

**БАБАКОВ**

**Владимир Николаевич**



**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИЗОФОРМ  $\alpha$ -АКТИНИНА С ТРАНСКРИПЦИОННЫМ  
ФАКТОРОМ RelA/NF- $\kappa$ B**

03.00.25

гистология, цитология, клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2004

Работа выполнена в Отделе клеточных культур  
Института цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Г.П. Пинаев,**  
Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**Е.С. Корнилова,**  
Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор  
**А.Д. Харазова,**  
Биолого-почвенный факультет,  
Санкт-Петербургского государственного  
университета

Ведущая организация: Институт канцерогенеза ОНЦ РАМН,  
Москва

Защита состоится 17 декабря 2004 года в 13 часов на заседании Диссертационного  
совета Д 002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН  
Автореферат разослан 17 ноября 2004 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор биологических наук



**И.И. Марахова**

## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

Одной из важных и активно развивающихся областей клеточной биологии является изучение актинового цитоскелета и его участия в регуляторных процессах. Цитоскелет играет значительную роль в поддержании формы клетки и в осуществлении многих её двигательных реакций, обеспечивающих такие клеточные функции, как деление, эндо- и экзоцитоз, перемещение клеток в пространстве, контакт их с субстратом и с другими клетками (Bershadsky, Vasiliev, 1988). В последнее время появилось много работ, свидетельствующих об участии цитоскелета в регуляции экспрессии генов и проведении сигнала с поверхности клетки на ядро.

Ряд сигнальных молекул непосредственно связывается с цитоскелетом (Yamada, Geiger, 1997). Белки цитоскелета и сигнальные молекулы имеют общие домены, обеспечивающие белок-белковые взаимодействия (Mayer, Baltimore, 1993). Можно предполагать, что реорганизация является специфической реакцией цитоскелета на сигналы, поступающие в клетку от разных лиганд-рецепторных комплексов. До настоящего времени остается неясным, какую роль цитоскелет играет в сложной системе биохимических каскадов сигнальных молекул и в активации генома. Является ли цитоскелет непосредственным передатчиком сигнала или матрицей, на которой формируются сложные сигнальные комплексы или, направляющими, по которым происходит перемещение белковых комплексов в ядро? На этот очень важный вопрос еще только предстоит ответить. Трудности изучения данной проблемы обусловлены высокой динамичностью актинового цитоскелета, выражающейся в способности перестраиваться в ответ на разнообразные внешние воздействия (Schmidt, Hall, 1998).

В данной работе было предпринято исследование механизмов взаимодействия транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B с актиновым цитоскелетом. В нашей лаборатории было показано, что транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B может ассоциироваться с актином *in vitro* и *in vivo* (Are et al., 2000). Кроме того, было установлено, что важный элемент деградации ингибиторной субъединицы I $\kappa$ B- $\alpha$  и активации NF- $\kappa$ B – протеасомы – способен прямо взаимодействовать с F-актином (Галкин и др., 1998а, 1998б, 2000). В связи с тем, что



обнаружена в числе других белков, взаимодействующих с актином, оставался неясным следующий вопрос: взаимодействует ли NF- $\kappa$ B с актиновым цитоскелетом прямо или его взаимодействие опосредуется какими-либо актин-связывающими белками? Несмотря на большое число работ, посвященных транскрипционному фактору NF- $\kappa$ B, мало известно о его цитоплазматической локализации и путях транспорта его в ядро. Кроме того, специфические компоненты сигнальных каскадов, ответственные за регуляцию NF- $\kappa$ B, в большой степени неизвестны. Мы предположили, что взаимодействие NF- $\kappa$ B с актиновым цитоскелетом может осуществляться через  $\alpha$ -актинин – актин-связывающий белок, найденный в фокальных и межклеточных контактах и вдоль актиновых филаментов. Кроме того, протеинкиназа MEKK1, которая является одним из активаторов NF- $\kappa$ B, прямо взаимодействует с  $\alpha$ -актинином (Christerson et al., 1999). В немышечных клетках присутствуют две изоформы  $\alpha$ -актинина (Otey, Carpen, 2004):  $\alpha$ -актинин-1 и недавно открытая изоформа  $\alpha$ -актинин-4 (Honda et al., 1998), и вполне вероятно, что NF- $\kappa$ B может взаимодействовать только с одной из этих изоформ. Поэтому в данной работе предпринята попытка определить роль различных изоформ  $\alpha$ -актинина в процессе формирования фокальных контактов и в процессах активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B.

### **Цели и задачи работы**

Основной целью данной работы являлось проверка гипотезы о взаимодействии актин-связывающего белка  $\alpha$ -актинина с комплексом транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B *in vivo* и *in vitro* в клетках линий A431 и HEK293 и характеристика этого взаимодействия.

Для достижения указанной цели было необходимо решить ряд задач.

1. Изучить эффект фосфорилирования по тирозину  $\alpha$ -актинина при адгезии клеток A431 на фибронектине, ламинине 2/4 и на антителах к рецептору ЭФР на взаимодействие с транскрипционным фактором NF- $\kappa$ B.
2. Сопоставить характер распределения транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и немышечных изоформ  $\alpha$ -актинина в клетках линий A431 и HEK293.
3. Используя набор биохимических методов, исследовать способность к взаимодействию изоформ  $\alpha$ -актинина с активированным и неактивным комплексом NF- $\kappa$ B.

4. Установить характер распределения изоформ  $\alpha$ -актинина при активации NF- $\kappa$ B, используя клеточные линии, стабильно трансфицированные плазмидами, кодирующими изоформы  $\alpha$ -актинина, слитыми с зеленым флуоресцентным белком.
5. Исследовать ДНК-связывающую активность NF- $\kappa$ B в клетках с различным состоянием актинового цитоскелета.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1.  $\alpha$ -Актинин-4 взаимодействует с комплексом транскрипционного фактора RelA/NF- $\kappa$ B в клетках A431 и HEK293. Активация NF- $\kappa$ B приводит к совместной транслокации  $\alpha$ -актинина-4 и NF- $\kappa$ B в ядро.
2. Разрушение актинового цитоскелета цитохалазином приводит к транслокации  $\alpha$ -актинина-4 и NF- $\kappa$ B в ядро и увеличивает ДНК-связывающую активность NF- $\kappa$ B.  $\alpha$ -Актинин-4 может входить в состав транскрипционного комплекса NF- $\kappa$ B.
3. Актиновый цитоскелет и актин-связывающие белки являются скаффолд-системой для транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и элементов его активации.

#### **Научная новизна полученных результатов**

В работе впервые установлена способность изоформ актин-связывающего белка  $\alpha$ -актинина к ассоциации с транскрипционным фактором NF- $\kappa$ B в условиях *in vivo* и *in vitro*. Стимуляция клеток A431 эпидермальным фактором роста и клеток HEK293 фактором некроза опухолей и форболовым эфиром приводит к транслокации NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинина-4 в ядро. Впервые получены данные об участии  $\alpha$ -актинина-4 в формировании транскрипционного комплекса NF- $\kappa$ B на специфичной последовательности ДНК.

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

Полученные результаты свидетельствуют о возможности участия  $\alpha$ -актинина-4 в регуляции экспрессии генов на уровне активации транскрипции. Эти результаты позволяют предполагать новые механизмы участия актинового цитоскелета в процессах проведения внутриклеточных сигналов.

Результаты работы имеют фундаментальное значение для дальнейшего углубленного изучения механизмов контроля экспрессии генов на уровне активации транскрипции в клетках эукариотических организмов и установления роли актинового цитоскелета и актин-связывающих белков в этих процессах.

## Апробация работы

Материалы диссертации были доложены на 3 съезде биохимиков России (С.-Петербург, 2002), на Всероссийских симпозиумах «Биология клетки в культуре» (С.-Петербург, 2001, 2003), на 3 съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), на международной конференции FEBS Special Meeting on Signal Transduction (Брюссель, 2003), на международной конференции FEBS Special Meeting «Cytoskeletal Dynamics: from cell biology to development and disease» (Хельсинки, 2004). Диссертационная работа апробирована на научном семинаре Отдела клеточных культур Института цитологии РАН 12 мая 2004 г.

## Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на *100* страницах машинописного текста и состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение результатов», выводов и списка цитируемой литературы, содержащего *43* наименования. Иллюстративный материал содержит *21* рисунка и 1 таблицу.

## Материалы и методы

**Культивирование клеток:** В работе использовали клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431, эмбриональные клетки почки человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, с добавлением 10% эмбриональной сыворотки при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Трансфекция клеток:** A431 и HEK293 клетки трансфецировали плазмидами, содержащими разные клеточные изоформы α-актинина, слитые с зеленым флюоресцентным белком. Плазмиды были любезно предоставлены Dr. Carol Otey (Университет штата Северной Каролины, США). Для трансфекции использовали 6 мкл LipofectAMINE и 1 мкг плазмидной ДНК. Для получения постоянных линий использовали селекцию на антибиотике G418.

**Иммуофлуоресценция:** 100 мкл суспензии клеток ( $1.6 \times 10^5$  клеток/мл) наносили на силиконизированные покровные стекла, покрытые фибронектином, и культивировали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Затем меняли среду на другую, содержащую 100 нг/мл ЭФР, 100 нМ вортманнина или 2 мкг/мл цитохалазина D. После фиксации и пермеабелизации, клетки инкубировали с

моноклональными антителами к субъединице p65 (Santa Cruz, США) и вторыми антителами, конъюгированными с FITC. Затем клетки инкубировали кроличьими поликлональными антителами к  $\alpha$ -актину-4 (ImmunoGlobe, Германия) и вторыми антителами, конъюгированными с Cy3. Препараты исследовали с помощью конфокального микроскопа Leica (Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм для FITC и HeNe лазер с длиной волны 543 нм для Cy3.

**Получение клеточных экстрактов для аффинной хроматографии:** Клетки A431 и HEK293, выросшие на пластике до субконфлюэнтного состояния, промывали PBS и замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ . После разморозки клетки инкубировали 5 мин в буфере, содержащем 5 мМ Трис-НСl pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF и набор протеазных ингибиторов Complete<sup>TM</sup>. Снятые с пластика клетки гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса. Лизат центрифугировали 10 мин 2500 g для удаления ядер и для дальнейшей очистки центрифугировали 30 мин 12000 g. К супернатанту добавляли Трис-НСl pH 7,5 до конечной концентрации 50 мМ и NaCl до конечной концентрации 100 мМ.

**Аффинная хроматография на колонке с иммобилизованным  $\alpha$ -актинином:** Гладкомышечный  $\alpha$ -актинин из куриных желудков был получен набором описанных методов (Feramisco, Burridge, 1980). Чистоту полученного белка контролировали электрофоретически. Полученный белковый раствор диализовали против буфера, содержащего 0.1 М  $\text{NaHCO}_3$  и 0.3 М NaCl, затем 2 мл белкового раствора с концентрацией 2 мг/мл связывали с 3 мл CNBr-активированной сефарозой. Связывание проводили в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . Дальнейшие процедуры проводили при  $4^{\circ}\text{C}$ . Для остановки реакции был добавлен 3 М моноэтаноламин (pH 8.0), до конечной концентрации 50 мМ на 2 ч. После упаковки колонку промывали трижды. В каждый цикл промывки входили отличающиеся по pH буферные растворы: сначала 0,1 М ацетатный буфер pH 4.0, затем Трис-НСl pH 8.0. Все буферные растворы содержали 0.3 М NaCl. Затем колонку уравнивали буфером для хроматографии (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ, 0.05% Nonidet-P40). После нанесения клеточного экстракта колонку промывали буфером для хроматографии до тех пор, пока концентрация белка на выходе колонки не стала меньше 5 мкг/мл. Элюцию белков,

связавшихся с колонкой, проводили буфером для хроматографии, содержащим 4 М мочевины. Концентрацию белка измеряли методом Бредфорд (Bradford, 1976). Пиковые фракции, содержащие основное количество белка, объединяли и белок высаживали добавлением трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10 %, осадок ресуспендировали в буфере для электрофореза и нейтрализовали кислоту добавлением 1.5 М Трис-HCl, pH 8.8. Белки, связавшиеся с аффинной колонкой, выявляли иммуноблоттингом.

**Блот-оверлей:** Очищенный гладкомышечный  $\alpha$ -актинин и его фрагменты подвергали электрофорезу и переносили на PVDF мембрану (Cao et al., 2001). Протеолитические фрагменты  $\alpha$ -актинина получали инкубацией с термолизинном (в соотношении протеаза/субстрат 1:20) в 25 мМ Трис-HCl буфере pH 7.5 и 150 мМ NaCl. Мембрану с иммобилизованными  $\alpha$ -актинином и его фрагментами инкубировали в блокирующем буфере (50 мМ Трис-HCl pH 7.5 и 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1%-ный Тритон X100, 2%-ный BSA) в течение 5 ч при 4 °С. Затем мембрану инкубировали с лизатом клеток A431 (концентрация белка 1 мг/мл) в буферном растворе 25 мМ Трис-HCl pH 7.5 и 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1%-ный Тритон X100, 2%-ный BSA и 1 мМ PMSF в течение ночи при 4 °С. Мембрану промывали дважды по 15 мин TBST и проводили на ней иммуноблоттинг с использованием антител к p50 и p65 субъединицам NF- $\kappa$ B и I $\kappa$ B $\alpha$ .

**Имунопреципитация:** Клетки промывали буфером PBS и лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl, pH 7.4; 150 мМ NaCl; 1%-ный Тритон X100; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ PMSF; 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; набор протеазных ингибиторов). Лизаты очищали центрифугированием в течение 10 мин при 12000 g. После предварительной очистки сефарозой с пришитым белком A в лизаты добавляли первые антитела против p65, p50,  $\alpha$ -актинина и инкубировали на льду в течение 2 ч. Для адсорбции комплекса антиген-антитело в пробы добавляли сефарозу с ковалентно пришитым белком A (Protein A Sepharose, "Pharmacia") и инкубировали еще 1 ч. Все инкубации проводили при плавном перемешивании на качалке. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Бредфорд. Затем пробы центрифугировали 5 мин при 1000g и полученный осадок трижды промывали, ресуспендируя его в 1 мл буфера для иммунопреципитации с последующим центрифугированием. Осадок ресуспендировали в буфере для электрофорезных проб. Наличие в преципитатах



белков выявляли с помощью метода иммуноблотинга. Для иммунопреципитации из ядерных экстрактов, использовали 100 мкг белка экстрактов и проводили такую же процедуру. Электрофорез (Laemmli, 1970) и иммуноблотинг (Towbin et al., 1979) с использованием системы усиленной хемилюминесценции проводили по стандартным методикам.

**Выделение ядерных экстрактов:** Клетки, культивируемые во флаконах, инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в присутствии вортманнина, ингибитора Р13 киназ 1 и 3-го типа, цитохалазина D и ЭФР, промывали тёплым PBS и лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НCl, pH 7.9, 0.32 М сахарозу, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ EDTA, 0.1%-ный Тритон X-100, 1.0 мМ DTT и 0.5 мМ PMSF. Ядра осаждали центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин, осадок ядер ресуспендировали и очищали центрифугированием в 0.5 М сахарозе (Марзлав, Хуан, 1987). Фракции, содержащие транскрипционные факторы, экстрагировали при 0 °С в течение 30 мин буфером, содержащим 20 мМ HEPES, pH 7.9, 400 мМ NaCl, 25 % глицерина, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мМ EDTA, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ DTT, 2 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, и набор протеазных ингибиторов Complete™ (Roche, Германия), и центрифугировали при 12000g в течение 30 мин. Концентрацию белка в ядерных экстрактах определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Белки хранили при -70 °С в аликвотах.

**Анализ ДНК-связывающей активности NF-κB в ядерных экстрактах:** Для EMSA (electromobility shift assay) анализа в реакции связывания использовали равные количества белка (7 мкг). Экстракты инкубировали в буфере (20 мМ HEPES, pH7.9, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ DTT, 12%-ный глицерин), содержащем поли(dI-dC) и олигонуклеотидную пробу, меченную по 5'-концу (50000 cpm). Двухцепочечный олигонуклеотид NF-κB 5'-agttgaggggactttcccaggc-3' метили с использованием γ<sup>32</sup>P-АТФ в полинуклеотидкиназной реакции. Реакцию связывания проводили 20 мин при комнатной температуре. В реакции конкуренции ядерные экстракты преинкубировали с избытком специфического конкурента 15 мин при комнатной температуре. Антитела, специфичные к α-актину-4, добавляли к экстракту за 30 мин до смешивания с меченым олигонуклеотидом. По окончании реакции пробы разделяли в нативном 4%-ном ПААГ при постоянном

напряжении (10 В/см) в ТАЕ-буфере. Гели высушивали и экспонировали с плёнкой Kodak X-Omat при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Результаты и обсуждение

В состав комплекса транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B входят димер, состоящий из белков Rel/NF- $\kappa$ B семейства, способный связывать ДНК, и ингибиторный белок, принадлежащий I- $\kappa$ B семейству. Наиболее изучен классический NF- $\kappa$ B - гетеродимер p50 и p65, хотя описаны и другие гомо- и гетеродимеры. Разные димеры имеют свои особенности, включая сайты узнавания ДНК, специфичность клеточного типа, субклеточную локализацию, взаимодействие с разными формами I $\kappa$ B, различные пути активации. Все это увеличивает возможности NF- $\kappa$ B в регуляции экспрессии разных генов. Ингибиторный белок I $\kappa$ B- $\alpha$  удерживает NF- $\kappa$ B в цитоплазме в неактивной форме, маскируя при этом NLS (nuclear localization signal) - последовательность ядерной локализации (Liou and Baltimore, 1993). При активации происходит фосфорилирование I $\kappa$ B- $\alpha$  (по остаткам серина 32 и 36) и убиквитинирование (в положениях Arg21/Arg22) с последующей деградацией на протеосомах, а освобожденный NF- $\kappa$ B перемещается в ядро, где активирует соответствующие гены (Palombella et al., 1994). 26S-протеасомы, состоящие из 19S-регуляторного комплекса и 20S-протеасомы, способны прямо взаимодействовать с F-актином (Галкин и др., 1998а). 20S-протеасомы прямо не взаимодействуют с F-актином, однако, при диссоциации 20S-комплекса, все субъединицы, кроме белка с мол. массой 27 кДа, способны образовывать макромолекулярный комплекс с F-актином (Галкин и др., 2000). Эти данные позволяют предполагать организующую роль актинового цитоскелета при активации NF- $\kappa$ B.

В последнее время появился ряд работ, указывающих на то, что NF- $\kappa$ B, с одной стороны, активируется белками внеклеточного матрикса и малыми ГТФазами, принимающими участие в регуляции структуры актинового цитоскелета (Qwarnstrom et al., 1994; Xu et al., 1998), а с другой, стимулирует адгезию и миграцию клеток (Eck et al., 1993; Yebra et al., 1995; Benoliel et al., 1997). Все эти данные дают основание предполагать возможность непосредственного участия NF- $\kappa$ B в процессах адгезии и формирования структуры актинового цитоскелета, возможно, через активацию транскрипции соответствующих генов.  $\alpha$ -

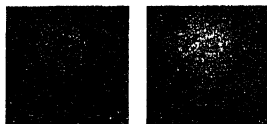
Актинин – важный элемент фокальных контактов (Otey, Carpen, 2004), способен фосфорилироваться по тирозину киназой фокальных контактов FAK (Igazzuirt et al., 2001). В настоящей работе было установлено, что  $\alpha$ -актинин формирует иммунный комплекс с FAK и фосфорилируется по тирозину при активации FAK при адгезии клеток A431 на элементах внеклеточного матрикса фибронектине, ламинине 2/4 и на антителах к рецептору ЭФР. Фосфорилированный  $\alpha$ -актинин перераспределяется в Тритон X100-растворимую субклеточную фракцию, что предполагает снижение сродства  $\alpha$ -актинина к F-актину. При этом фосфорилированный  $\alpha$ -актинин сохраняет иммунный комплекс с p65 субъединицей NF- $\kappa$ B (Бабаков и др., 2002).

Субъединица p65/RelA NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинин, как показано методом иммунофлуоресценции, совместно локализуются в цитоплазме в областях фокальных контактов, вдоль актиновых филаментов и в кортикальной области в клетках A431 и HEK293. Для того, чтобы проверить, является ли взаимодействие временным, и не нарушается ли совместная локализация p65 и  $\alpha$ -актинина при активации NF- $\kappa$ B, был проведен анализ перераспределения этих двух белков в условиях активации NF- $\kappa$ B. Для этого на клетках линий A431 и HEK293 исследовали локализацию p65 субъединицы NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинина при активации NF- $\kappa$ B на различных сроках стимуляции клеток. Использовали ЭФР в концентрации 100 нг/мл для клеток A431 (Ohtsubo et al., 2000), при которой происходит активация NF- $\kappa$ B. Через 5 мин после введения в среду ЭФР оба белка перераспределяются в область пучков F-актина, расположенных по всему периметру клеток. При этом совместная локализация NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинина сохраняется. По-видимому, эти структуры концентрируются в областях дорзального рафплинга. Через 10 мин инкубации актин-содержащие структуры располагаются в околядерной области, а через 20-30 мин оба белка обнаруживаются в ядре (рис. 1).

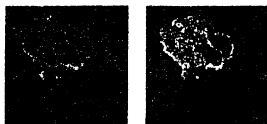
Другие имеющиеся у нас моноклональные антитела к  $\alpha$ -актину, (BM-75.2, Sigma, США), взаимодействующие только с  $\alpha$ -актинином-1 (Araki et al., 2000), дают другую картину распределения белка в клетке и не окрашивают ядро.

$\alpha$ -Актинин-4 p65/RelA

0 мин ЭФР



5 мин ЭФР



10 мин ЭФР



30 мин ЭФР

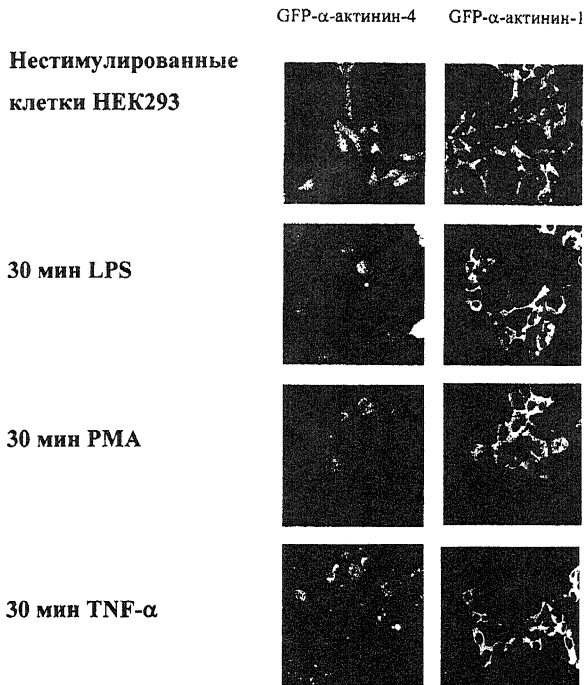


Рис.1 Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной локализации  $\alpha$ -актинина-4 и p65 субъединицы NF- $\kappa$ B в клетках A431 распластанных на фибронектине и затем обработанных эпидермальным фактором роста (100 нг/мл) в течение 5, 10 и 30 мин.

В клетках линии НЕК293 эти белки совместно локализируются в микроворсинках и в подмембранной области. Стимуляция клеток форболовым эфиром или фактором некроза опухолей приводит к транслокации p65 и  $\alpha$ -актинина-4 в ядро. Чтобы подтвердить, что в указанных условиях в ядро мигрирует только одна изоформа  $\alpha$ -актинина, использовали постоянно трансфицированные плазмидами GFP- $\alpha$ -актинин-1 и GFP- $\alpha$ -актинин-4 клетки A431 и НЕК293. В клетках A431 только изоформа  $\alpha$ -актинин-4 перераспределяется в ядро при действии ЭФР. В клетках НЕК293 изоформа  $\alpha$ -актинин-4 способна мигрировать в ядро при действии на клетки ФНО- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), форболового эфира (PMA) и липополисахарида (LPS).  $\alpha$ -Актинин-1 не обнаружен в ядрах во всех случаях.

Известно, что обработка клеток цитохалазином приводит к разборке актинового цитоскелета. С целью проверки достоверности совместной локализации p65 с актиновыми структурами были подобраны условия, при которых происходила разборка микрофиламентов. В клетках, обработанных 0.2 мМ цитохалазином D в течение 40 мин, p65 и  $\alpha$ -актинин выявлялись вдоль сохранившихся стресс фибрилл и в актин-содержащих агрегатах в цитоплазме.

Кроме того, оба белка обнаруживались в ядре. Этот эффект был обнаружен в клетках обеих линий.



**Рис.2.** Накопление  $\alpha$ -актинина-4 в ядре при действии активаторов NF- $\kappa$ B.

Клетки HEK293, стабильно трансфицированные плазидами, кодирующие  $\alpha$ -актинин-1 и  $\alpha$ -актинин-4, слитых с зеленым флуоресцентным белком обрабатывали активаторами NF- $\kappa$ B. LPS – липополисахарид (10 нг/мл), PMA – форболовый эфир (10 нг/мл), TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей -  $\alpha$  (10 нг/мл)

При действии вортманнина, известного ингибитора PI3-киназ 1 и 3-го типа, который не вызывал драматичной разборки цитоскелета, также часть клеточного пула  $\alpha$ -актинина и р65 обнаруживались в ядре. Эти данные говорят о существенной роли фосфотидилинозитидов и подмембранного цитоскелета в регуляции NF- $\kappa$ B. При стимуляции клеток ЭФР в течение 30 мин уменьшается содержание обеих субъединиц в цитоскелетной Тритон X100-нерастворимой фракции и происходит их накопление в ядерном экстракте. Если предварительно обработать клетки цитохалазином или вортманином перед действием ЭФР, то накопление р65 и  $\alpha$ -актинина-4 в ядре усиливается относительно стимулированных, но не предобработанных клеток (рис. 3). Сходную картину накопления в ядре демонстрирует р50 субъединица NF- $\kappa$ B.  $\beta$ -Актин значительно накапливается в ядре

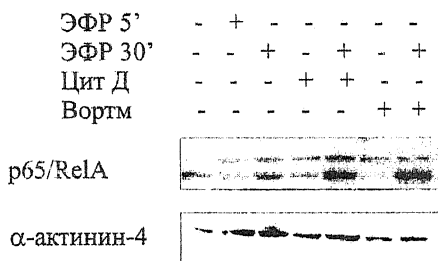


Рис.3 Накопление p65 субъединицы NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинина-4 в ядерных экстрактах клеток A431 под действием 100 нг/мл ЭФР в течение 5, 30 мин, 2 мкг/мл цитохалазина D (Цит Д) и 100 нМ вортманнина (Вортм). Иммуноблоттинг с использованием соответствующих антител. Плюсом отмечены дорожки с ядерным экстрактом из клеток, получивших соответствующий сигнал или их комбинацию.

только при действии на клетки цитохалазина D. Киназа MEKK1 накапливается в ядре при действии ЭФР, но цитохалазин D и вортманнин ингибируют ее накопление.

Возможность прямой связи между  $\alpha$ -актинином и белками комплекса NF- $\kappa$ B исследовали методом иммунопреципитации. Для этой цели лизаты клеток A431 и HEK293 инкубировали с антителами против p65/RelA и образовавшиеся белковые комплексы преципитировали сефарозой с ковалентно пришитым белком A. Полученные преципитаты подвергали электрофорезу и анализировали методом иммуноблоттинга. С клетками A431 в суспензионном состоянии и в клетках, распластанных на белках ВКМ и антителах к рецептору ЭФР, взаимодействие  $\alpha$ -актинин и p65/RelA субъединицы транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B действительно происходит и эти белки способны к совместной иммунопреципитации. Кроме того, иммунный комплекс остается стабильным вне зависимости от стимуляции клеток ЭФР или обработки цитохалазином (рис. 4) Для того, чтобы подтвердить данные иммунофлуоресценции о взаимодействии p65 и  $\alpha$ -актинина-4 в ядре, использовали метод иммунопреципитации из ядерных экстрактов. На рис. 4б представлены результаты иммуноблоттинга с использованием антител к  $\alpha$ -актину-4 иммунных комплексов, полученных антителами к p65 из ядерных экстрактов контрольных клеток; клеток, стимулированных ЭФР и клеток предварительно обработанных цитохалазином D. Результаты иммуноблоттинга демонстрируют, что комплекс p65 и  $\alpha$ -актинина-4 сохраняется в клеточном ядре. Кроме того, сохраняется кинетика накопления  $\alpha$ -актинина-4 в ядре, что позволяет говорить о специфичном взаимодействии.

ЭФР 5 мин	-	+	-	-	-	ЭФР 5 мин	-	-	+	-	-
ЭФР 30 мин	-	-	+	-	+	ЭФР 30 мин	-	-	-	+	+
Цитохалазин D	-	-	-	+	+	Цитохалазин D	-	+	-	-	+

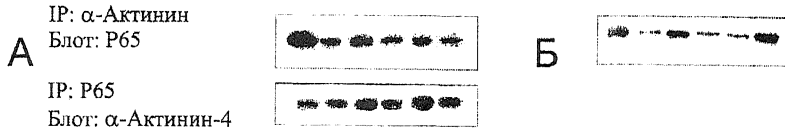


Рис. 4. (А) Определение взаимодействия NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинаина методом иммунопреципитации из лизатов клеток А431. Клетки А431 стимулировали 100 нг/мл ЭФР 5 и 30 мин, и предварительно обрабатывали цитохалазином D. Клеточные экстракты преципитировали поликлональными антителами к  $\alpha$ -актинуину и р65 с последующим иммуноблотингом антителами к р65 и  $\alpha$ -актинуину-4. (Б) Иммунопреципитация антителами к р65 из ядерных экстрактов клеток А431. Иммуноблотинг с использованием антител к  $\alpha$ -актинуину-4. Первая дорожка на всех иммуноблотах – контрольная, с лизатом клеток А431.

В составе комплекса  $\alpha$ -актинин определяется только поликлональными антителами к  $\alpha$ -актинуину и антителами к  $\alpha$ -актинуину-4 и не выявляется антителами к  $\alpha$ -актинуину-1. В комплексе также выявляется субъединица р50, но не выявляются I $\kappa$ B и  $\beta$ -актин.

Для того чтобы выяснить, является ли совместная локализация р65 с актиновыми структурами и  $\alpha$ -актинином следствием их взаимодействия, была проведена аффинная хроматография клеточных экстрактов на  $\alpha$ -актининовой колонке. Для иммобилизации с носителем использовали очищенный гладкомышечный  $\alpha$ -актинин. Гладкомышечная изоформа  $\alpha$ -актинаина из всех мышечных изоформ является наиболее близкой к клеточным изоформам. Клеточные экстракты клеток А431 и НЕК293 наносили на колонку с иммобилизованным  $\alpha$ -актинином, после чего исходные экстракты и связавшиеся с колонкой белки анализировали на электрофорезе с последующим иммуноблотингом с использованием антител к р65, р50 и I $\kappa$ B- $\alpha$ , как описано в разделе «Материалы и методы». Профиль элюции белков, связавшихся с  $\alpha$ -актинином, представлен на рис 5. Результаты иммуноблотинга показали, что р65 и р50 субъединицы NF- $\kappa$ B, но не ингибиторная субъединица I $\kappa$ B- $\alpha$  из экстрактов

клеток A431 и HEK293, присутствуют среди белков, связавшихся с иммобилизованным  $\alpha$ -актинином (рис 5).

Чтобы определить домен  $\alpha$ -актина, взаимодействующий с NF- $\kappa$ B использовали ограниченный протеолиз гладкомышечного  $\alpha$ -актина термолизином. Белок и его фрагменты подвергали электрофорезу и элекропереносу. Затем мембрану инкубировали с лизатом клеток A431 и подвергали иммуноблотингу с использованием антител к разным субъединицам комплекса NF- $\kappa$ B. Все субъединицы комплекса NF- $\kappa$ B могут взаимодействовать с полноразмерным  $\alpha$ -актинином, но только р65 субъединица взаимодействует с 53 кДа фрагментом  $\alpha$ -актина (рис. 6).

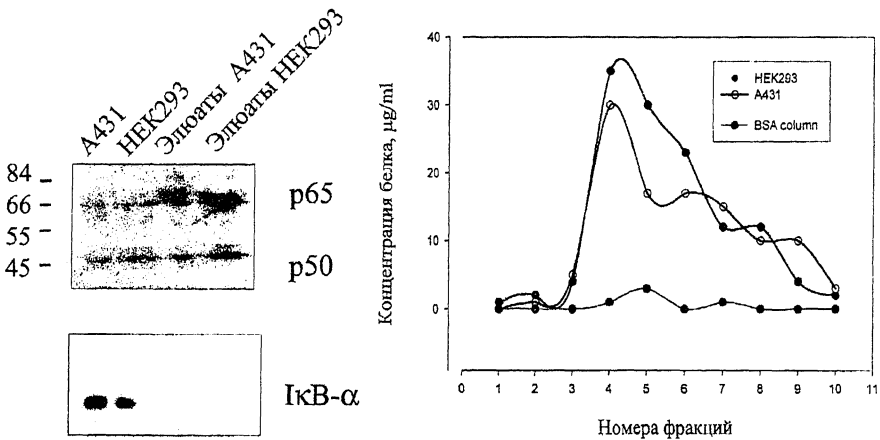


Рис.5 Иммуноблотинг с использованием антител к р65 и р50 субъединицам NF- $\kappa$ B и I $\kappa$ B- $\alpha$ , белков, связавшихся с иммобилизованным гладкомышечным  $\alpha$ -актинином. Профиль элюции лизатов клеток A431 и HEK 293 с  $\alpha$ -актининовой колонки. BSA column – профиль элюции с контрольной колонки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином.

Одним из показателей активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B является его способность связываться с регуляторными  $\kappa$ B-элементами, имеющими последовательность 5'-AGTTGAGGGACTTCCCAGGC-3'. ДНК-связывающую активность NF- $\kappa$ B исследовали методом торможения в геле – изменения электрофоретической подвижности Р<sup>32</sup>-меченного  $\kappa$ B-элемента после взаимодействия с белками (рис. 7а). Белки ядерных экстрактов клеток A431 при взаимодействии с NF- $\kappa$ B консенсусной последовательностью образуют



специфичные ДНК-белковые комплексы, различающиеся по электрофоретической подвижности. Инкубация клеток в присутствии ЭФР приводила к формированию четырех специфичных новых ДНК-белковых комплексов (Петухова и др. 2005).

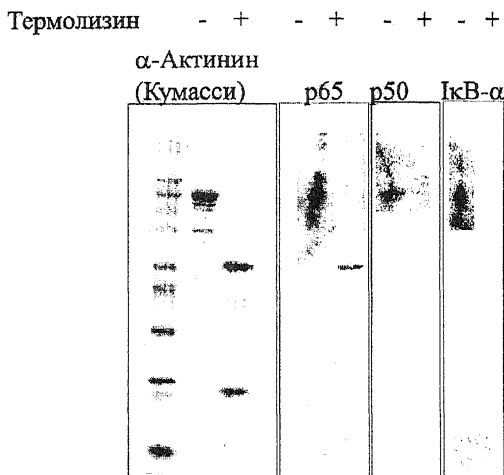


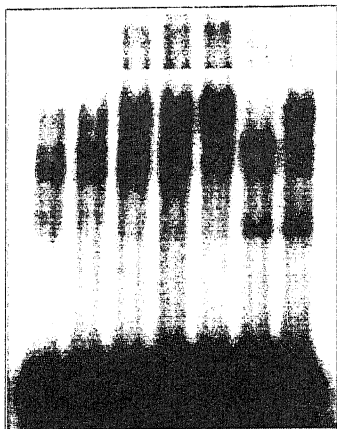
Рис. 6. Блот-оверлей на очищенном  $\alpha$ -актинине и его фрагментах. Гладкомышечный  $\alpha$ -актинин и его фрагменты, полученные с помощью термолизина, подвергали электрофорезу (Кумасси) и переносили на PVDF мембрану. Мембрану инкубировали в лизате клеток A431, отмывали и подвергали процедуре иммуноблотинга с использованием антител к p65, p50 и I $\kappa$ B- $\alpha$ .

Обработка клеток цитохалазином D приводит к аналогичному изменению. Совместное действие цитохалазина D и ЭФР усиливает ДНК-связывающую активность NF- $\kappa$ B. Активация NF- $\kappa$ B цитохалазином D была независимо подтверждена в недавно опубликованной работе (Nemeth et al., 2004). Обработка клеток вортманнином, по-видимому, не вызывает изменений по сравнению с контролем. В результате реакции конкуренции в присутствии специфических антител к  $\alpha$ -актину-4 высокомолекулярные ДНК-белковые комплексы исчезали (рис. 76). Эти антитела не взаимодействовали с ДНК. Антитела к  $\alpha$ -актину-1 не вызывали изменений в составе ДНК-белковых комплексов. Эти результаты позволяют предполагать участие  $\alpha$ -актина-4 в формировании транскрипционного комплекса NF- $\kappa$ B.

Таким образом, в работе впервые было установлено, что транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B способен взаимодействовать с актин-связывающим белком  $\alpha$ -актину-4 в клетках линий A431 и HEK293.

ЭФР 5 мин	-	+	-	-	-	-	-
ЭФР 30 мин	-	-	+	-	-	-	+
Цитохалазин D	-	-	-	+	+	-	-
Вортманнин	-	-	-	-	-	+	+

А



Б



Цит D + ЭФР  
α-Актинин-1 АТ  
α-Актинин-4 АТ

Рис. 7. (А) ДНК-связывающая активность факторов, узнающих последовательность NF-κB, в клетках A431, обработанных 5, 30 мин ЭФР (100 нг/мл) или предварительно обработанных цитохалазином D (2 мкг/мл) или вортманнином (100 нМ) в течение 40 мин. (Б) ДНК-связывающая активность факторов, узнающих последовательность NF-κB, в клетках A431 в присутствии антител к α-актину-1 (α-актинин-1 АТ) и антител к α-актину-4 (α-актинин-4 АТ) в реакционной смеси. Плюсом отмечены дорожки с ядерным экстрактом из клеток, получивших соответствующий сигнал или их комбинацию.

Факты, полученные в данной работе указывают на новую ранее неизвестную ядерную функцию α-актина-4 и его роль во взаимодействии транскрипционного фактора NF-κB с актиновым цитоскелетом. К сожалению, данных о роли актина и актин-связывающих белках в ядерных событиях еще слишком мало. Это объясняется, в частности, большой экспериментальной трудоемкостью в получении новых данных и необходимостью перепроверки результатов разными методами для того, чтобы избежать артефактов. Кроме того, имеется еще слишком мало представлений об участии актин-связывающих белков, обнаруженных в ядре, в процессах регуляции транскрипции. В последнее время появились первые работы о ядерной локализации и поиске новых связывающих партнеров для целого ряда актин-связывающих белков: зиксина (Nix et al., 2001), паксиллина (Woods et al., 2002), эзрина (Batchelor et al., 2004), миозина 1 (Pestic-Dragovich et al., 2000), белка

полосы 4.1 (De Carcer et al., 1995), спектрина (Bachs et al., 1990) и белков Arg семейства (Cairns et al., 1998). Можно предположить, что реорганизация актинового цитоскелета одновременно приводит к освобождению и транслокации в ядро целого ряда актин-связывающих белков. Подобный механизм позволяет говорить о сигнальных функциях актин-связывающих белков на уровне регуляции транскрипции и процессинга РНК. Возможно, подобная прямая передача сигнала в ядро способна обходить или дополнять широко распространенные внутриклеточные сигнальные каскады с их множеством интермедиатов, что позволяет ускорять клеточный ответ. Кроме того, имеются данные о том, что при злокачественной трансформации клетки происходит нарушение ядерно-цитоплазматической локализации таких белков (Honda et al., 1998).

В настоящей работе не удалось однозначно установить, происходит ли взаимодействие NF- $\kappa$ B с внутриклеточным  $\alpha$ -актинином-1. NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинин-1 не формируют комплекс при иммунопреципитации в условиях, когда NF- $\kappa$ B и  $\alpha$ -актинин-4 взаимодействуют. Однако NF- $\kappa$ B взаимодействует с гладкомышечным  $\alpha$ -актинином, который кодируется тем же геном, что и немышечная изоформа  $\alpha$ -актинин-1. Вполне вероятно, что сродство NF- $\kappa$ B к  $\alpha$ -актину-1 меньше, чем к  $\alpha$ -актину-4. Подтверждение этого предположения требует дополнительных исследований. Не исключено, что во взаимодействии актина и NF- $\kappa$ B принимают участие обе клеточные изоформы  $\alpha$ -актина, но только  $\alpha$ -актинин-4 способен накапливаться в ядре.

Таким образом, результаты настоящей работы показали, что актиновый цитоскелет и актин-связывающий белок  $\alpha$ -актинин-4 принимают участие в обеспечении проведения сигнала транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и его транспорта в ядро. Предварительная обработка клеток A431 цитохалазином D или вортманнином перед действием ЭФР усиливает накопление p65 в ядерных экстрактах этих клеток, что позволяет говорить о роли актинового цитоскелета как скаффолда для сигнальных молекул, входящих в состав комплекса NF- $\kappa$ B.

Так как появились первые работы, в которых  $\alpha$ -актинин-4 рассматривается как онкомаркер (Nikolopoulos et al., 2000; Honda et al., 2004), дальнейшие исследования позволяют, основываясь на полученных результатах, понять механизмы канцерогенеза и анти-апоптотической активности при злокачественной

трансформации. Кроме того, NF-κB участвует в регуляции жизненно-важных клеточных процессов и изучение регуляции его активности может быть важно для понимания процессов клеточной пролиферации, трансформации, дифференцировки и апоптоза.

### **Выводы:**

1. Немышечный α-актинин способен фосфорилироваться по тирозину киназой фокальных контактов при адгезии клеток A431 на фибронектине, ламинине 2/4 и антителах к рецептору ЭФР. Фосфорилирование α-актинина не влияет на связывание с NF-κB.
2. В клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 и в эмбриональных клетках почки человека линии HEK293 p65/RelA субъединица транскрипционного фактора NF-κB локализуется совместно с α-актинином-4. При действии на клетки цитохалазина D или вортманнина часть клеточного пула этих белков накапливается в ядре. При действии на клетки активаторов NF-κB, α-актинин-4 и p65/RelA совместно мигрируют в ядро. α-Актинин-4, но не α-актинин-1, способен накапливаться в ядре при действии на клетки активаторов NF-κB.
3. α-Актинин-4, но не α-актинин-1, способен формировать иммунные комплексы с субъединицами p65/RelA и p50 NF-κB и не формирует с их ингибиторной субъединицей IκB-α.
4. p65 и p50 субъединицы NF-κB, но не ингибиторная субъединица IκB-α способны связываться с иммобилизованным на колонке гладкомышечным α-актинином. Все субъединицы комплекса NF-κB могут взаимодействовать с полноразмерным α-актинином, но только p65 субъединица взаимодействует с 53 кДа фрагментом α-актинина.
5. Комплекс NF-κB и α-актинина-4, выявляемый реакцией иммунопреципитации, сохраняется в ядерных экстрактах. Антитела к α-актину-4 препятствуют формированию ряда ДНК-белковых комплексов при взаимодействии белков ядерных экстрактов с олигонуклеотидом, специфичным для NF-κB.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

В.Э. Галкин, В.Н. Бабаков, Л.В. Туроверова, И.М. Константинова, Г.П. Пинаев. Фибриллярный актин способствует сборке диссоциированного комплекса 20S-протеасомы. Цитология, 2000, 42(9) : 875-883.

В.Н. Бабаков, А.Ф. Арз, Г.П. Пинаев Альфа-актинин принимает участие во взаимодействии транскрипционного фактора NF-κB с актиновым цитоскелетом. Цитология, 2001, 43(9) : 839.

Бабаков В.Н., Кропачева И.В., Пинаев Г.П. Альфа-актинин фосфорилируется по тирозину при адгезии клеток А431 к элементам внеклеточного матрикса. Тезисы 3 съезда биохимического общества. С.-Петербург, 2002. с. 63.

V.Babakov I.Kropacheva G. Pinaev Alpha-actinin takes part in interaction of NF-kappaB transcription factor with actin cytoskeleton 2003. Eur. J. Biochem. Suppl. 1, p. 80.

В.Н.Бабаков Д.Е.Бобков И.В.Кропачева О.А.Петухова Л.В.Туроверова Г.П.Пинаев Альфа-актинин и р65 субъединица транскрипционного фактора NF-κB в солокализуются и совместно перераспределяются в клетках линии А431. 2003 Цитология, 45(9) : 847.

V. Babakov, I. Smirnova, D. Bobkov, O. Petukhova, L. Turoverova, I. Kropacheva, E. Podolskaya, G. Pinaev. NF-κB transcription factor interacts with alpha-actinin isoforms. FEBS special meeting on Cytoskeletal Dynamics: From Cell Biology to Development and Disease. June 12-16 2004. Helsinki, Finland. Abstract book. p. 38.

В.Н. Бабаков, Е.П. Подольская, Д.Е. Бобков, О.А. Петухова, Л.В. Туроверова, И.В. Кропачева, Г.П. Пинаев. Альфа-актинин взаимодействует с р65 субъединицей транскрипционного фактора NF-κB. 3 съезд биофизиков России. 24-29 июня 2004 г. Воронеж. Тезисы докладов. Т. 1. с. 6-7.

В.Н. Бабаков, Д.Е. Бобков, О.А. Петухова, Л.В. Туроверова, И.В. Кропачева, Е.П. Подольская, Г.П. Пинаев. Альфа-актинин-4 и субъединица р65/RelA транскрипционного фактора NF-κB в клетках А431 локализуются совместно и мигрируют в ядро при действии эпидермального фактора роста. 2004. Цитология. 46(12) : 1065-1073.

В.Н. Бабаков, И.В. Кропачева, О.А. Петухова, Л.В. Туроверова, Г.П. Пинаев. Внутриклеточное распределение актин-связывающих белков, фосфорилированных по тирозину, при распластывании клеток А431 на разных лигандах. 2004. Цитология. 46(12) : 1056-1064.

## Список, цитируемой литературы:

Галкин В.Э., Туроверова Л.В., Константинова И.М., Пинаев Г.П. 1998а. Взаимодействие просом с фибриллярным актином. Цитология. 40: 161-166.

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

О.А. Петухова, Л.В. Туроверова, Емельянов А.Н., И.В. Кропачева, Г.П. Пинаев. 2005. ДНК-связывающая активность транскрипционных факторов, взаимодействующих с последовательностями SRE, NF-κB и AP-1, индуцированная адгезией клеток А431, коррелирует с перестройками актинового цитоскелета. Цитология (в печати).

Марзлаф У., Хуан Р. 1987. Транскрипция РНК в изолированных ядрах. В кн.: Транскрипция и трансляция. «Мир». 111-159.

Araki N., Hatae T, Yamada T., Hirohashi S. 2000. Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinosytosis in mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging. J Cell Sci. 113: 3329-3340.

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

Bachs O., Lanini L., Serratos J., Coll M.J., Bastos R., Aligue R., Rius E., Carafoli E. 1990. Calmodulin-binding proteins in the nuclei of quiescent and proliferatively activated rat liver cells. J Biol Chem. 265 : 18595-18600.

Batchelor C.L., Woodward A.M., Crouch D.H. 2004. Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import. Exp Cell Res. 296:208-222.

- Benoliel, A.-M., Kahn-Perles, B., Imbert, J., Verrando, P.* 1997. Insulin stimulates haptotactic migration of human epidermal keratinocytes through activation of NF-kappa B transcription factor. *J. Cell Sci.* 110: 2089-2097.
- Bershadsky, A.D., Vasiliev, J.M.* 1988. Cytoskeleton. New York: Plenum Press. pp. 298.
- Bradford M.M.* 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cairns B.R., Frđjument-Bromage H., Tempst P., Winsion F., Kornberg R.D.* 1998. Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol. Cell.* 2:639-651.
- Cuo Y., Kang Q., Zolkiewska A.* 2001. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 interacts with alpha-actinin-1. *Biochem J.* 357 : 353-361.
- Christerson L.B., Vanderbilt C.A., Cobb M.H.* 1999. MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell Motil Cytoskeleton.* 43:186-198.
- De Carcer G., Lallena M.J., Correas I.* 1995. Protein 4.1 is a component of the nuclear matrix of mammalian cells. *Biochem J.* 312 :871-877.
- Eck, S.L., Perkins, N.D., Carr, D.P., Nabel, G.J.* 1993. Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa B in vivo. *Mol. Cell Biol.* 13: 6530-6536.
- Feramisco J.R., Burrige K.* 1980. A rapid purification of alpha-actinin, filamin, and a 130,000-dalton protein from smooth muscle. *J Biol Chem.* 255 :1194-1199.
- Honda K., Yamada T., Endo R., Ino Y., Gotoh M., Tsuda H., Yamada Y., Chiba H., Hirohashi S.* 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol.* 140: 1383-1393.
- Honda K., Yamada T., Seike M., Hayashida Y., Idogawa M., Kondo T., Ino Y., Hirohashi S.* 2004. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene.* 23 : 5257-5262.
- Igazuirre G., Aguirre L., Hu Ya-P., Lee H. Y., Schlaepfer D. D., Aneskievich B. J., Haimovich B.* 2001. The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 28676-28685.
- Laemmli U.K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Mayer, B.J., Baltimore, D.* 1993. Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol.* 3: 8-13.
- Nemeth Z.H., Deitch E.A., Davidson M.T., Szabo C., Vizi E.S., Hasko G.* 2004. Disruption of the actin cytoskeleton results in nuclear factor-kappaB activation and inflammatory mediator production in cultured human intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol.* 200 : 71-81.
- Nikolopoulos S.N., Spengler B.A., Kisselbach K., Evans A.E., Biedler J.L., Ross R.A.* 2000. The human non-muscle alpha-actinin protein encoded by the ACTN4 gene suppresses tumorigenicity of human neuroblastoma cells. *Oncogene.* 19 : 380-386.
- Nix D.A., Fradelizi J., Bockholt S., Menichi B., Louvard D., Friederich E., Beckerle M.C.* 2001. Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus. *J Biol Chem.* 276:34759-34767.
- Ohtsubo M., Takayanagi A., Gamou S., Shimizu N.* 2000. Interruption of NFkappaB-STAT1 signaling mediates EGF-induced cell-cycle arrest. *J Cell Physiol.* 184:131-137.
- Otey C.A., Carpen O.* 2004. Alpha-actinin revisited: A fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58: 104-111.
- Palombella V.J., Rando O.J., Goldberg A.L., Maniatis T.* 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 78: 773-785.
- Pestic-Dragovich L., Stojiljkovic L., Philimonenko A.A., Nowak G., Ke Y., Settlege R.E., Shabanowitz J., Hunt D.F., Hozak P., de Lanerolle P.* 2000. A myosin I isoform in the nucleus. *Science.* 290 :337-341.
- Qwarnstrom, E.E., Ostberg, C.O., Turk, G.L., Richardson, C.A., Bomszyk, K.* 1994. Fibronectin attachment activates the NF-kappa B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269: 30765-30768.
- Schmidt A., Hall M. H.* 1998. Signalling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 305-338
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Woods A.J., Roberts M.S., Choudhary J., Barry S.T., Mazaki Y., Sabe H., Morley S.J., Critchley D.R., Norman J.C.* 2002. Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem.* 277:6428-6437.
- Xu, J., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Clark, R.A.F.* 1998. A three-dimensional collagen lattice activates NF-kappa B in human fibroblasts: role in integrin alpha2 gene expression and tissue remodeling. *J. Cell Biol.* 140: 709-719
- Yamada, K.M., Geiger, B.* 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 76-85.
- Yebra, M., Filardo, E.J., Bayna, E.M., Kawahara, E., Becker, J.C., Cheresch, D.A.* 1995. Induction of carcinoma cell migration on vitronectin by NF-kappa B-dependent gene expression. *Mol. Biol. Cell.* 6: 841-850.

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам ОКК за помощь в работе О.А. Петуховой, Л.В. Туровой, И.В. Кропачевой, И. С. Смирновой, Д.Е. Бобкову, В.И. Морозову и научному руководителю Г.П. Пинаеву. Особенно благодарен автор Е.П. Подольской, Л.П. Горшковой и В.Н. Бабаковой.

---

Подписано в печать *15. 11. 04*. Формат 60x84/16. Печать офсетная.

Уч. печ. л. *1,25*. Тираж *100*. Заказ *538*.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета, предоставленного автором,  
в типографии Издательства Политехнического университета.

195251, Санкт-Петербург, Политехническая, 29.