H., van Blitterswijk W.J. Metabolic conversion of the biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, in fibroblasts // Biochim. Biophys. Acta.- 1992.- Vol.1125(1).- P.110-112.

Benoliel A.-M., Kahn-Perles B., Imbert J., Verrando P. Insulin stimulates haptotactic migration of human epidermal keratinocytes through activation of NF-kappa B transcription factor // J. Cell Sci.- 1997.- Vol.110.- P.2089-2097.

Ben-Ze'ev A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors // Curr Opin Cell Biol.- 1997.- V.9.- P.99-108.

Bershadsky A., Chausovsky A., Becker E., Lyubimova A., Geiger B. Involvement of microtubules in the control of adhesion-depended signal transduction // Current Biology.-1996.- Vol.6.- N.10.- P1279-1289.

Bharadwaj S., Prasad G.L. Tropomyosin-1, a novel suppressor of cellular transformation is downregulated by promoter methylation in cancer cells. 2002. Cancer Lett. 183 : 205-13.

Bharadwaj S., Thanawala R., Bon G., Falcioni R., Prasad G.L. Resensitization of breast cancer cells to anoikis by tropomyosin-1: role of Rho kinase-dependent cytoskeleton and adhesion. 2005. Oncogene. 24 : 8291-303.

Birbach A., Gold P., Binder B.R., Hofer E., de Martin R., Schmid J.A. Signaling molecules of the NF-κB pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus // The Journal of Biological Chemistry.- 2002.- Vol.277.- N.13.- P.10842–10851.

Bishop L., Hall A. Rho GTFases and their effectjr proteins // Biochem. J.- 2000.-Vol.348- P.241-255.

Blagosklonny M.V., Robey R., Sackett D.L., Du L., Traganos F., Darzynkiewicz Z., Fojo T., Bates S. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity // 2002.- Molecular Cancer Therapeutics.- Vol.1.- P.937–941.

Blikstad I., Carlsson L. On the dynamics of the microfilament system in HeLa cells. 1982. J. Cell Biol. 93(1) : 122-128.

van den Boom F., Düssmann H., Uhlenbrock K., Abouhamed M., Bähler M. The Myosin IXb motor activity targets the myosin IXb RhoGAP domain as cargo to sites of actin polymerization. 2007. Mol. Biol. Cell. 18(4) : 1507-18.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of mocrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Annal Biochem. – 1976.- Vol.72.- P. 248-254.

Bretscher M.S., Aguado-Velasco C. EGF induces recycling membrane to form ruffles // Curr Biol.- 1998.- Vol.8(12).- P.721-724.

Bretcher A., Vandekerckhove J., Weber K. α-actinin from chicken skeletal muscle and smooth muscle show considerable chemical and immunological differences // Eur. J. Biochem.- 1979.- Vol.100.- P.237-243.

Broderick M.J.F. and Winder S.J. Towards a complete atomic structure of spectrin family proteins // Journal of Structural Biology.-2002.- Vol.137.- P.184–193.

Brown J.H., Cohen C. Regulation of muscle contraction by tropomyosin and troponin: how structure illuminates function. 2005. Adv. In Prot. Chem. 71 : 121-159.

Burack R.W. and Shaw A.S. Signal transduction: hanging on scaffold // Curr. Op. Cell Biol.- 2000.- Vol.12.- P.211-216.

Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling // Annu. Rev. Cell Dev. Biol.- 1996.- Vol.12.- P.463-518.

Caamano J. and Hunter C.A. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions // Clinical Microbiology Reviews.- 2002.- Vol.15.- N.3.- P.414–429.

Cao Y., Kang Q., Zolkiewska A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 interacts with alpha-actinin-1 // Biochem. J.- 2001.- Vol.357.- P.353–361.

Carpen O., Pallai P., Staunton D.E., Springer T.A. Association of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin containing cytoskeleton and α -actinin // J. Cell Biol.- 1992.- Vol.118.- P.1223-1234.

Cattelino A., Albertinazzi C., Bossi M., Critchley D.R., de Curtis I. A cell-free system to study regulation of focal adhesions and the connected actin cytoskeleton // Mol. Biol. Cell.- 1999.- Vol.10.- P.373-391.

Celli L., Ryckewaert J.-J., Delachanal E. and Duperray A. Evidence of a functional role for interaction between ICAM-1and nonmuscle α-actinins in leukocyte diapedesis // The Journal of Immunology.- 2006.- V.177.- P.4113–4121.

Chakraborty S., Reineke E.L., Lam M., Li X., Liu Y., Gao C., Khurana S., Kao H. Actinin 4 potentiates MEF2 transcription activity by antagonizing histone deacetylase 7 // JBC Papers in Press.- 2006.- Manuscript M602474200

Chen N.X., Geist D.J., Genetos D.C., Pavalko F.M., Duncan R.L. Fluid shear-induced NFkappaB translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release // Bone.-2003.- Vol.33.- P.399-410.

Chen V.C., Li X., Perreault H., Nagy J.I. Interaction of zonula occludens-1 (ZO-1) with α -actinin-4: application of functional proteomics for identification of PDZ domain-associated proteins // Journal of Proteome Research.- 2006.- V.5.- P.2123- 2134.

Chinkers M., McKanna J.A., Cohen S. Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor // J. Cell Biol.- 1979.- Vol.83.- P.260-265.

Cho Y.J., Liu J., Hitchcock-DeGregori S.E. The amino terminus of muscle tropomyosin is a major determinant for function. 1990. J. Biol. Chem. 265 (1) : 538-45.

Christerson L.B., Vanderbilt C.A., Cobb M.H. MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions // Cell Motil. Cytoskeleton.- 1999.- Vol.43.- P.186-198.

Chung T.K., Funk M.A., Baker D.H. L-2-Oxothiazolidine-4-carboxylate as a cysteine precursor: efficacy for growth and hepatic glutathione synthesis in chicks and rats. // J. Nutr.-1990.- Vol.120.- P.158-160.

O'Connell C.B., Mooseker M.S. Native Myosin-IXb is a plus-, not a minus-end-directed motor. 2003. Nat. Cell. Biol. 5(2) : 171-2.

Crepieux P., Kwon H., Leclerc N., Spencer W., Richard S., Lin R., Hiscott J. I kappaB alpha physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. 1997. Mol. Cell. Biol. 17(12) : 7375-85.

Critchley D. R., G. Flood. Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins. 2nd ed., ed. by Thomas Kreis and Ronald Vale. Oxford.: Oxford University Press.- 1999.- P.24-27.

Dandapani S.V., Sugimoto H., Matthews B.D., Kolb R.G., Sinha S., Gerszten R.E., Zhou J., Ingber D.E., Kalluri R., Pollak M.R. α-Actinin-4 is required for normal podocyte adhesion // JBC Papers in Press.- 2006.- Manuscript M605024200

Daniliuc S., Bitterman H., Rahat M.A., Kinarty A., Rosenzweig D., Nitza L. Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with alpha-actinin-4 // J. Immunol .- 2003.- Vol.171.- P.3225–3232.

Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A., Di Simplicio P., Colombo R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself // Free Radic. Biol. Med.- 2001.- Vol.31(12).- P.1624-32.

Djinovic-Carugo K., Gautel M., Ylanne J., Young P. The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies // FEBS Letters.- 2002.- Vol.513.- P.119-123.

Djinovic-Carugo K., Young P., Gautel M., Saraste M. Structure of α-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments // Cell.- 1999.- Vol.98.- P.537-546.

Ding Z., Liang J., Lu Y., Yu Q., Songyang Z., Lin S.-Y. and Mills G.B. A retrovirusbased protein complementation assayscreen reveals functional AKT1-binding partners // PNAS.- 2006.- vol. 103 no. 41.- P. 15014–15019

Dixson J.D., Forstner M.R., Garcia D.M. The α -actinin gene family: a revised classification // J.Mol.Evol.- 2003.- Vol.56.- P.1-10.

Edlund M., Lotano M.A., Otey C.A. Dynamics of α -actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with α -actinin - Green Fluorescent Protein // Cell Motil. Cytosk.-2001.- Vol.48.- P.190-200.

Egerton M., Moritz R.L., Druker B., Kelso A., Simpson R.J. Identification of the 70 kD heat shock cognate protein (Hsc70) and α-actinin-1 as novel phosphotyrosine-containing proteins in T lymphocytes // Biochem. Biophys. Res. Com.- 1996.- Vol.224.- P.666-674.

El-Husseini A.E-D., Kwasnicka D. Yamada T., Hirohashi S., Vincent S.R. BERP, a novel ring finger protein, binds to α -actinin – 4 // Biochem. Biophys. Res. Com.- 2000.- Vol.267.- P.906-911.

Engers R., Springer E., Kehren V., Simic T., Young D.A., Beier J., Klotz L.O., Clark I.M., Sies H., Gabbert H.E. Rac upregulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by redox-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase signaling // FEBS J.- 2006.- Vol.273(20).- P.4754-69.

Etienne-Manneville S., Hall A. Rho GTPases in cell biology // Nature.- 2002.-Vol.420(6916).- P.629-635.

Fechheimer M., Zigmond S.H. Focusing on unpolymerized actin // J Cell Biol.- 1993.-Vol.123(1).- P.1-5.

Fiaschi T., Cozzi G., Raugei G., Formigli L., Ramponi G., Chiarugi P. Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion // J. Biol. Chem. 2006.-Vol.281(32).-P.22983-91.

Freeman J.L.R., Pitcher J.A., Li X., Bennett V., Lefkowitz R.J. α-actinin is potent regulator of G protein-coupled receptor kinase activity and substrate specificity in vivo // FEBS Lett.- 2000.- Vol.473.- P.280-284.

Fukami K., Fuuruhashi K., Inagaki M., Endo., Hatano., Takenava T. Requirement of phosphatidyl 4,5-biphosphate for α-actinin function // Nature.- 1992.- Vol.359.- P.150-152.

Garcia-Garcia E., Sanchez-Mejorada G., Rosales C. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF-kappaB activation but not for phagocytosis // J. Leukoc.Biol.-2001.- Vol.70.- P.649-658.

Gautreau A, Louvard D, Arpin M. ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Yin and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling // Curr Opin Cell Biol.-2002.- V.14.- P.104-9.

Geiger B., Ginsberg D., Solomon D., Volberg T. The molecular basis for the assembly and modulation of adherens-type junction // Cell Differ. Dev.- 1990.- Vol.32.- P.343-353.

Geiger B., Yehuda-Levenberg S., Bershadsky A.D. Molecular interactions in the submembrane plaque of cell-cell and cell-matrix adhesions // Acta Anat. (Basel).- 1995.-Vol.154.- No.1.- P.46-62.

Gerrard J.M, Robinson P. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin.// Biochim Biophys Acta.-1989.- Vol.1001(3) - P.282–285.

Goosney D.L., DeVinney R., Pfuetzner R.A., Frey E.A., Strynadka N.C., Finlay B.B. Enteropathogenic E. coli translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin // Curr. Biol.- 2000.- Vol.10(12).- P.735-738.

Gonzalez A.M., Otey C., Edlund M., J.C. Jones. Interactions of a hemidesmosome component and actinin family members // J. Cell. Sci.- 2001.- Vol.114.- P.4197-4206.

Greene D.K., Tumova S., Couchman J., Woods A. Syndecan-4 accociates with α -actinin // J. Biol. Chem.- 2003.- Vol.278.- P.7617-7623.

Greenwood J.A., Theibert A.B., Prestwich G.D. Murthy-Ulrich J.E. Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase: regulation by PtdIns (3,4,5)-P3 binding to α -actinin // J. Cell. Biol.- 2000.- Vol.150.- P.627-641.

Grenklo S., Hillberg L., Rathje L.-S.Z., Pinaev G., Schutt C.E., Lindberg U. Tropomyosin assembly intermediates in the control of microfilament system turnover. 2008. European Journal of Cell Biology. 87 : 905-920.

Guan J.L. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer // IUBMB Life.- 2010.- Vol.62.- No.4.- P. 268-276.

Gunning P., O'Neill G., Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. 2008. Physiol. Rev. 88 : 1–35.

Gunning P., Weinberger R., Jeffrey P. Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis. 1997. Anat. Embryol. 195 : 311–315.

Ha T.-S. High glucose and advanced glycosylated end-products affect the expression of α -actinin-4 in glomerular epithelial cells // NEPHROLOGY.- 2006.- V.11.- P.435–441.

Haigler H., Ash J.F., Singer S.J., Cohen S. Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1978.- Vol.75.- P.3317-3321.

Hall A. 2005. Biochem. Soc. Trans. 5 : 891-5.

Hance J. E., Fu S.Y., Watkins S.C., Beggs A.H. and Michalak M. Alpha-actinin-2 is a new component of the dystrophin-glycoprotein complex // Arch. Biochem. Biophys.-1999.- Vol.365.- P.216-222.

Hara T., Honda K., Shitashige M., Ono M., Matsuyama H., Naito K., Hirohashi S., Yamada T. Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells // MCP Papers in Press.- 2006.- Manuscript M600129-MCP200.

Harper B.D., Beckerle M.C., Pomies P. Fine mapping of the α -actinin binding site within cystein-rich protein // Biochem. J.- 2000.- Vol.350.- P.269-274.

Hartwig J.H., Kwiatkowski D.J. Actin-binding proteins // Curr Opin Cell Biol.- 1991.-V.3.- P.87-97.

Hayashida Y., Honda K., Idogawa M., Ino Y., Ono M., Tsuchida A., Aoki T., Hirohashi S. and Yamada T. E-Cadherin regulates the association between beta-catenin and actinin-4 // Cancer Res.- 2005.- V.65(19).- P.8836-8845

Hegmans J.P.J.J., Bard M.P.L., Hemmes A., Luider T.M., Kleijmeer M.J., Prins J.-B., Zitvogel L., Burgers S.A., Hoogsteden H.C. and Lambrecht B.N. Proteomic Analysis of Exosomes Secreted by Human Mesothelioma Cells // American Journal of Pathology.- 2004.- Vol. 164.- No. 5.- P. 1807–1815

Heiska L., Kantor C., Parr T., Critchley D.R., Vilija P., Gahmberg C. G., Carpen O. Binding of cytoplasmic domain of intercellular adhesion molecule-2 to α -actinin // J Biol. Chem.- 1996.- Vol.271.- P.26214-26219.

Herrenknecht K., Ozawa M., Eckerskorn C., Lottspeich F., Lenter M., Kemler M. The uvomorulin-anchorage protein α -catenin is a vinculin homologue // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1991.- Vol.88.- P.9156-9160.

Hillberg L., Zhao Rathje L.S., Nyåkern-Meazza M., Helfand B., Goldman R.D., Schutt C.E., Lindberg U. Tropomyosins are present in lamellipodia of motile cells. 2006. Eur. J. Cell Biol. 85(5) : 399-409.

Honda K., Yamada T., Endo R., Ino Y., Gotoh M., Tsuda H., Yamada Y., Chiba H., Hirohashi S. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion // J. Cell Biol.- 1998.- Vol.140.- P.1383-1393.

Hu X. Proteolytic signaling by TNF α : caspase activation and I κ B degradation // Cytokine.- 2003.- Vol.21.- P.286-294.
Inoue A., Saito J., Ikebe R., Ikebe M. Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor // Nat. Cell. Biol.- 2002.- Vol.4(4).- P.302-6.

Izaguirre G., Aguirre L., Ji. P., Aneskievich B., Haimovich B. Tyrosine phosphorylation of alpha-actinin in activated platelets // J. Biol. Chem.- 1999.- Vol.274.- P. 37012-37020.

Izaguirre G., Aguirre L., Hu Ya-P., Lee H. Y., Schlaepfer D. D., Aneskievich B. J., Haimovich B. The cytoskeletal/non-musle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase // J. Biol. Chem.- 2001.- Vol.276.- P.28676-28685.

Jackson V. Formaldehyde cross-linking for studying nucleosomal dynamics // Methods.-1999.- V.17(2).- P.125-39.

Janmey P.A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly // Annu. Rev. Physiol.- 1994.- Vol.56.- P.169-191.

Jasavala R., Martinez H., Thumar J., Andaya A., Gingras A.-C., Eng J.K., Aebersold R., Han D.K., Wright M.E. Identification of putative androgen receptor interaction protein modules: cytoskeleton and endosomes modulate AR signaling in prostate cancer cells // MCP Papers in Press.- 2006.- Manuscript M600169-MCP200.

Jockusch B.M., Bubeck P., Giehl K., Kroemker M., Moshner J., Rothkegel M., Rudiger M., Schluter K., Stanke G., and Winkler J. The molecular architecture of focal adhesions // Annu. Rev. Cell Dev. Biol.- 1995.- Vol.11.- P.379-416.

Jockusch B.M., Hinssen H. Nonmuscle motility and the actin-based cytoskeleton // Comprehensive Human Physiology.- 1996.- Vol.1.- P.225-243.

Johnson P., Smillie L.B. Polymerizability of rabbit skeletal tropomyosin: effects of enzymic and chemical modifications // Biochemistry. 1977. 16(10) : 2264-9.

Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D. Atomic Structure of the Actin: Dnase I Complex // Nature. 1990. Vol. 347.- P. 126.

Kaplan J.M., Kim S.H., North K.N., Rennke H., Correia L.A., Tong H.Q. Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis // Nat Genet.- 2000.- Vol.-24.- P.251-256.

Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity // Annual Review of Immunology.- 2000.- Vol.18.- P.621–663.

Kato M., Sasaki T., Ohya T., Nakanishi H., Nishioka H., Imamura M., Takai Y. Physical and functional interaction of rabfphilin-3A with α -actinin // J. Biol. Chem.-1996.- Vol.271.- P.31775-31778.

Keely P., Parise L., Juliano R. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion // Trends Cell Biol.- 1998.- V.8.- P.101-106.

Kjoller L., Hall A. Signaling to Rho GTPases // Exp. Cell Res.- 1999.- Vol.253(1).- P.166-179.

Kim J.H., Lee-Kwon W., Park J.B., Ryu S.H., Yun C.H., Donowitz M. Ca(2+)dependent inhibition of Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3-E3KARP-alphaactinin-4 complex for oligomerization and endocytosis // J. Biol. Chem.- 2002.- Vol.277.-P.23714-23724.

Knudsen K.A., Peralta Soler A., Johnson K.R., Wheelock M. Interaction of α -actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via α -catenin // J. Cell Biol.- 1995.- Vol.130.- P.67-77.

Kozma R., Ahmed S., Best A., Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts // Mol. Cell. Biol.- 1995.- Vol.15(4).- P.1942-52.

Kremerskothen J., I. Teber, D. Wendholt, T. Liedtke, T. M. Bockers, A. Barnekow. Brain-specific splicing of α-actinin 1 mRNA // Biochem and Biophys Res. Comm.-2002.- Vol.295.- P.678–681.

Kucharczak J., Simmons M.J., Fan Y. and Gelinas C. To be, or not to be: NF- κ B is the answer – role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis // Oncogene.- 2003.- Vol.22.- P.8961–8982.

Lazarides E. Tropomyosin antibody: the specific localization of tropomyosin in nonmuscle cells. 1975. Seminars in Cancer Biology. 65 : 549-561.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.- 1970.- Vol.227.- P.680-685.

Lassing I., Schmitzberger F., Björnstedt M., Holmgren A., Nordlund P., Schutt C.E., Lindberg U. Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin // J. Mol. Biol. 2007.- Vol.370(2).- P.331-348.

Leung-Hagesteijn C.Y., Milankov K., Michalak M., Wilkins J., Dedhar S. Cell attachment to extracellular matrix substrates is inhibited upon downregulation of expression of calreticulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein // J. Cell Sci.- 1994.- v.107.- P.589-600.

Lewis J.Mc., and Schwartz M.A. Mapping in vivo associaton of cytoplasmic proteins with integrin β 1 cytoplazmic domain mutants // Mol. Biol. Cell.- 1995.- Vol.6.- P.151-160.

Li B., Trueb B. Analysis of the alpha-actinin/zyxin interaction // J. Biol. Chem.- 2001.-Vol.276.- P.33328-33335. **Liang P., MacRae T.H.** Molecular chaperones and the cytoskeleton. // 1997 Journal of Cell Science. 110 : 1431-1440.

Lindberg U., Schutt C.E., Goldman R.D., Nyåkern-Meazza M., Hillberg L., Rathje L.S., Grenklo S. Tropomyosins regulate the impact of actin binding proteins on actin filaments. // 2008. Adv. Exp. Med. Biol. 644 : 223-231.

Ling L., Cao Z., Goeddel DV. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176 // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).- 1998.- Vol.95(7).- P.3792-3797.

Liou H.-C., Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system // Curr. Opin. Cell Biol.- 1993.- Vol.5.- P.477-487.

Lord-Fontaine S., Averill D. A. Enchancement of cytotoxity of hydrogen peroxide by hypertherma in chinese hamster ovary cell: role of antioxidant defenses // Arch. Biophys.-1999.- Vol.363.- P.283-295.

Luikart S., Masri M., Wahl D., Hinkel T., Beck J.M., Gyetko M.R., Gupta P., Oegema T. Urokinase is required for the formation of mactinin, an alpha-actinin fragment that promotes monocyte/macrophage maturation // Biochim Biophys Acta.-2002.- Vol.1591.- P.99-107.

Luikart S., Wahl D., Masri M., Oegema T. A fragment of α-actinin promotes monocyte/macrophage in vitro // Exp. Hematol.- 1999.- Vol.27.- P.337-344.

Machesky L.M., Hall A. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton // Trends Cell Biol.- 1996.- Vol.6(8).- P.304-310.

Mane S., Winkelman J.C., Luikart S.D. Bone marrow extracellular matrix induces HL-60 cells to produce an autonomous differentiation factor // Cell Growth Differ.- 1991.-Vol.2.- P.637-643.

Masri M., Wahl D., Oegema T., Luikart S. HL-60 cells degrade α-actinin to produce a fragment that promotes monocyte/macrophage maturation // Exp. Hematol.- 1999.-Vol.27.- P.345-352.

Matsudaira P. Actin crosslinking proteins at the leading edge // Semin. Cell Biol.-1994.- Vol.5.- P.165-174.

McGregor A., Blanchard A.D., Rowe A.J., Critchley D.R. Identification of the vinculin-binding site in the cytoskeletal protein α -actinin // Biochem. J.- 1994.-Vol.301.- P.225-233.

McKenna N.M., Meigs J.B., Wang Y-L. Exchangeability of alpha-actinin in living cardiac fibroblasts and muscle cells // J. Cell. Biol.- 1985.- Vol.101.- P.2223-2232.

McKenna N.M and Wang Y-L. Possible translocation of actin and alpha-actinin along stress fibers // Exp. Cell Res.- 1986.- Vol.167.- P.95-105.

Meigs J.B. and Wang Y-L. Reorganization of alpha-actinin and vinculin induced by phorbol ester in living cells // J. Cell Biol.- 1986.- Vol.102.- P.1430-1438.

Metz B., Kersten G.F., Baart G.J., de Jong A., Meiring H., ten Hove J., van Steenbergen M.J., Hennink W.E., Crommelin D.J., Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin.Bioconjug // Chem.- 2006.- V.17(3).- P.815-22.

Meyer C.F., Wang X., Chang C., Templeton D., Tan T.H. Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 signaling cascade in mediating kappaB enhancer activation // J. Biol. Chem.- 1996.- Vol.271.- P.8971-8976.

Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A. H2O2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor // EMBO J.- 1993.- Vol.5.- P.2005-2015.

Mielnicki L.M., Ying A.M., Head K.L., Asch H.L., Asch B.B. Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells. // 1999. Exp. Cell Res. 249 : 161-67.

Miillake D.B., Blanchard A.D., Patel B., Critchley D.R. The cDNA sequence of human placental α -actinin // Nucleic Acids Res.- 1989.- Vol.17.- P.6725.

Miyado K., Sato M., Taniguchi S. Transformation-related expression of a low-molecular-mass tropomyosin isoform TM5/TM30nm in transformed rat fibroblastic cell lines. // 1997. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123 :331-336.

Miyamoto S., Teramoto H., Coso O.A., Gutkind J.S., Burbelo P.D., Akiyama S.K., Yamada K.M. Inegrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules // J. Cell Biol.- 1995.- V.131.- P.791-805.

Moldovan L., Mythreye K., Goldschmidt-Clermont P.J., Satterwhite L.L. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1 // Cardiovasc. Res.- 2006.- Vol.71(2).- P.236-246.

Moolenaar W.H. Lysophosphatidic acid signalling // Curr. Opin. Cell Biol. 1995.-Vol.7(2).- P.203-210.

Mukai H., Toshimori M., Shibata H., Takanaga H., Kitagawa M., Miyahara M., Shimakawa M., Ono Y. Interaction of PKN with α -actinin // J. Biol. Chem.- 1997.- Vol.272.- P.4740-4746.

Nafaguchi A., Tekeichi M., Tsukita S. The 102kd cadherin-associated protein: Similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression // Cell.- 1991.- Vol.65.- P.849-857.

Nakano H., Shindo M., Sakon S., Nishinaka S., Mihara M., Yagita H., Okumura K. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1 // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).- 1998.- Vol.95(7).- P.3537-3542.

O'Neill G.M., Stehn J., Gunning P.W. Tropomyosins as interpreters of the signalling environment to regulate the local cytoskeleton // 2008. The Journal of Cell Biology. 18 : 35-44.

Niggli V., Djafarzadeh S., Keller H. Stimulus-induced selective association of actinassociated proteins (α -actinin) and protein kinase C isoforms with the cytoskeleton of human neutrophils // Exp. Cell Res.- 1999.- Vol.250.- P.558-568.

Nishikawa M., Nishikawa S., Inoue A., Iwane A.H., Yanagida T., Ikebe M. A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX. // 2006. Biochem. Biophys. Res. Commun. 343(4) : 1159-64.

Nobes C.D., Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility // Biochem. Soc. Trans.- 1995.- Vol.23(3).- P.456-9.

Ohtsubo M., Takayanagi A., Gamou S., Shimizu N. Interruption of NFkappaB-STAT1 signaling mediates EGF-induced cell-cycle arrest // J. Cell Physiol.- 2000.- Vol.184.- P.131-137.

Olson E.N., Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions // Nat. Rev. Mol. Cell Biol.- 2010.- Vol.11.- No.5.- P. 353-365.

Orlando V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinkedchromatin immunoprecipitation // Trends Biochem Sci.- 2000.- V.25(3).- P.99-104.

Otey C. A., Carpen O. α -Actinin revisited: a fresh look at an old player // Cell Motil. Cytoskel.- 2004.- Vol.58.- P.104-111.

Otey C. A., Pavalko F. M. and Burridge K. An interaction between alpha actinin and the b1 integrin subunit in vitro // J. Cell Biol.- 1990.- Vol.111.- P.721-729.

Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M., Donner D.B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase // Nature.- 1999.- Vol.401(6748).- P.82-85.

Palombella V.J., Rando O.J., Goldberg A.L., Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa Bl precursor protein and the activation of NF-kappa B // Cell.- 1994.- Vol.78.- P.773-785.

Papa I., Astier C., Kwiatek O., Raynaud F., Bonnal C., Lebart M.C., Roustan C. and Benyamin Y. Alpha-actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line // J.Musle Res. Cell. Motil.- 1999.- Vol.20.- P.187-197.

Parast M.M. and Otey C.A. Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesion // J.Cell Biol.- 2000.- Vol.150.- P.643-655.

Patrie K.M., Drescher A.J., Welihinda A., Mundel P., Margolis B. Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and aactinin-4, with the tight junction protein MAGI-1 // J. Biol. Chem.- 2002.- Vol.277.- P.30183-30190.

Pavalko F. M. and Burridge K. Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of a-actinin // J. Cell Biol.- 1991.- Vol.114.- P. 481-491.

Pavalko F.M. and LaRoche S.M. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin β 2-subunit (CD18) and the actin-binding protein α -actinin // J.Immun.- 1993.- Vol.151.- P.3795-3807.

Pavalko F.M., Walker D.M., Graham L., Goheen M., Doerschuk C.M., Kansas G.S. The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alphaactinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin // J. Cell Biol.- 1995.- Vol.129.- P.1155–1164.

Pawson T. Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins // Curr. Opin. Cell Biol.- 2007.- Vol.19.- No.2.- P.112-116.

Pawson T. and Scott J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins // Science.- 1997.- Vol.278.- P.2075-2080.

Pelletier O., Pokidysheva E., Hirst L.S., Bouxsein N., Li Y., Safinya C.R. Structure of actin cross-linked with α -actinin: a network of bundles // Physical Review Letters.-2003.- Vol.91.- P.148102-(1-4).

Perona R., Montaner S., Saniger L., Sanchez-Perez I., Bravo R., Lacal J.C. Activation of the nuclear factor-kappa B by Rho, Cdc42, and Rac-1 proteins // Genes Dev.- 1997.- Vol.11.- P.463-475.

Pomiès P., Louis H.A., Beckerle M.C. CRP1, a LIM domain protein implicated in muscle differentiation, interacts with α -actinin // J. Cell Biol.- 1997.- Vol.139.- P.157-168.

Post P.L., Bokoch G.M., Mooseker M.S. Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. // 1998. J. Cell. Sci. 7 : 941-50.

Prasad G.L., Masuelli L., Raj M.H.G., Harindranath N. Suppression of src-induced transformed phenotype by expression of tropomyosin-1. // 1999. Oncogene. 18 : 2027-2031.

Pratt W.B., Toft D.O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery // Exp Biol Med (Maywood).- 2003.- Vol. 228.- No.2.- P.111-133.

Price L.S., Leng J., Schwartz M.A., Bokoch G.M. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading // Mol. Biol. Cell. 1998.- Vol.9(7).- P.1863-1871.

Puius Y.A., Mahoney N.M., Almo S.C. The modular structure of actin-regulatory proteins // Curr. Opin. Cell Biol.- 1998.- Vol.10.- P.23-34.

Qwarnstrom E.E., Ostberg C.O., Turk G.L., Richardson C.A., Bomsztyk K. Fibronectin attachment activates the NF-kappa B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells // J. Biol. Chem.- 1994.- Vol.269.- P.30765-30768.

Regnier C.H., Song H.Y., Gao X., Goeddel D.V., Cao Z., Rothe M. Identification and characterization of an IkappaB kinase // Cell.- 1997.- Vol.90(2).- P.373-83.

Ridley A. Rho GTPases and cell migration. // J. Cell Sci. -2001.-114, -P.2713-2722.

Ridley A.J., Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors // Cell.- 1992.- Vol.70(3)-P. 389–399.

Ridley A., Paterson H., Johnston C., Diekmann D., Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling // Cell. - 1992.- Vol.7.- P.401-410.

Romashkova J.A., Makarov S.S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling // Nature.- 1999.- Vol.401(6748).- P.86-90.

Romijn H.J., van Uum J.F., Breedijk I., Emmering J., Radu I., Pool C.W. Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy // J. Histochem. Cytochem.- 1999.- Vol.47.- P.229-236.

Rosette C., Karin M. Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF- κ B // The Journal of Cell Biology.- 1995.- Vol.128.- P.1111-1119.

Sakamuro D., Furukawa T., Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells // J. Virol.- 1995.- Vol.69.- P.3893-3896.

Sampath R., Gallagher P.G., Pavalko F. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin β 1 cytoplasmic domain // J Biol. Chem.- 1998.- Vol.273.- P.33588-33594.

Sastry S.K., Burridge K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics // Exp. Cell Res.- 2000.- Vol. 261(1).- P.25-36.

Schmidt A., Hall M.N. Signaling to the actin cytoskeleton // Annu. Rev. Cell Dev. Biol.-1998.- Vol.14.- P.305-338.

Shah V., Bharadwaj S., Kaibuchi K., Prasad G.L. Cytoskeletal organization in tropomyosin-mediated reversion of ras-transformation: Evidence for Rho kinase pathway. // 2001. Oncogene. 20 : 2112-2121.

Shibasaki F., Fukami K., Fukui Y., Takenawa T. Phosphatidylinositol 3-kinase binds to α-actinin through the P85 subunit // Biochem. J.- 1994.- Vol.302.- P.551-557.

Skoumpla K., Coulton A.T., Lehman W., Geeves M.A., Mulvihill D.P. Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. // 2007. Journal of Cell Science. 120 : 1635-1645.

Small J.V., Resch G.P. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility // Curr. Opin. Cell Biol.- 2005.- Vol.17.- No.5- P.517-523.

Small J.V., Rottner K., Kaverina I., Anderson K.I. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement // Biochim. Biophys. Acta.- 1998.- Vol.1404.- P.271-281.

Solomon MJ, Varshavsky A. Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures // Proc Natl Acad Sci U S A.- 1985.- V.82(19).- P.6470-4.

Speit G., Schutz P., Merk O. Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. // Mutagenesis.- 2000.- V.15(1).- P.85-90.

Stickel S.K. and Wang Y-L. Alpha-actinin-containing aggregates in transformed cells are highly dynamic structures // J. Cell Biol.- 1987.- Vol.104.- P.1521-1526.

Sue Goo Rhee, Tong-Shin Chang, Yun Soo Bae, Seung-Rock Lee, Sang Won Kang. Cellular Regulation by Hydrogen Peroxide // J. Am. Soc. Nephrol.- 2003.- Vol.14.-P.211-215.

Tam W.F., Sen J., Sen R. NF-kappa B in cell life and death. In books: Transcription factors: normal and malignant development in blood cells / 2001.- P.551-570. Wiley-Liss, Inc.

Tessier D.J., Komalavilas P., Panitch A., Joshi L., Brophy C.M. The small heat shock protein (HSP) 20 is dynamically associated with the actin cross-linking protein actinin // J. Surg. Res.- 2003.- Vol.111.- P.152-157.

Theriot J.A. Regulation of the actin cytoskeleton in living cells // Sem. Cell Biol.- 1994.-Vol.5.- P.193-199. **Tigyi G., Miledi R.** Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells // J. Biol. Chem.- 1992.- Vol.267(30)- P.21360–21367.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1979.- Vol.76.- P.4350-4354.

Tsao T.-C., Bailey K., Adair G.S. The size, shape and aggregation of tropomyosin particles. // 1951. Biochem. J. 49(1) : 27–36.

Urbancikova M., Hitchcock-DeGregori S.E. Requirement of amino-terminal modification for striated muscle alpha-tropomyosin function // J. Biol. Chem.- 1994.- Vol.269(39).- P.24310-5.

Vallenius T., Luukko K., Mäkela T.P. CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle α -actinin -1 and α -actinin -4 // J.Biol. Chem.- 2000.- Vol.275.- P.11100-11105.

Vanhaesebroeck B., Leevers S.J, Panayotou G., Waterfield M.D. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers // Trends Biochem Sci.- 1997.-Vol.22.- P.267-272.

Vasilescu J., Guo X., Kast J. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry // Proteomics.- 2004.- V.4(12).- P.3845-54.

Walikonis R.S., Oguni A., Khorosheva E.M., Jeng C.J., Asuncion F.J., Kennedy M.B. Densin-180 forms a ternary complex with the α -subunit of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and α -actinin // J. Neurosci.- 2001.- Vol.21.- P.423-433.

Weed S.A., Parsons J.T. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly // Oncogene.- 2001.- V.20.- P.6418-34.

Weisinger G., Limor R., Marcus-Perlman Y., Knoll E., Kohen F., Schinder V., Firer M., Stern N. 12S-lipoxygenase protein associates with alpha-actin fibers in human umbilical artery vascular smooth muscle cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.-2007.- Vol.356(3).- P.554-560.

Winder S.J. and Ayscough K.R. Actin-binding proteins // Journal of Cell Science.-2005.- V. 118.- P. 651-654

Wyszynski M., Lin J., Rao A., Nigh E., Beggs A.H., Craig A.M. Sheng M. Competitive binding of α -actinin and calmodulin to the NMDA receptor // Nature.-1997.- Vol.385.- P.439-442.

Xia H., Winokur S.T., Kuo W-L., Altherr M.R., Bredt D.S. Actinin-associated LIM protein: identification of domain interaction between PDZ and spectrin-like motifs // J. Cell Biol.- 1997.- Vol.139.- P.507-515.

Xu J., Zutter M.M., Santoro S.A., Clark R.A.F. A three-dimensional collagen lattice activates NF-kappa B in human fibroblasts: role in integrin alpha2 gene expression and tissue remodeling // J. Cell Biol.-1998.- Vol.140.- P.709-719.

Yamada K.M. and Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes // Curr. Opin. Cell Biol.- 1997.- V.9.- P.76-85.

Yan Q., Sun W., Kujala P., Lotfi Y., Vida T.A. and Bean A.J. CART: An Hrs/Actinin-4/BERP/Myosin V protein complex required for efficient receptor recycling // Molecular Biology of the Cell.- 2005.- Vol. 16.- P. 2470–2482

Yebra M., Filardo E.J., Bayna E.M., Kawahara E., Becker J.C., Cheresh D.A. Induction of carcinoma cell migration on vitronectin by NF-kappa B-dependent gene expression // Mol. Biol. Cell.- 1995.- Vol.6.- P.841-850.

Yin M.J., Christerson L.B., Yamamoto Y., Kwak Y.T., Xu S., Mercurio F., Barbosa M., Cobb M.H., Gaynor R.B. HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation // Cell.- 1998.- Vol.93(5).- P.875-84.

Ylanne J., Scheffzek K., Young P., Saraste M. Crystal structure of the alpha-actinin rod reveals an extensive torsional twist // Structure (Camb).- 2001.- Vol.9.- P.597-604

Zandi E., Karin M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkB kinase complex // Mol. Cell. Biol.- 1999.- Vol.19.- P.4547-4551.

Zhou L., Tan A., Iasvovskaia S., Li J., Lin A., Hershenson M.B. Ras and mitogenactivated protein kinase kinase kinase-1 coregulate activator protein-1- and nuclear factor-kappaB-mediated gene expression in airway epithelial cells // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.- 2003.- Vol.28.- P.762-769.

Zhu P., Xiong W., Rodgers G., Qwarnstrom E.E. Regulation of interleukin 1 signalling through integrin binding and actin reorganization: disparate effects on NF- κ B and stress kinase pathways // Biochem. J.- 1998.- Vol.330.- P.975-981.

11. ПРИЛОЖЕНИЕ

Габ. 2. Масс-спектрометрическое определение тубулина в составе пробы.					
<i>{MATRIX}</i> <i>{SCIENCE</i>	Iascot Search Results				
User	: Danila				
Email	: bobkovde@yandex.ru				
Search title	: 44				
Database	: SwissProt 57.10 (512205 sequences;				
180277873 resi	dues)				
Taxonomy	: Homo sapiens (human) (20406				
sequences)					
Timestamp	: 22 Nov 2009 at 17:44:07 GMT				
Top Score	: 118 for Mixture 1, TBB5_HUMAN +				
TBA1C_HUMAN					

Probability Based Mowse Score

Protein score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 56 are significant (p < 0.05).



Таб. 3. Масс-спектрометрическое определение БТШ90 в составе пробы.

(MATRIX) (SCIENCE) Mascot Search Results

User	: Mar	rina						
Email	: mse	erebr@n	mail.	ru				
Search title	:							
MS data file	:							
D:\!MS_DATA\St_P	eterk	ourg\Bo	obkov	\090	429\1	Dpag	ge_1∖	1SRef\p
data\1\peaklist.	txt							
Database	: NCE	BInr 20	0904	24 (83008	899 s	seque	nces;
2858238196 resid	ues)							
Taxonomy	: Man	malia	(mam	mals) (72	2629) seq	uences)
Timestamp	: 29	Apr 20)09 a	t 14	:10:1	.2 GN	1 T	
Top Score	: 174	l for <mark>c</mark>	gi 19	4378	142,	unna	amed	protein
product [Homo sag	piens	5]						
		NCBInr	Decoy					
Protein hits above identity th	nreshold	41	0					

Probability Based Mowse Score

Highest scoring protein hit

Protein score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.

59

174

Protein scores greater than 71 are significant (p<0.05).



	Accessi	Mas	Sc	cription				
	on	s o	re	Description				
1.	gi 1943 78142	821 19	174	unnamed protein product [Homo sapiens]				
2.	gi 2014 9594	832 12	171	heat shock 90kDa protein 1, beta [Homo sapiens]				
3.	gi 3068 91	832 42	170	90kDa heat shock protein				
4.	gi 1090 71321	835 37	164 _[]	PREDICTED: heat shock 90kDa protein 1, beta isoform 3 Macaca mulatta]				

5. gi 3964 4662	747 46	160	HSP90AB1 protein [Homo sapiens]		
6. gi 1943 86896	791 45	159	unnamed protein product [Homo sapiens]		
7. $\frac{gi 1090}{71319}$	802 37	152	PREDICTED: heat shock 90kDa protein 1, beta isoform 2 Macaca mulatta]		
8. gi 1208 2134	819 12	150	heat shock protein 90 beta [Equus caballus]		
9. $\frac{gi _{1971}}{_{00267}}$	831 86	149 _m	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B ember 1 [Pongo abelii]		
10 gi 4055 .6608	832 29	149	heat shock protein 1, beta [Mus musculus]		
11 <u>gi</u> 1186 .01868	832 01	149	heat shock 90kDa protein 1, beta [Bos taurus]		
12 gi 1263 .52614	831 85	149	heat shock protein 90 [Equus caballus]		
13 gi 5185 .9516	832 89	149 _m	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B ember 1 [Rattus norvegicus]		
14 gi 9123 .4898	832 30	149	84 kDa heat shock protein [Rattus norvegicus]		
15 <u>gi</u> 9007 .5818	831 13	149	unnamed protein product [Macaca fascicularis]		
16 <u>gi</u> 1940 .39391	832 01	149 s	PREDICTED: heat shock 90kD protein 1, beta [Sus		
17 <u>gi 9082</u> .289	728 28	147	chaperone protein HSP90 beta [Homo sapiens]		
18 <u>gi</u> 6807	847 90	146	hypothetical protein [Homo sapiens]		
19 <u>gi</u> 1146 .07584	115 332	137 _{t:}	PREDICTED: similar to heat shock protein 90 [Pan roglodytes]		
20 gi 1940 .27	831 80	135	heat-shock protein hsp84		

Results List

2.	gi 2014 12 Que	9594 ries mat	Mass: 83 ched: 18	3212 s 3	Sco	ore: 17	1 Expect: 5.7e-
	heat sh Observe d	ock 90kI Mr(expt)	Da prote: Mr(calc)	in 1, bet ppmStar t	:a :	[Homo En Mis d s	sapiens] Peptide
	829.509 1	828.501 8	828.522 1	- 24.5331 2	-	33 70	R.ALLFIPR.R
	891.418 2	890.411 0	890.417 4	- 7.24429	-	43 5	K.FYEAFSK.N
	901.516 1	900.508 8	900.518 1	- 10.3285 5	-	29 1 0	K.TKPIWTR.N
	1080.54 28	1079.53 55	1079.52 87	6.23 ₃₃₉	-	34 70	R.APFDLFENK.K
	1194.67 58	1193.66 85	1193.64 04	23.5 ₇₃	-	⁸² 0	K.IDIIPNPQER.T
	1236.66 25	1235.65 52	1235.62 99	20.5 ₃₃₈	-	34 7 1	R.RAPFDLFENK.K
	1249.63 14	1248.62 41	1248.60 98	^{11.4} 492	-	50 2	K.EQVANSAFVER.V
	1311.61 55	1310.60 82	1310.56 26	34.8 187	-	19 6	K.EDQTEYLEER.R
	1348.68	1347.67	1347.65	14.0320	-	33 0	K.HFSVEGQLEFR.A

72 0 34 61 R.TLTLVDTGIGMTK.A + Oxidation (M) 21 4 1513.81 1512.80 1512.77 16.8 379 - 39 0 R.GVVDSEDLPLNISR.E 10 37 84 1527.76 1526.76 1526.73 16.5 307 - 31 0 K.SLTNDWEDHLAVK.H 90 17 65 1782.97 1781.96 1781.94 13.1₆₂₅ - 63₀ K.HLEINPDHPIVETLR.Q 31 58 24 9 K.HSOFIGYPITLYLEK.E 10 38 09 1847.81 1846.80 1846.78 10.4 292 - 30 0 R.NPDDITQEEYGEFYK.S 63 90 97 2176.95 2175.95 2175.93 6.13 457 - 47 R.YHTSOSGDEMTSLSEYVSR.M 85 12 79 2255.96 2254.95 2254.95 1.78 149 - 16 K.HNDDEQYAWESSAGGSFTVR.A 28 56 16 3532.66 3531.65 3531.63 4.53 09 36 76 686 9 0 K.LGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIP PLEGDEDASR.M No match to: 703.2585, 917.5213, 964.4428, 1108.5677, 1264.6711, 1787.9659, 1802.8298, 2225.1188, 2239.1374 Score: 170 Expect: 7.2e-12 Queries matched: 18 gi|306891 Mass: 83242 90kDa heat shock protein Observed Mr(expt) Mr(calc) ppm Star End Mis Peptide t s 829.5091 828.5018 828.5221 24.52 331 -337 0 R.ALLFIPR.R 891.4182890.4110890.4174 - 429 -435 0 K.FYEAFSK.N 901.5161900.5088900.5181 10.35285 -291 0 K.TKPIWTR.N 1080.5421079.5351079.528 6.23 339 -347 0 R.APFDLFENK.K 5 7 1194.6751193.6681193.640_{23.5}73⁸²0 K.IDIIPNPQER.T 5 8 1236.6621235.6551235.629 20.5 338 -347 1 R.RAPFDLFENK.K 2 1249.6311248.6241248.609 11.4 492 -502 0 K.EQVANSAFVER.V 1 8 1311.6151310.6081310.562 34.8 187 -196 0 K.EDOTEYLEER.R 5 2 6 1348.6831347.6761347.657 14.0 320 -330 0 K.HFSVEGQLEFR.A 4 1 1365.7041364.6961364.722 R.TLTLVDTGIGMTK.A + Oxidation (M) 1 8 1 1513.8111512.8031512.778_{16.8}379⁻³⁹²0 R.GVVDSEDLPLNISR.E 7 0 1527.769 1526.761 1526.736 16.5 307 -319 0 K.SLTNDWEDHLAVK.H 7 0 1782.973 1781.965 1781.942 13.1 625 -639 0 K.HLEINPDHPIVETLR.O 1 8 1808.9711807.9631807.950 7.14 205 -219 0 K.HSQFIGYPITLYLEK.E 0 8 1847.8161846.8091846.789 10.4 292 -306 0 R.NPDDITQEEYGEFYK.S 3 0 2176.958 2175.951 2175.937 6.13 457 -475 0 R.YHTSQSGDEMTSLSEYVSR.M 2 5 9

3.

2255.9622254.9552254.9511.78149-1680 8 6 6 3532.6603531.6533531.6374.53686-7190 9 6 6 4.53666 -7190 No match to: 703.2585, 917.5213, 964.4428, 1108.5677, 1264.6711, 1787.9659, 1802.8298, 2225.1188, 2239.1374

(MATRIX) (SCIENCE) Mascot Search Results

```
: Marina
User
Email
                  : mserebr@mail.ru
Search title
                  :
MS data file
                  :
D:\!MS_DATA\St_Peterburg\Bobkov\090429\1Dpage_4\1SRef\p
data\1\peaklist.txt
Database
                  : NCBInr 20090424 (8300899 sequences;
2858238196 residues)
                  : Mammalia (mammals) (722629 sequences)
Taxonomy
                  : 29 Apr 2009 at 14:12:25 GMT
Timestamp
Top Score
                  : 147 for gi 114601963, PREDICTED: heat
shock 70kDa protein 9B isoform 1 [Pan troglodytes]
                        NCBInr Decoy
Protein hits above identity threshold
                          48
                                1
Highest scoring protein hit
                          147
                                75
```

Probability Based Mowse Score

Protein score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 71 are significant (p<0.05).



```
gi 24234688
2.
                    Mass: 73635
                                    Score: 143
                                                  Expect: 3.6e-
     09 Queries matched: 17
     heat shock 70kDa protein 9 precursor [Homo sapiens]
                                  Mi
   ObservMr(expMr(cal ppSta En
                                  ss Peptide
                               d
                     m rt
     \mathbf{ed}
           t)
                 C)
   901.45900.45900.44 9.5647-65 0
                                     K.LFEMAYK.K
                       1 3
           01
                  15
     73
   958.52957.51957.48 26.<sub>77</sub> -85 0
                                     K.VLENAEGAR.T
           29
                  79
     02
                        1
```

1029.51028.51028.5 12.647-65 1 K.LFEMAYKK.M 569 496 365 8 4 1149.61148.51148.5 40.127-13 1 R.RYDDPEVQK.D 001 928 462 6 5 1242.71241.71241.6 31.207-21 0 K.DAGQISGLNVLR.V 190 118 728 4 8 1290.71289.71289.6 31.395-40 0 K.VQQTVQDLFGR.A 210 137 728 7 5 1333.61332.61332.6 29.176-18 0 K.ETAENYLGHTAK.N 708 310 9 781 7 1361.71360.71360.7 33.349-36 0 R.AOFEGIVTDLIR.R 876 804 351 3 0 1446.71445.71445.7 25.378-39 0 K.SDIGEVILVGGMTR.M 985 912 548 2 1 1462.71461.71461.7 26.378-39 0 K.SDIGEVILVGGMTR.M + Oxidation (M) 958 885 497 5 1 1568.81567.71567.7 21.108-12 0 R.QAVTNPNNTFYATK.R 044 972 631 8 1 1592.91591.91591.9 22.499-51 0 K.LLGQFTLIGIPPAPR.G 888 815 450 9 3 1645.91644.81644.8 13.219-23 0 R.VINEPTAAALAYGLDK.S 947 723 4 020 6 1694.81693.81693.8 17.188-20 0 K.NAVITVPAYFNDSQR.Q 787 714 424 1 2 1808.91807.91807.8 12.469-48 0 K.SOVFSTAADGOTOVEIK.V 2.47 174 952 3 5 1856.91855.91855.8 13.579-59 0 R.VEAVNMAEGIIHDTETK.M 300 228 986 0 5 2672.12671.12671.2 317-34 0 K.CELSSSVQTDINLPYLTMDSSGPK.H + 858 785 357 0 Oxidation (M); Propionamide (C) 39 No match to: 707.3179, 709.3379, 993.5263, 1034.6543, 1082.5881, 1199.7108, 1211.7134, 1253.6609, 1342.6524, 1487.7494, 1551.7912, 1794.8476, 1981.9967, 1993.9835, 2056.9554, 2383.9197

Таб. 5. Масс-спектрометрическое определение миозина-9 в составе пробы.

<i>{MATRIX \ { science j</i> m	Iasco	ot Sea	arch l	Results			
User	:	Mar	ina				
Email	:	mse	rebr	email.	ru		
Search title	:						
MS data file	:						
D:\!MS_DATA\St	_Pet	erb	urg\	Bobkov	\0904	27\08\1SRef	\pdata\1
\peaklist.txt							
Database	:	NCB	Inr	200904	24 (8	300899 sequ	ences;
2858238196 res	idue	es)					
Taxonomy	:	Mam	mali	la (mam	mals)	(722629 se	quences)
Timestamp	:	27	Apr	2009 a	t 12:	55:21 GMT	
Top Score	:	87	for	gi 478	47498	, mFLJ00279	protein
[Mus musculus]							
				NCBInr	Decoy		
Protein hits above identity threshold			4	0			
Highest scoring protein hit				87	54		

Probability Based Mowse Score

Protein score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 71 are significant (p<0.05).



Index

Access	Ma	Sc	Description
ion	SS	ore	Description
1 <u>gi 478</u> .47498	15 4779	87	mFLJ00279 protein [Mus musculus]
2 <u>gi 114</u> . <u>326446</u>	22 6232	79 i	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle soform 1 [Mus musculus]

3	<u>gi 149</u>	22	78 myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle
•	066032	6273	[Rattus norvegicus]
4	<u>gi 741</u>	23	78 unnamed protein product [Mus musculus]
•	$\frac{80977}{3}$	4034	nonmucalo hoory, chain mucain II A [Muc
5	$\frac{g_{1}}{78023}$	22 6217	69 musculusl
6	gi 126	22	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle
•	67788	6392	53[Homo sapiens]
7	<u>gi 742</u> 01741	11 0908	50 unnamed protein product [Mus musculus]
8	gi 740	16	PREDICTED: similar to leprecan-like 1
•	03534	920	isoform 2 [Canis familiaris]
9 •	<u>gi 189</u> 036	14 4996	47 nonmuscle myosin heavy chain (NMHC)
1 0	gi 278 06961	28 126	47 crystallin, beta B1 [Bos taurus]
1 1	<u>gi 126</u> 314033	10 5978	PREDICTED: similar to Sperm associated antigen 5 [Monodelphis domestica]
1 2	<u>gi 679</u> 68782	73 266	45 unnamed protein product [Macaca fascicularis]
1 3	<u>gi 149</u> 636798	52 398	PREDICTED: hypothetical protein [Ornithorhynchus anatinus]
1 4	<u>gi 160</u> 425231	22 6328	⁴⁵ myosin, heavy chain 9, non-muscle [Canis lupus familiaris]
1 5	<u>gi 263</u> 54574	53 141	45 unnamed protein product [Mus musculus]
1 6 •	<u>gi 109</u> 094041	20 7928	PREDICTED: similar to myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Macaca mulatta]
1 7 •	<u>gi 263</u> 45762	68 360	44 unnamed protein product [Mus musculus]
1 8 •	<u>gi 114</u> 145528	68 332	44 coiled-coil domain containing 157 [Mus musculus]
1 9 •	<u>gi 169</u> 167674	13 146	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]
2 0 •	<u>gi 202</u> 515	33 441	43 nerve growth factor

2. gi 114326446 Mass: 226232 Score: 79 Expect: 0.0095
 Queries matched: 26
 myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle isoform 1 [Mus
 musculus]
 ObserveMr(exptMr(calc ppm Sta EndMis Peptide

d)) rt s 898.529897.522897.550 _ 158-159 K.QLVRQVR.E б 8 9 924.490923.483923.486 3.72 712-718 0 R.VVFQEFR.Q 5 961.495960.488960.477 11.3 663 - 670 R.NTNPNFVR.C 8 5 7 975.480974.472974.451 22.3 824-829₀ R.NWOWWR.L 1 8 1 1193.651192.651192.60 35.8 746-755 o K.ALELDSNLYR.I 87 14 88 R.ASREEILAOAK.E 1223.671222.661222.63 28.7 765 - 775 R.AGVLAHLEEER.D 29 56 06 1305.721304.711304.66 40.7 408-419 K.EQADFAIEALAK.A 16 43 12 1318.781317.771317.74 28.1 683-693 K.LDPHLVLDQLR.C 48 75 05 1389.711388.701388.64 46.5 134-135 R.EQLEEEEEAKR.N 37 64 19 3 3 1456.841455.841455.79 32.2 184-185 K.LKDVLLQVEDER.R 74 01 33 1530.821529.811529.75 36.4 181-182 K.IAQLEEQLDNETK.E 03 30 73 6 1571.891570.891570.84 28.6 374-387₀ K.VSHLLGINVTDFTR.G 89 16 68 1662.891661.881661.86 10.3 657-670₁ K.LMATLRNTNPNFVR.C + 16 43 71 Oxidation (M) 1769.881768.881768.80 42.9 868 - 882 R.LTEMETMOSOLMAEK.L 77 05 45 1783.891782.881782.85 16.7 910-923 K.KQELEEICHDLEAR.V + 40 68 70 Propionamide (C) 1869.991868.981868.95 15.5 175 - 177 K.ANLQIDQINTDLNLER.S 54 81 92 5 0 1919.941918.931918.91 11.4 114 - 116 K.TELEDTLDSTAAQQELR.S 11 39 20 2 6 1950.021949.011948.98 15.8 141-143 R.LQQELDDLLVDLDHQR.Q 36 63 54 8 3 1961.941960.931960.91 13.9 153 - 155 K.TQLEELEDELQATEDAK.L 58 85 13 9 5 2047.992046.982046.95 11.9 110 - 112 R.ELETQISELOEDLESER.A 09 37 93 8 2296.152295.142295.09 21.9 996-101₁ K.LLEDRVAEFTTNLMEEEEK.S 16 43 40 R.IAQLEEELEEEQGNTELINDR .L 2493.152492.142492.16 56 83 67 7.37 2 2 K.DFSALESQLQDTQELLQEENR .0

2615.282614.	282614.33 19	- 105 - 107 1	R.KLEGDSTDLSDQIAELQAQIA
94 21	37	, 2 5 ⁻	ELK.M
2971.402970.	402970.34 19	.6 317-341	K.DMFQETMEAMRIMGIPEDEQM
73 00	17	T	GLLR.V
No match t	:o: 755.4062	834.3118,	899.5254, 973.5271,
1033.5342,	1207.6356,	1243.7139,	1263.7091, 1314.6440,
1323.7181,	1357.7368,	1365.7053,	1384.7457, 1420.7574,
1440.7742,	1487.8115,	1513.8481,	1544.8193, 1586.8044,
1621.8082,	1628.9209,	1699.8739,	1738.9304, 1826.8945,
1837.9594,	1997.0267,	2083.0118,	2140.0341, 2502.2094,
2529.1667,	2602.0168,	2692.2564,	2717.0321, 2720.2466,
2750.2644,	2777.2494,	2864.2615,	2921.2708, 2932.2425,
2989.2302,	3346.4925,	3403.5142	

12. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам Отдела клеточных культур Института цитологии за помощь в работе. Особенно благодарен автор своему научному руководителю проф. Г.П. Пинаеву, И.В. Кропачёвой, А.А. Айзенштадт и Н.Б. Бильдюг.