

*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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
профессор **Георгий Петрович Пинаев**  
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор **Владимир Иосифович Воробьев**  
Институт цитологии РАН

доктор биологических наук,  
**Надежда Владимировна Кулёва**  
Санкт-Петербургский  
Государственный университет

Ведущее учреждение: Московский Государственный университет,  
Биологический факультет

Защита диссертации состоится 18 июня 2010 года  
в **12** часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01  
при Институте цитологии РАН по адресу:  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.

e-mail: cellbio@mail.cytspb.ru  
сайт: www.cytspb.rssi.ru  
факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
Института цитологии РАН

Реферат разослан «18» мая 2010 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета

кандидат биологических наук



Е.В.Каминская

## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

При действии на клетки в культуре различных биологически активных молекул, таких как эпидермальный фактор роста, фактор некроза опухоли –  $\alpha$ , лизофосфатидиловая кислота и других факторов, происходит активация транскрипционных факторов, в том числе перемещение р65-субъединицы NF- $\kappa$ B из цитоплазмы в ядро, изменение экспрессии ряда генов и прочие характерные для проведения сигнала события. Одновременно с этим происходит быстрая реорганизация актинового цитоскелета. По-видимому, любые биологически активные агенты, как растворимые так и иммобилизованные на подложке, в частности белки внеклеточного матрикса, при взаимодействии с поверхностными рецепторами клетки вызывают быструю реорганизацию цитоскелета. Так, 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 каждого конкретного сигнального агента. При этом 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 сходные перестройки у клеток разного происхождения, по-видимому, должны существовать универсальные механизмы, регулирующие этот процесс.

При наблюдении за реорганизацией цитоскелета было обнаружено, что цитоскелетные белки, которые обычно находятся в составе актин-содержащих структур, выявляются в цитоплазме и в виде отдельных независимых частиц. К таким белкам относятся, в частности, актин-связывающие белки  $\alpha$ -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 выяснения их функций прежде всего надо удостовериться, что такие мультимолекулярные комплексы действительно существуют, затем определить, какие белки туда входят, а также установить, могут ли эти комплексы изменяться в процессе реорганизации цитоскелета под действием различных внешних индукторов.

### **Цели и задачи работы**

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

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Разработать метод выделения из цитозоля мультимолекулярных белковых комплексов без полного разрушения культивируемых клеток и нарушения структур актинового цитоскелета.
- 2) Провести анализ белкового состава мультимолекулярных комплексов, содержащих  $\alpha$ -актинин-4 и тропомиозин.
- 3) Установить, изменяется ли количество и состав этих комплексов в процессе реорганизации актинового цитоскелета под действием эпидермального фактора роста и других сигнальных агентов (трихостатин А, лизофосфатидиловая кислота, фактор некроза опухоли –  $\alpha$ ).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

- 1. Разработан новый метод выделения цитоплазматических мультимолекулярных белковых комплексов без разрушения структур актинового цитоскелета.
- 2. Установлено, что актин-связывающие белки тропомиозин и  $\alpha$ -актинин-4 могут существовать не только в структурах цитоскелета, но и в составе не связанных с цитоскелетом мультимолекулярных комплексов.
- 3. Показано, что в комплексы, содержащие  $\alpha$ -актинин-4, входят также р65-субъединица транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, белки теплового шока hsp70 и hsp90, а также ряд других белков – актин, миозин 9, спектрин, плектин и кератины. Состав этих комплексов изменяется при действии на клетки эпидермального фактора роста и фактора некроза опухоли-  $\alpha$ .
- 4. В комплексах, содержащих тропомиозин, выявлены р65 субъединица NF- $\kappa$ B, 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.

### **Научная новизна полученных результатов**

Разработан новый метод выделения белковых комплексов, содержащихся в цитозоле, без полного разрушения клеток, основанный на частичном разрушении плазматической мембраны малым объемом буфера. В работе впервые показано, что цитоплазматические мультимолекулярные белковые комплексы, содержащие актин-связывающие белки тропомиозин и альфа-актинин, включают в себя также белки теплового шока и сигнальные молекулы. Продемонстрировано изменение количества тропомиозиновых комплексов в нормальных и трансформированных фибробластах после действия на клетки сигнальных агентов, вызывающих реорганизации актинового цитоскелета.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Результаты имеют фундаментальное значение для понимания функционирования системы актинового цитоскелета при активации клеток сигнальными агентами, а также процесса передачи сигнала с поверхности клетки в ядро. Результаты проведенных исследований являются основой для дальнейшего установления конкретных физиологических функций, выполняемых данными цитоплазматическими мультимолекулярными белковыми комплексами. Полученные данные могут быть использованы при проведении лекционно-практических занятий в СПбГУ и СПбГПУ.

### **Апробация работы**

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в отечественных журналах и 7 тезисов. Материалы диссертации были представлены на 11-й Пушкинской международной школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 29 октября – 2 ноября 2007 г.), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 23-27 июня 2009 г.), Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2-4 июня 2009г.).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего \_\_\_ ссылки. Диссертация изложена на 1\_\_ страницах. Иллюстративный материал содержит \_\_\_ рисунков и \_\_\_ таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-01190-а) и гранта Президента Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ (№ НШ-7852.2006.4).

### **Материалы и методы**

**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 РАН). Клетки культивировали на среде Дальбекко (DMEM, Биолот) с добавлением 10% сыворотки крови эмбрионов коров (Биолот).

**Иммунофлуоресценция.** Выявление распределения актина, тропомиозина и p65 субъединицы NF-κB в препаратах распластанных клеток проводили методом непрямой иммунофлуоресценции. Клетки снимали смесью растворов 0.25% трипсина и 0.02% версена в соотношении 3:7, после чего  $1.6 \times 10^4$  клеток наносили в 100 мкл суспензии на покровные стёкла и культивировали в течение ночи при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Затем клетки фиксировали 3%-ным формалином на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, пермеабелизовали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 на PBS 15 мин при комнатной температуре и окрашивали первыми моноклональными антителами мыши против тропомиозина, p65-субъединицы транскрипционного фактора NF-κB (Sigma, США) или альфа-актина-4 (ImmunoGlobe, Германия), а затем вторыми кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (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°C. 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.

#### ***Экстракция цитоплазматических белковых комплексов.***

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

**Хроматография.** Клетки лизировали SF-буфером, быстрый и медленный экстракты фильтровали через 0.45 мкм фильтр (Millipore, США) и наносили на колонку superose 6HR (GE Healthcare, США) в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии Pharmacia System (Pharmacia, Швеция). Предварительную калибровку колонки осуществляли с помощью набора белков с разной молекулярной массой (Amersham, Швеция). В процессе хроматографии выяснилось, что сахароза и Тритон X-100 препятствуют разделению, поэтому элюцию проводили F-буфером (100 mM NaF, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM K-фосфатный буфер pH 7.0), который не содержал 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.

***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, США) (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. Иммуноблоттинг проводили в соответствии с ECL Western blotting protocols (Amersham). Мембрану промывали 20 мин буфером TBST (25 mM Трис-HCl pH 7.4, 150 mM 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 иммуноблоттинге использовали субстраты SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, США). Хемилюминесцентное излучение регистрировали при помощи системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). 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-κB (Abcam, Англия), α-актинина-4 и α-актинина-1 (Santa Cruz, США). В качестве вторых антител использовали кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши, и козы антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). При проведении иммунопреципитации для удаления неспецифически связывающихся белков в полученные в результате гель-фильтрации фракции предварительно добавляли сефарозу с пришитым белком G (Amersham, Швеция) из расчета 50 мкл на 1 мл и инкубировали, аккуратно перемешивая, 1 ч при 4°C. 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°C. Образовавшиеся комплексы с сефарозой осаждали центрифугированием при 2000 g, промывали 4 раза раствором PBS и разделяли методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом. При сравнительном анализе содержания белков в электрофоретических пробах нагрузки выравнивали по количеству общего белка в пробе, определённого методом Мэрион Брэдфорд (Bradford, 1976).

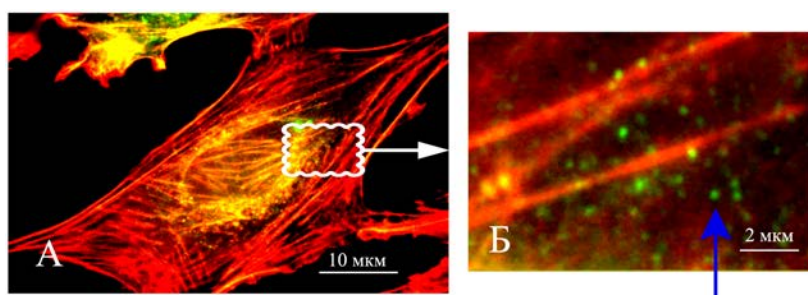
***Масс-спектрометрия.*** Для последующей масс-спектрометрии проводили гидролиз белка трипсином в полиакриламидном геле. Для этого кусочек геля размером 1-2 мм<sup>3</sup> для удаления красителя дважды промывали путем инкубации в 100 мкл 40%-ного раствора

ацетонитрила в 0.1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в течение 30 мин при 37°C. 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  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  с концентрацией 12 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 12 ч при 37°C, 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 наносили смесь 1 мкл раствора образца и 0.3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной 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), оснащённом УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моду после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005 %. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://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.

## Результаты и обсуждение

### *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. 1), 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.



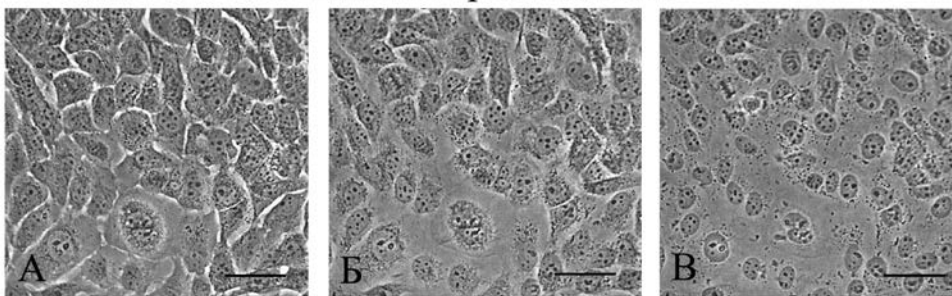
**Рис. 1. Частицы тропомиозина в цитоплазме фибробласта REF.**

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.

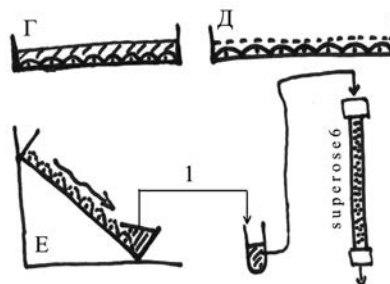


Стандартные методы выделения цитоплазматических белков включают стадию полного разрушения клеток с последующей экстракцией соответствующими буферами. Механическое воздействие и детергенты, используемые при такой процедуре, могут приводить к разрушению или изменению состава выделяемых комплексов. Для 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 локальных разрушений плазматической мембраны и быстром выделении цитоплазматических белковых комплексов с применением особого лизирующего SF-буфера pH 7.0 (100 mM NaF, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM фосфатный буфер, 1 mM EGTA, 1 M сахароза, 1 % Тритон X-100, 0.1 mM PMSF), сохраняющего соотношение между мономерными и полимерными формами актина (Blikstad and Carlsson, 1982). Чашку с монослоем клеток промывали PBS, после чего PBS тщательно отбирали, а чашку ставили на лед и на поверхность клеток каплями наносили небольшое количество SF-буфера, достаточное чтобы лизировать клеточные мембраны (из расчёта 100 мкл на одну чашку 100 мм в диаметре). В ходе анализа разных времен воздействия было установлено, что для подобной обработки клеток достаточно 1 мин после чего цитоплазматические белки выходят в окружающую среду. Для увеличения количества выделяемых комплексов быструю экстракцию проводили в течение 3 мин. Затем чашку наклоняли (схема на рис. 2) 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. Процедура последовательного переноса лизирующего буфера с чашки на чашку позволила накопить достаточное для дальнейшей хроматографии количество белка без его разбавления буфером.

### Клетки во время лизиса



### Схема:

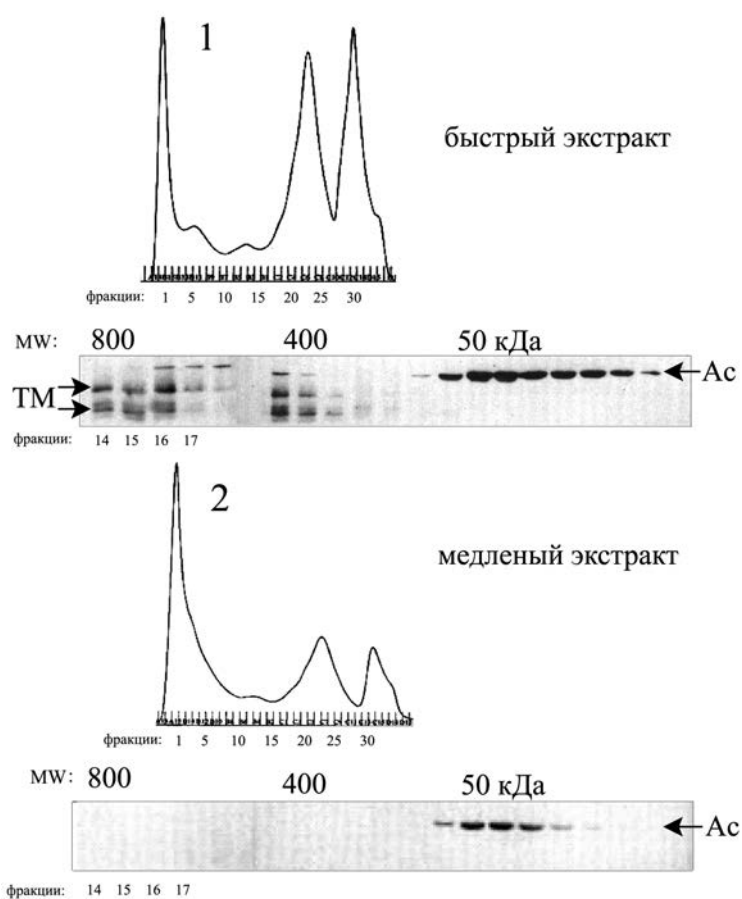


**Рис. 2.** Быстрая экстракция лизирующим SF-буфером.

А, Б, В – фотографии клеток А431 до лизирования (А), во время нанесения лизирующего буфера (Б) и после сбора быстрого экстракта (В). Лизирующий SF-буфер наносился первый раз на 3 мин (Г), затем чашку наклоняли и экстракт собирали в течение 1 мин (Е; «быстрый экстракт»: 1 на схеме). Масштабная линейка – 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 10 мин на льду и собирали разрушенные клетки скребком; затем из них центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин осаждали тритон-нерастворимую фракцию (цитоматрикс), а супернатант отбирали («медленный» экстракт). Для стабилизации выделяемых комплексов применялся описанный в литературе метод создания формальдегидных сшивок между взаимодействующими белками, который используется обычно для выделения белковых комплексов и комплексов белков с нуклеиновыми кислотами. Для этого в клеточную среду на 10 мин добавляли формальдегид в концентрации 30 мкМ, затем реакцию останавливали добавлением 0.125 M раствора глицина в PBS на 10 мин при комнатной температуре и далее проводили экстракцию белковых комплексов.

Прежде всего необходимо было выяснить, возможно ли получить белковые комплексы, не связанные с актиновыми структурами, без 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, B, B на рис. 2) и данные иммунофлуоресценции показывают, что после быстрой экстракции клетки остаются распластанными и сохраняют исходную структуру цитоскелета, ядра остаются неповреждёнными.



**Рис. 3. Сравнение профилей элюции «быстрого» и «медленного» экстрактов и содержания тропомиозина во фракциях.**

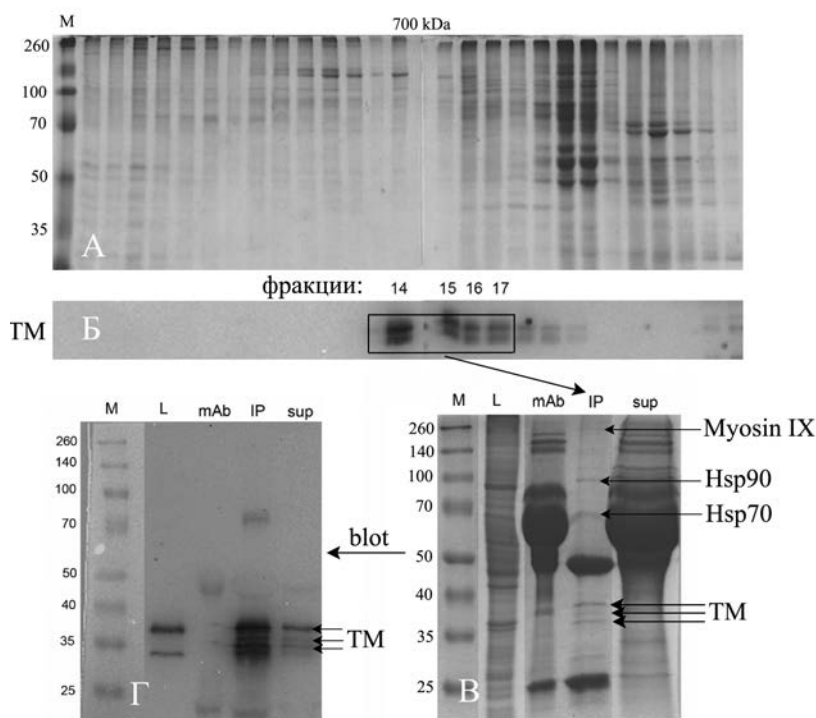
1, 2 – гель-хроматография и вестерн-блот фракций «быстрого» (1) и «медленного» (2) экстрактов из клеток REF. ТМ – окраска моноклональными антителами против тропомиозинов, Ас – окраска моноклональными антителами против бета-актина. 800, 400 и 50 кДа – калибровочные молекулярные массы фракций.

Тропомиозиновые частицы после быстрой экстракции перестают выявляться в области цитоплазмы моноклональными антителами против высокомолекулярных изоформ.

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. 3). 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 в высокомолекулярной области комплексов, содержащих тропомиозин, обнаружено не было, что свидетельствует о том, что они действительно были выделены в процессе быстрой экстракции. Актин после медленной экстракции выявлялся только в низкомолекулярной области, соответствующей мономерному белку (рис. 3).

***Определение состава мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих тропомиозин.***

Для того чтобы выяснить, какие ещё 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 клеток REF. В этих фракциях содержались комплексы, соответствующие молекулярным массам в пределах 500-800 кДа.



**Рис. 4. Выделение из цитозоля фибробластов тропомиозиновых частиц и анализ их белкового состава. Анализировали иммунопреципитат из выделенных рамкой фракций.**

А – электрофорез после геле-филтрации 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 тропомиозиновых комплексов (электрофорез). L – положительный контроль, клеточный лизат, mAb – моноклональные антитела ТМ311, 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. 4).

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

В процессе предыдущих исследований было установлено, что  $\alpha$ -актинин-4 колокализуется в цитоплазме и совместно мигрирует в ядро с р65-субъединицей транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B (Бабаков и др, 2004), а полноразмерный  $\alpha$ -актинин-4 и фрагменты  $\alpha$ -актининов 1 и 4 выявляются во фракции белков, прочно связанных с хроматином (Большакова и др., 2008), что указывает на возможную роль  $\alpha$ -актининов в проведении сигнала. Для того чтобы выяснить, входят ли альфа-актинин-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. При этом методом вестерн-блот были обнаружены полосы максимальной интенсивности, соответствующие обоим белкам в области 600-700 кДа фракций (рис. 5). Для того чтобы выяснить, какие ещё белки входят в состав комплекса с  $\alpha$ -актинином-4, были объединены фракции, соответствующие массам частиц 500-900 кДа, включающие р65 и  $\alpha$ -актинин, и проведена иммунопреципитация. В результате иммунопреципитации поликлональными антителами против альфа-актинина-4 и р65 из фракций были выделены комплексы, сходные по интенсивности и расположению электрофоретических полос. Иммуно-блотинг показал, что при иммунопреципитации из объединённых высокомолекулярных фракций антителами против  $\alpha$ -актинина-4 в комплексе с ним действительно выявляется белок р65.  $\alpha$ -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 р65, в комплексе выявляется  $\alpha$ -актинин-4, который в большей степени представлен фрагментом 75 кДа, но не выявляется  $\alpha$ -актинин-1 (рис. 6). Таким образом показано, что р65 входит в комплекс только с 4 изоформой  $\alpha$ -актинина.

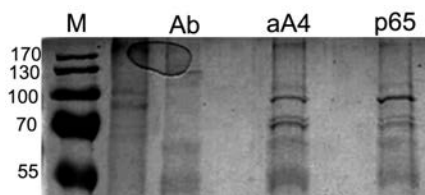


Рис. 5. Электрофоретическая картина разделения иммунопреципитатов из фракций 12-16. Дорожки: М – маркер; Ab – негативный контроль, поликлональные кроличьи антитела к  $\alpha$ -актинину-4; aA4, p65 – комплексы, осажденные антителами против  $\alpha$ -актинина-4 и р65-субъединицы NF- $\kappa$ B.

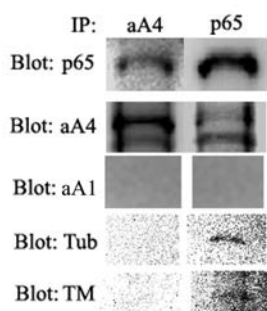


Рис. 6. Вестерн-блот анализ иммунопреципитатов, осажденных антителами против  $\alpha$ -актинина-4 (IP: aA4) и p65-субъединицы NF- $\kappa$ B (IP: p65); в комплексе с p65 выявлены  $\alpha$ -актинин-4 (aA4), тубулин (Tub) и тропомиозин (TM), не выявлен  $\alpha$ -актинин-1 (aA1).

Так как при гель-хроматографическом разделении на колонку наносился лизат клеток A431, 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 белков, исходно входящих в структуры цитоскелета. Поэтому комплексы были выделены из быстрого экстракта без разрушения клеток и разделены на колонке и сопоставлены электрофореграммы, полученные при разделении комплексов, содержащих  $\alpha$ -актинин-4, выделенные из суммарной высокомолекулярной фракции после гель-хроматографии и из быстрого экстракта с применением формальдегидной сшивки близко расположенных белков. При этом оказалось, что комплексы сходны по трём полосам в области 70 и 90 кДа, содержащим белки теплового шока и  $\alpha$ -актинин, но в выделенных из быстрых экстрактов комплексах есть дополнительные полосы как в низко-, так и в высокомолекулярной области. Это подтвердило исходное предположение о том, что в процессе разрушения клеток часть белков могут исчезать из состава комплексов. Было обнаружено 15 белковых полос с массами от 40 до 500 кДа в комплексах  $\alpha$ -актинина-4, выделенных из быстрого экстракта с применением формальдегидной сшивки. В результате масс-спектрометрического анализа удалось идентифицировать белковый состав 11 из них. Это оказались плектин-1, спектрин, миозин-9,  $\alpha$ -актинин-4,  $\beta$ -актин, цитоскелетные изоформы кератинов I и II типов (18, 5 и 6A), тубулин, а также белки семейства белков теплового шока – hsp70 и hsp90. Так как суммарная масса всех обнаруженных белков значительно превышает предполагаемую массу мультимолекулярного комплекса, то очевидно, что эти белки входят в состав разных комплексов, включающих  $\alpha$ -актинин-4. В дальнейшем планируется выяснить, в состав каких комплексов входят обнаруженные белки.

В связи с тем, что тубулин был обнаружен в составе комплекса, содержащего альфа-актинин-4, а из литературы известно, что ингибиторная субъединица транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B 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 гель-фильтрации обычного лизата клеток A431 (рис. 7).

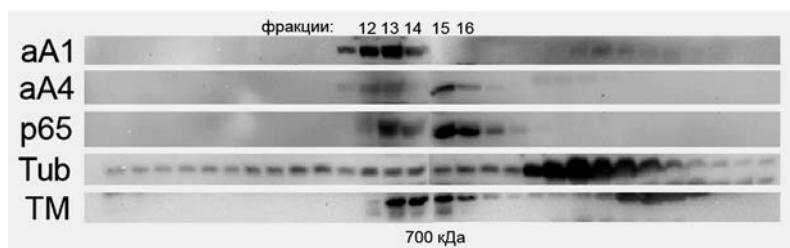


Рис. 7. Выявленные во фракциях после гель-фильтрации белки  $\alpha$ -актинин-1 (aA1),  $\alpha$ -актинин-4 (aA4), p65-субъединица NF- $\kappa$ B (p65), тубулин (Tub) и тропомиозин (TM).

Для того чтобы проверить, действительно ли тубулин входит в состав выделенных высокомолекулярных комплексов, был проведён вестерн-блот анализ. Тубулин выявился в комплексах, содержащих p65, но не был обнаружен в комплексах, содержащих  $\alpha$ -актинин-4 (рис. 6). Возможно, тубулин входит в состав комплексов с  $\alpha$ -актинином-4 только при активации клеток. Поскольку в экспериментах на фибробластах было показано, что p65 входит в состав комплексов, включающих тропомиозин, было необходимо проверить, входит ли тропомиозин в состав выделенных из клеток A431 высокомолекулярных комплексов, включающих p65. При иммунопреципитации антителами против p65 и  $\alpha$ -актинина-4 выяснилось, что тропомиозин действительно выявляется в составе комплексов, содержащих p65, но отсутствует в комплексах, содержащих  $\alpha$ -актинин-4. Видимо, p65 может независимо связываться с обоими актин-связывающими белками (рис. 6).

***Корреляция между содержанием в цитозоле тропомиозин-содержащих комплексов и степенью развитости системы актиновых микрофиламентов.***

Для того, чтобы представить себе, в какой мере наличие содержащих тропомиозин мультимолекулярных комплексов может зависеть от степени развитости актинового цитоскелета, было определено содержание тропомиозина в нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластах крысы, которые, как было показано ранее (Аре и др. 1999), существенно различаются по этому параметру. Электрофоретический анализ с последующим вестерн-блотингом демонстрирует, что в быстрых экстрактах из нормальных (REF) и иммортализованных (E1A) фибробластов содержится большое и примерно равное количество тропомиозина, а в трансформированных клетках (E-Ras) оно значительно ниже. В то же время в осадке после удаления быстрых экстрактов, содержащем структуры цитоскелета, прослеживается снижение содержания тропомиозина в иммортализованных клетках и практически полное отсутствие в трансформированных (рис. 8). 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 во фракциях, содержащих комплексы с меньшей молекулярной массой (рис. 9).

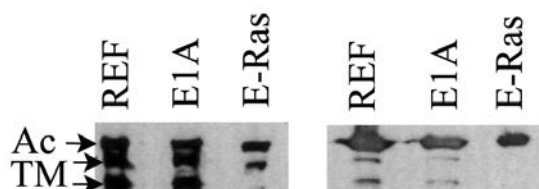


Рис. 8. Вестерн-блот анализ содержания тропомиозина в цитозоле (слева) и цитоматрикс (справа) нормальных (REF), immortalized (E1A) и трансформированных (E-Ras) фибробластов крысы.

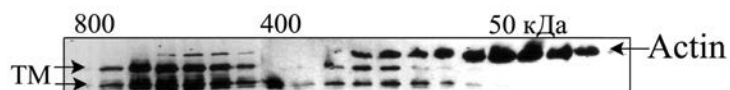


Рис. 9. Распределение актина (Actin) и тропомиозина (TM) во фракциях после гель-фильтрации тритон-растворимой фракции лизата immortalized фибробластов.

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

Ранее было показано, что при совместном действии на клетки ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-аза-2'-дезоксцитидина 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 быть связаны с подобным явлением, было оказано совместное и раздельное действие этих агентов на клетки А431, 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 увеличился (рис. 10).

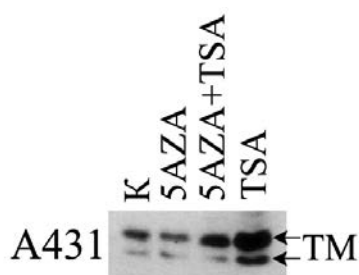


Рис. 10. Увеличение содержания HMW тропомиозинов в цитозоле клеток А431 после совместного и раздельного действия ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-аза-2'-дезоксцитидина (0.9 мкМ) и ингибитора гистоновых деацетилаз трихостатина А (50 нг/мл). Время действия – 24 ч.

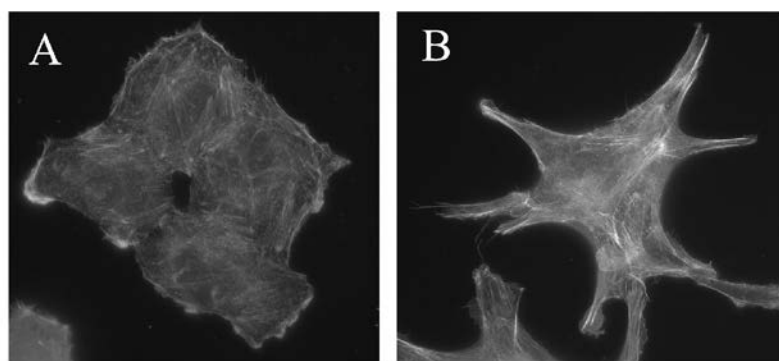


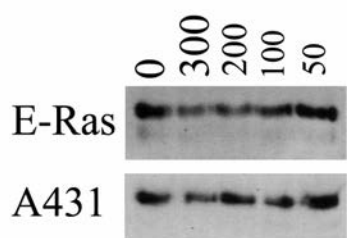
Рис. 11. Клетки HeLa в контроле (А) и через сутки после действия 500 нг/мл трихостатина (В). Окраска на актин и тропомиозин.

Так как трихостатин-А подавляет активность деацетилаз, то в данных условиях эксперимента увеличение содержания тропомиозина в клетках могло сопровождаться и его ацетилированием,

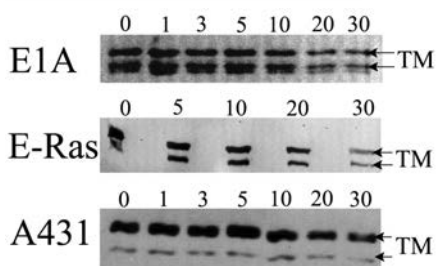
способствующим более прочному взаимодействию с фибриллярным актином. Для того чтобы проверить, приводит ли увеличение содержания тропомиозинов в клетках к изменениям в структуре актинового цитоскелета, действию трихостатина-А были подвергнуты клетки линии HeLa, обладающие, как все раковые клетки, слабо развитым цитоскелетом. Оказалось, что трихостатин-А в довольно высокой концентрации 500 нг/мл вызывает через сутки появление в клетках большого количества стресс-фибрилл, а сами клетки приобретают фибробластоподобную морфологию (рис. 11).

В связи с полученными результатами важно было выяснить, может ли подобная реорганизация актиновых структур сопровождаться изменениями в содержании тропомиозиновых частиц в цитозоле. Обычно 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 E-ras было определено влияние разных концентраций 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. 12). Поэтому в дальнейших экспериментах была использована именно эта концентрация трихостатина.



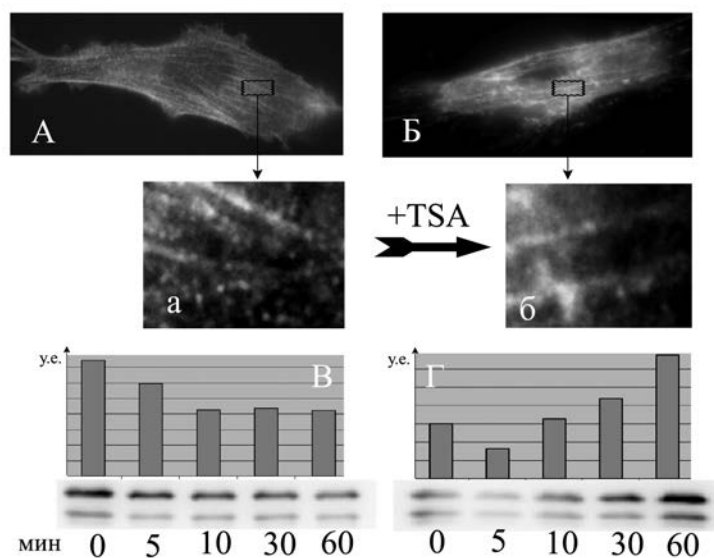
**Рис. 12.** Вестерн-блот анализ содержания тропомиозина в цитозоле клеток после стимуляции трихостатином А в различных концентрациях. Использовались трансформированные (E-Ras) фибробласты и клетки эпидермоидной карциномы (A431). Цифры – концентрация трихостатина А в культуральной среде (нг/мл), 0 – нестимулированные клетки. Время стимуляции – 24 ч.



**Рис. 13.** Вестерн-блот анализ содержания НМВ 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 эпидермоидной карциномы (A431). ТМ – окраска моноклональными антителами против НМВ тропомиозинов. Цифры – время в минутах после стимуляции (0 – нестимулированные клетки).



Электрофоретический анализ с последующим вестерн-блотингом показал, что в иммortalизованных (E1A) и трансформированных (E-gas) фибробластах, а также в клетках A431 под действием 50 нг/мл трихостатина А в течение 30 мин, когда обычно происходят быстрые перестройки цитоскелета, наблюдается последовательное снижение содержания тропомиозина в цитоплазме (рис. 13).



**Рис. 14.** Тропомиозин, выявленный в цитоплазме фибробластов до (А,а) и через 10 мин (Б,б) действия трихостатина А (50 нг/мл).

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 в содержании мультимолекулярных 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. 14). 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. 14). Полученные результаты свидетельствуют в пользу высказанного предположения о том, что тропомиозин из мультимолекулярных комплексов может переходить в прочно связанную с цитоскелетом форму, возможно за счёт ацетилирования.

***Изменение состава  $\alpha$ -актинин-4 содержащих комплексов в процессе реорганизации цитоскелета, вызванной различными сигнальными агентами.***

Из быстрых экстрактов, выделенных из контрольных и стимулированных эпидермальным фактором роста клеток A431, были получены методом иммунопреципитации комплексы, содержащие  $\alpha$ -актинин-4. Обнаружено, что при стимуляции клеток

эпидермальным фактором роста изменяется состав мультимолекулярных комплексов: через 10 мин появляется новая полоса, содержащая тубулин, и происходит накопление белка относительно контроля в полосах, содержащих  $\alpha$ -актинин-4 и hsp70. Уровень hsp90, кератина I и актина заметно не изменялся. Методом вестерн-блот обнаружено наличие p65 в составе выделенных мультимолекулярных комплексов и показано, что в нестимулированных клетках содержится полноразмерный белок, а после стимуляции ЭФР в комплексе с  $\alpha$ -актинином-4 обнаруживаются также и два его фрагмента 55 и 25 кДа. Другим сигналом, приводящим к аналогичным изменениям в составе мультимолекулярного комплекса, не связанного с цитоскелетом и содержащего  $\alpha$ -актинин-4, оказался фактор некроза опухоли- $\alpha$ . При стимуляции клеток TNF- $\alpha$  было обнаружено, что через 10 мин появляется новая полоса, содержащая тубулин, и происходит накопление белка по сравнению с его содержанием в контроле в полосах, содержащих  $\alpha$ -актинин-4 и hsp70. Уровень hsp90, кератина I и актина заметно не изменялся. Таким образом, на стадии разборки цитоскелета при действии различных сигнальных агентов наблюдается сходное изменение состава свободных мультимолекулярных комплексов.

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

Так как из литературы известно, что активные формы кислорода (АФК) оказывают влияние на процессы полимеризации 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) ведет к снижению уровня АФК в клетках и подавлению разборки цитоскелета в ответ на стимуляцию LPA (20 нг/мл) в течение 10 минут.

## Заключение

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 тропомиозиновых частиц, не связанных со структурами актинового цитоскелета. 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 et 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 взаимодействия с другими комплексами. В частности, оба этих белка способны связываться с микротрубочками (Liang and MacRae, 1997).

Наибольший интерес представляет выявление в комплексах миозина-9. В отличие от мышечного миозина, работающего в виде димера из двух полипептидных цепей (шагающий механизм из двух миозиновых головок), миозин – 9 перемещается вдоль актиновой фибриллы в виде одиночной полипептидной цепи. Это было доказано путём прямого микроскопического наблюдения за передвигающимся по нанесённым на стекло фибриллам миозином, который был сшит с зелёным флуоресцирующим белком (GFP). Миозин-9 особенно интересен тем, что в хвостовом участке содержит последовательность, гомологичную белку, активирующему ГТФазы (GAP) (Post et al., 1998, Bähler, 2000). GAP

стимулируют ГТФазную активность малых ГТФаз Rho, позволяя им работать. Белки Rho, в свою очередь, стимулируют образование стресс-фибрилл, являющихся сократимыми актомиозиновыми филаментами (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 активной 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 pH 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 и степени развитости актинового цитоскелета изменяется также и размер тропомиозиновых частиц, содержащихся в цитоплазме. Вполне возможно, что при этом могут меняться белковый состав и свойства этих частиц. Представленные данные по фибробластам говорят о том, что действительно может иметь место изменение количества тропомиозиновых комплексов при перестройках цитоскелета.

Изменение белкового состава удалось также показать и на  $\alpha$ -актинин-содержащих комплексах, выделенных из клеток A431. Эти клетки, обладая достаточно слабо развитыми структурами актинового цитоскелета, демонстрируют выраженные перестройки цитоскелета в ответ на действие растворимых или иммобилизованных на подложке факторов. При этом на сроках, соответствующих стадии разборки цитоскелета, выделенные из цитоплазмы клеток не связанные с цитоскелетом комплексы, содержащие в том числе и сигнальные белки, как оказалось, отличаются по белковому составу от комплексов, выделенных из клеток с собранным цитоскелетом.

Одним из механизмов, отвечающих за изменение количества и состава содержащих актин-связывающие белки комплексов, могут быть вторичные модификации белков. В частности, может изменяться степень ацетилирования молекул тропомиозина. Известно, что ацетилирование тропомиозинов приводит к повышению его способности связываться с

актином. Если трихостатин может способствовать ацетилированию тропомиозина, то последний под действием трихостатина 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 под действием трихостатина содержания тропомиозина в цитозоле клеток различных линий. Несмотря на наличие ряда полученных 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 изменяется белковый состав тропомиозиновых частиц и какие ещё белки в них входят.

Перестройки цитоскелета происходят при действии любых сигнальных агентов. В соответствии с этим возникает предположение о наличии универсального механизма первоначального разрушения 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, возможно, что наблюдаемые реорганизации цитоскелета зависят от уровня АФК в клетке. Проверке этого предположения была посвящена заключительная часть работы, и оказалось, что действительно существует корреляция между состоянием цитоскелета и окислительно-восстановительным статусом клетки.

### Выводы

1. 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.
3. При действии на фибробласты и клетки эпидермоидной карциномы A431 биологически активных молекул — трихостатина, эпидермального фактора роста и фактора некроза опухоли –  $\alpha$ , вызывающих реорганизацию актинового цитоскелета, происходит изменение количества и состава белковых комплексов содержащих тропомиозин и  $\alpha$ -актинин-4.
4. Повышение уровня активных форм кислорода коррелирует с разборкой структур актинового цитоскелета в клетках A431.
5. Совокупность полученных данных об изменении содержания цитоплазматических белковых комплексов, их состава, наличии в них сигнальных молекул и перераспределении тропомиозина между цитоплазмой и цитоскелетом под влиянием внешних факторов свидетельствует в пользу их участия в процессах формирования актиновых структур и передачи внутриклеточных сигналов.

### 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B и белки цитоскелета в клетках A431 // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пушино, 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- $\kappa$ B и белки цитоскелета 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 NF-кappaB солокализуются и совместно перераспределяются в клетках линии А431 // Цитология.- 2003.- Т.45.- №9.- с.847.

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

NF-кВ Transcription Factor Interacts With  $\alpha$ -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 р65-субъединицей транскрипционного фактора NF-кappaB // 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 Пушинская международная школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пушино, 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 р65-субъединицу фактора NF-кВ 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.

**Список цитируемой литературы**

*Арз А.Ф., Поспелова Т.В., Пинаев Г.П.* 1999. Цитология. 41(8) : 707-715.

*Бабаков В.Н., Бобков Д.Е., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Подольская Е.П., Пинаев Г.П.* 2004. Цитология. 46(12) : 1065-1073.

*Большакова А.В., Петухова О.А., Пинаев Г.П., Магнуссон К.-Е.* 2009. Цитология. 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.

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

*Bähler M.* 2000. Biochim. Biophys. Acta. 1496(1) : 52-9.

*Bharadwaj S., Prasad G.L.* 2002. Cancer Lett. 183 : 205-13.

*Bharadwaj S., Thanawala R., Bon G., Falcioni R., Prasad G.L.* 2005. Oncogene. 24 : 8291-303.

*Blikstad I., Carlsson L.* 1982. J. Cell Biol. 93(1) : 122-128.

- van den Boom F., Düssmann H., Uhlenbrock K., Abouhamed M., Bähler M. 2007. *Mol. Biol. Cell.* 18(4) : 1507-18.
- Bradford M.M. 1976. *Annal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Brown J.H., Cohen C. 2005. *Adv. In Prot. Chem.* 71 : 121-159.
- Cho Y.J., Liu J., Hitchcock-DeGregori S.E. 1990. *J. Biol. Chem.* 265 (1) : 538-45.
- O'Connell C.B., Mooseker M.S. 2003. *Nat. Cell. Biol.* 5(2) : 171-2.
- Crepieux P., Kwon H., Leclerc N., Spencer W., Richard S., Lin R., Hiscott J. 1997. *Mol. Cell. Biol.* 17(12) : 7375-85.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A., Di Simplicio P., Colombo R. 2001. *Free Radic. Biol. Med.* 31(12) : 1624-32.
- Grenklo S., Hillberg L., Rathje L.-S.Z., Pinaev G., Schutt C.E., Lindberg U. 2008. *European Journal of Cell Biology.* 87 : 905-920.
- Gunning P., O'Neill G., Hardeman E. 2008. *Physiol. Rev.* 88 : 1-35.
- Gunning P., Weinberger R., Jeffrey P. 1997. *Anat. Embryol.* 195 : 311-315.
- Hall A. 2005. *Biochem. Soc. Trans.* 5 : 891-5.
- Hillberg L., Zhao Rathje L.S., Nyåkern-Meazza M., Helfand B., Goldman R.D., Schutt C.E., Lindberg U. 2006. *Eur. J. Cell Biol.* 85(5) : 399-409.
- Inoue A, Saito J, Ikebe R, Ikebe M. 2002. *Nat. Cell. Biol.* 4(4) : 302-6.
- Laemmli U.K. 1970. *Nature.* 227 : 680-685.
- Lassing I, Schmitzberger F, Björnstedt M, Holmgren A, Nordlund P, Schutt CE, Lindberg U. 2007. *J Mol. Biol.* 370(2) : 331-348.
- Lazarides E. 1975. *Seminars in Cancer Biology.* 65 : 549-561.
- Liang P., MacRae T.H. 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. 2008. *Adv. Exp. Med. Biol.* 644 : 223-231.
- Mielnicki L.M., Ying A.M., Head K.L., Asch H.L., Asch B.B. 1999. *Exp. Cell Res.* 249 : 161-67.
- Miyado K., Sato M., Taniguchi S. 1997. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123 : 331-336.
- O'Neill G.M., Stehn J., Gunning P.W. 2008. *The Journal of Cell Biology.* 18 : 35-44.
- Nishikawa M., Nishikawa S., Inoue A., Iwane A.H., Yanagida T., Ikebe M. 2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(4) : 1159-64.
- Post P.L., Bokoch G.M., Mooseker M.S. 1998. *J. Cell. Sci.* 7 : 941-50.
- Prasad G.L., Masuelli L., Raj M.H.G., Harindranath N. 1999. *Oncogene.* 18 : 2027-2031.
- Shah V., Bharadwaj S., Kaibuchi K., Prasad G.L. 2001. *Oncogene.* 20 : 2112-2121.
- Skoumpla K., Coulton A.T., Lehman W., Geeves M.A., Mulvihill D.P. 2007. *Journal of Cell Science.* 120 : 1635-1645.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350-4354.
- Tsao T.-C., Bailey K., Adair G.S. 1951. *Biochem. J.* 49(1) : 27-36.
- Johnson P., Smillie L.B. 1977. *Biochemistry.* 16(10) : 2264-9.
- Urbancikova M., Hitchcock-DeGregori S.E. 1994. *J. Biol. Chem.* 269(39) : 24310-5.

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.