

*На правах рукописи*

**ЕМЕЛЬЯНОВ**

**Артём Николаевич**

**ИЗМЕНЕНИЯ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ  
ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ ПРИ РЕОРГАНИЗАЦИЯХ АКТИНОВОГО  
ЦИТОСКЕЛЕТА КЛЕТОК А431**

03.00.25 – гистология, цитология и клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2006г.

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

Научный руководитель: кандидат биологических наук  
**Ольга Александровна Петухова**  
Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**Елена Сергеевна Корнилова**  
Институт цитологии РАН  
Санкт-Петербург

доктор биологических наук  
**Надежда Владимировна Кулёва**  
Биолого-почвенный факультет,  
Санкт-Петербургского  
государственного университета

Ведущая организация: ГУ НИИ экспериментальной  
медицины  
РАМН, Санкт-Петербург

Защита состоится 19 января 2007 года в 15 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 19 декабря 2006 года.

Учёный секретарь  
Диссертационного совета

кандидат биологических наук  
Е. В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Изучение механизмов передачи сигнала с клеточной поверхности в ядро является одной из центральных задач современной клеточной и молекулярной биологии. Сигнал возникает в результате взаимодействия клеточных рецепторов с сигнальными молекулами. При этом запускается ряд внутриклеточных реакций, называемых совокупно внутриклеточной сигнализацией. Внутриклеточная сигнализация, в конечном счёте, приводит к модуляции экспрессии тех или иных генов, которые, в свою очередь, регулируют такие функции клетки, как пролиферация, дифференцировка, деление, апоптоз, биологическая подвижность, а также различные стороны клеточного метаболизма.

Адгезия клеток к белкам внеклеточного матрикса (ВКМ) является одним из пусковых механизмов внутриклеточной сигнализации. Распластывание клеток на иммобилизованных белках ВКМ можно использовать как модельную систему, которая позволяет выявлять процессы, связанные с адгезией на молекулярном и на субклеточном уровнях организации клетки. Взаимодействие клеток с белками ВКМ осуществляется поверхностными рецепторами адгезии, среди которых лучше всего охарактеризованы интегриновые рецепторы (Van Aelst, D'Souza-Schorey, 1997; Hall, 1998; Schoenwaelder, Burridge, 1999). Интегрины ассоциированы с подмембранными структурами актинового цитоскелета (АЦ) в образующихся при распастьвании клеток трансмембранных комплексах, где они активируют сигнальные молекулы, способствуя переносу в ядро белковых факторов, индуцирующих транскрипцию генов (Miyamoto et al., 1998; Clark, Brugge, 1995).

АЦ является обязательным участником адгезии, способствуя стабилизации множественных взаимодействий и определяя форму клетки (Hynes, 1999; Geiger et al., 2001). При этом происходит реорганизация АЦ под влиянием элементов ВКМ. Влияние ВКМ на АЦ в значительной степени реализуется через интегриновые рецепторы (Sastru, Horwitz, 1993; Yamada, Miyamoto, 1995).

В культивируемых клетках структуры АЦ представлены стресс-фибриллами, разнообразными пучками микрофиламентов в цитоплазме и филоподиях, а также сетью микрофиламентов в ламеллах клеток (Small et al., 1999). При распастьвании клеток эпидермоидной карциномы А431 на фибронектине в цитоплазме клеток обнаруживаются стресс-фибриллы, на ламинине 2/4 – сеть актиновых филаментов в ламелле, и на антителах к рецептору ЭФР – сеть актиновых филаментов в филоподиях и ламеллах (Ara et al., 2001). Соответствующие структуры АЦ обнаруживаются у большинства клеток, распастанных в течение 1 ч на данных лигандах (Петухова и др., 2004).

Участие малых ГТФ-аз в возникновении тех или иных типов пространственной организации АЦ было показано в 1992 году Ридли и Холлом (Ridley, Hall, 1992) и исследуется в последующих работах этой группы исследователей. Также в ряде работ было показано наличие связи между состоянием АЦ и проведением сигнала от поверхностной мембраны к ядру клетки (Puck, Krystosek, 1992; Yamada, Geiger, 1997). Предполагается три варианта участия АЦ в этом процессе: роль скаффолда (Hopkins et al., 2000; Yin, Janmey, 2003), роль «рельсов», по которым перемещаются сигнальные молекулы (Small et al., 1999), и самостоятельная передача сигнала самим цитоскелетом (Maniotis et al., 1997) или его компонентами (Batchelor et al., 2004; Бабаков и др., 2004). Все эти данные приводят к предположению о том, что изменение тех или иных типов пространственной организации АЦ может оказывать влияние на процесс активации соответствующих данным типам цитоскелета транскрипционных факторов (ТФ).

Для проверки данного предположения была использована уже существующая модель распластывания клеток эпидермоидной карциномы человека A431 на белках ВКМ фибронектине, или ламинине 2/4, или на антителах 5A9 к рецептору ЭФР (Are et al., 2001; Петухова и др., 2004). В рамках этой модели реорганизации АЦ можно наблюдать в процессе распластывания клеток (Small et al., 1998), при действии на распластаные клетки ЭФР (Are et al., 2001), а также после воздействия на клетки цитохалазина Д (Nemeth et al., 2004).

Были выбраны ТФ, которые специфически взаимодействуют с регуляторными последовательностями *κB*, *SRE*, и *AP1*. Показано, что активность данных ТФ может изменяться в связи с адгезией и реорганизацией АЦ. Так, активность SRF регулируется динамикой актина при участии ГТФ-азы RhoA и через Raf-MEK-ERK сигнальный путь (Sotiropoulos et al., 1999; Gineitis, Treisman, 2001). Семейство Rel/NFκB ТФ индуцируется малыми ГТФ-азами, MEK1 и убиквитинирующими ферментами за счёт деградации IκB и при разборке АЦ цитохалазином Д (May, Ghosh, 1998; Nemeth et al., 2004). В нашей лаборатории были получены данные о том, что субъединица p65 ТФ NFκB взаимодействует с актином и актин-связывающим белком α-актинином и перераспределяется в цитоплазме клетки в зависимости от характера организации актиновых структур (Are et al., 2001; Бабаков и др., 2004). Для AP1 показано участие в процессах, связанных с подвижностью клеток (Malliri et al., 1998).

### **Цель и задачи исследования**

Целью работы было исследовать влияния различных типов пространственной организации и перестроек актинового цитоскелета на ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов SRF, AP1 и NFκB в клетках эпидермоидной карциномы человека A431.

В работе были сформулированы следующие экспериментальные задачи:

1. Изучить динамику реорганизаций АЦ при распластывании клеток на фибронектине, или ламинине 2/4, или антителах 5A9 к рецептору ЭФР. Провести анализ изменений ДНК-связывающей активности ТФ при распластывании клеток в тех же условиях. Сравнить данные анализа реорганизации АЦ и ДНК-связывающей активности ТФ.
2. Изучить динамику перестроек АЦ при воздействии на распластаные клетки эпидермального фактора роста и/или цитохалазина Д. В тех же условиях провести анализ ДНК-связывающей активности ТФ клеток. Сравнить данные анализа реорганизации АЦ и ДНК-связывающей активности ТФ.
3. Провести анализ распределения субъединицы p65 NFκB при распластывании клеток на различных иммобилизованных лигандах, а также при воздействии на распластаные клетки эпидермальным фактором роста и (или) цитохалазином Д.

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

1. Распластывание клеток на иммобилизованных лигандах сопровождается закономерной сменой типов пространственной организации актинового цитоскелета. Особенности формирования и смена типов актинового цитоскелета зависят от лиганда, на котором распластываются клетки.
2. При распластывании клеток A431 в течение 2 ч на иммобилизованных лигандах и при инкубации в течение 2 ч с ЭФР клеток, распластаных на иммобилизованных лигандах, уровень ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов NFκB, SRF и AP1 изменяется волнообразно с коротким периодом 15-40 мин.
3. Изменения ДНК-связывающей активности NFκB согласуются с процессами сборки-разборки стресс-фибрилл, пучков актиновых филаментов и фокальных контактов.

Изменения ДНК-связывающей активности SRF согласуются с процессами сборки-разборки сети актиновых филаментов в основании ламелл клеток.

4. Прямой зависимости короткопериодических изменений уровня ДНК-связывающей активности NFκB от ядерно-цитоплазматических перемещений p65 нет.

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

В работе впервые показано наличие короткопериодических волнообразных изменений ДНК-связывающей активности NFκB, SRF и AP1 в ответ на прикрепление и распластывание клеток на субстрате и в ответ на воздействие на распластаные клетки эпидермального фактора роста. Изменения ДНК-связывающей активности NFκB и SRF согласуются именно с перестройками соответствующих актиновых структур, а не с наличием или отсутствием той или иной структуры актинового цитоскелета. Выявленные короткопериодические изменения активности NFκB прямо не зависят от перемещений p65 между ядром и цитоплазмой клеток.

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

Полученные результаты позволяют обосновать перспективность дальнейшего изучения роли актинового цитоскелета в сигнальных процессах, а также надмолекулярного подхода к исследованию функций актинового цитоскелета в клетке, в котором он рассматривается как единое целое. Обосновываются исследования влияния актинового цитоскелета на экспрессию определённых генов в результате активации или ингибирования активности транскрипционных факторов.

Данная работа закладывает фундамент для дальнейшего изучения актин-связывающих белков и самого актина в роли регуляторов активности транскрипционных факторов. Показана принципиальная возможность управления клеточными процессами в результате тех или иных воздействий на цитоскелет клетки.

#### **Апробация работы**

По теме диссертации опубликовано 2 статьи и сделано 7 тезисных сообщений на всероссийских и международных конференциях. Основные положения были доложены и обсуждались на научных семинарах Лаборатории клетки в культуре Отдела клеточных культур Института цитологии РАН. Диссертационная работа апробирована на научном семинаре Отдела клеточных культур Института цитологии РАН 27 января 2006 г.

#### **Финансовая поддержка работы**

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48251), гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ (НШ-1244.2003.4) и гранта СПб НЦ РАН. Диссертационная работа является фрагментом технического задания Государственного контракта № 02.435.11.3020 от сентября 2005 г по теме: «Метод восстановления эпителиально-мезенхимальных дефектов с помощью стволовых клеток», Лот № 2005-ЖС-13.1/001 (IV очередь).

#### **Объём и структура диссертации**

Диссертация изложена на страницах машинописного текста и состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение результатов», выводов и списка цитируемой литературы, включающего 196 ссылок. Иллюстративный материал содержит 34 рисунка и 9 таблиц.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Культивирование клеток**

Клетки эпидермоидной карциномы линии A431 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Клетки культивировали в среде Дальбекко (DMEM, Sigma), содержащей 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого

скота. Клетки снимали с подложки смесью 0.25% трипсина с 0.02% ЭДТА (3/7), дважды отмывали средой ДМЕМ без сыворотки и ресуспендировали в среде ДМЕМ до концентрации  $12.5 \times 10^5$  клеток/мл для биохимических и  $2 \times 10^5$  клеток/мл для цитологических исследований.

#### **Подготовка иммобилизованных лигандов**

Покровные стёкла, обработанные Repel-Silan (Pharmacia Biotech., Sweden) для придания поверхности гидрофобных свойств, и бактериологические чашки Петри диаметром 90 мм (гидрофобная поверхность, ПО “Ленполимер”, СССР) покрывали растворами различных лигандов (фибронектина, ламинина 2/4, АТ 5А9, полилизина) с концентрацией 10 мкг/мл. Выдерживали в течение ночи при 4<sup>0</sup>С, затем трижды отмывали фосфатным буфером (ФБ). Обработывали 2%-м бычьим сывороточным альбумином (heat shock fractionated), приготовленным на ФБ, в течение 1 ч при температуре 37<sup>0</sup>С для предотвращения неспецифического взаимодействия клеток с субстратом и снова трижды отмывали ФБ.

#### **Распластывание клеток на субстратах**

Суспензию клеток наносили на тёплые покровные стёкла или чашки Петри с иммобилизованными на них лигандами в количестве  $2 \times 10^4$  кл (100 мкл) на стекло и  $5 \times 10^6$  кл (4 мл) на чашку и культивировали при 37<sup>0</sup>С в атмосфере 5% СО<sub>2</sub>. Для исследования динамики распластывания клеток на субстратах из общего числа чашек Петри или покровных стёкол через 10, 20, 30, 40, 50, 60 мин, 1.5 и 2 ч от начала распластывания изымали по одной чашке Петри или одному покровному стеклу для биохимического и цитологического анализа соответственно.

При исследовании динамики влияния ЭФР на клетки, распластанные на иммобилизованных лигандах, клетки инкубировали при 37<sup>0</sup>С в атмосфере 5% СО<sub>2</sub> 1 ч и затем производили смену среды на среду ДМЕМ с ЭФР (100 нг/мл) и вновь помещали в инкубатор при тех же условиях. Через 5, 30, 60 мин и 2 ч после смены среды производили дальнейшее исследование.

При исследовании влияния на клетки, распластанные на иммобилизованных лигандах, цитохалазина Д клетки инкубировали при 37<sup>0</sup>С в атмосфере 5% СО<sub>2</sub> 1 ч и затем производили смену среды на среду ДМЕМ с цитохалазином Д (2 мкг/мл) и вновь помещали в инкубатор при тех же условиях. Через 30 мин после смены среды одну чашку Петри или одно покровное стекло брали на анализ. В остальных среду с цитохалазином Д меняли на среду ДМЕМ с ЭФР (100 нг/мл) без цитохалазина Д и вновь помещали в инкубатор при тех же условиях. Через 5, 30, 60 мин и 2 ч после смены среды производили дальнейшее исследование (всего 5 чашек и 5 стёкол).

В качестве контроля действия ЭФР на клетки, обработанные цитохалазином Д, клетки, культивируемые на покровных стёклах, после их обработки цитохалазином Д, снова культивировали, но в среде ДМЕМ без цитохалазина Д и ЭФР. Через 5 и 30 мин после смены среды стёкла брали на морфологический анализ.

Для исследования динамики изменений актинового цитоскелета при распластывании клеток на иммобилизованных лигандах в течение 24 ч клетки культивировали только на покровных стёклах в среде ДМЕМ как описано выше. Анализ актинового цитоскелета проводили через 1, 3, 5, 24 ч после помещения клеток на лиганд.

#### **Изучение структуры актинового цитоскелета**

Для изучения структуры актинового цитоскелета использовали метод флуоресцентного анализа (метод прямой флуоресценции). Покровные стёкла с культивированными на них, как было описано выше, клетками промывали один раз тёплым ФБ для удаления неприкрепившихся клеток. Прикрепившиеся клетки фиксировали

3.3 %-м формальдегидом (10 мин при комнатной температуре), пермеабилizировали 0.1 %-м Тритоном X-100 (20 мин) и окрашивали родамин-фаллоидином (Molecular Probes, USA) 10 мин. Препараты анализировали с помощью микроскопа Axioskop (Zeiss), и фотографировали с помощью CD камеры. Изображение записывалось на жёсткий диск с помощью программы KC100.

В зависимости от структуры и формы актинового цитоскелета выделяли несколько типов клеток. Для определения долевого соотношения выделенных клеточных типов подсчитывали клеточные типы в трёх областях препарата по 100 клеток в каждой (Петухова и др., 2004). Подсчитывали средние значения долей клеток, принадлежащих к разным морфологическим типам, определяли доверительные интервалы с уровнем значимости  $\alpha = 0.05$ .

### **Изучение распределения в клетке субъединицы NFκB p65 и винкулина**

При изучении перераспределений субъединицы NFκB p65 или винкулина для окраски клеток использовали метод двойной флуоресценции. Для этого после фиксирования и пермеабилizации клеток, как было описано выше, клетки инкубировали с первыми антителами в течение 30 мин при комнатной температуре и трижды промывали раствором 0.1 % Tween на ФБ. Затем клетки обрабатывали вторыми антителами в течение 30 мин в тех же условиях, промывали раствором 0.1 % Tween на ФБ и окрашивали актиновый цитоскелет раствором родамин-фаллоидина, как было описано выше. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica (Zeiss).

Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм для FITC и HeNe лазер с длиной волны 543 нм для родамин-фаллоидина. Применяли раздельное сканирование для сигнала FITC (флуоресценция в области 500-530 нм) и родамин-фаллоидина (флуоресценция в области 580-640 нм). Совмещение двух сигналов проводили с помощью компьютерной программы Leica Confocal Software.

### **Получение ядерных экстрактов**

Клетки, распластаные на чашках Петри, промывали однократно тёплым ФБ, лизировали в лизирующем буфере (0.32 М сахараза, 2 мМ ЭДТА, 0.1% Тритон X-100, 10 мМ Трис-HCl (pH 7.9), 1.0 мМ ДТТ и 0.5 мМ PMSF) и соскребали скребком при 0°C (на льду) в центрифужные пробирки. Ядра осаждали при 2000 g, температуре 4°C в течение 5 мин и очищали центрифугированием через 0.5 М сахаразу при 10000 g, температуре 8°C в течение 10 мин. Фракции, содержащие транскрипционные факторы, экстрагировали при 0°C (на льду) в течение 30 мин в 350 мМ растворе NaCl (350 мМ NaCl, 20 мМ HEPES (pH7.9), 25% глицерин, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub> 0.4 мМ ЭДТА, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ, 2 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Complete protease inhibitor cocktail (Roche, Germany)) и центрифугировали при 12000 g, температуре 8°C в течение 30 мин. Концентрацию белка в ядерных экстрактах определяли по методу М. Бредфорд (Bradford, 1976; Ферменты и нуклеиновые кислоты, 1997). Белки хранили при -70°C в аликвотах. Выход белка составлял примерно 20-30 мкг с одной чашки Петри.

### **Выявление ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов**

Для выявления связывающей активности транскрипционных факторов использовали метод торможения ДНК-белковых комплексов в геле (electromobility-shift assay, Kingston R. E. 1990). ДНК-белковые комплексы выявляли с помощью меченной по 5'-концу ДНК. Использовали двуцепочечные олигонуклеотиды *API* (*c-jun*), 5'-cgcttgatgagtcagccgga-3'; *κB* 5'-agttgaggggactttcccaggc-3'; *SRE* (*c-fos*) 5'-ggatgtccatattaggacatc-3'. Олигонуклеотиды метили [<sup>32</sup>P] АТФ (Amersham, U.K.) с помощью Т-4 полинуклеотидкиназы (DNA 5'-end Labelling Kit #0812, MBI Fermentas, Lithuania) в прямой реакции согласно протоколу. Меченые одноцепочечные нуклеотиды (2.7 нг/мкл) отжигали

с антисенс-ДНК (5.4 нг/мкл) в ТЕ буфере (10 мМ Трис-НСl (рН8.0), 1 мМ ЭДТА) в присутствии 0.1 М NaCl в течение ночи (Маниатис и соавт., 1984). Двухцепочечные олигонуклеотиды использовали в реакции связывания с транскрипционными факторами. В реакции связывания транскрипционных факторов и олигонуклеотидов использовали ядерные экстракты с равными количествами белка (7 мкг), которые инкубировали в реакционном буфере (50 мМ KCl, 20 мМ ГЭПЭС (рН7.9), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> 0.5 мМ ДТТ, 12% глицерин), содержащем олигонуклеотидную пробу (25000 срт) и поли dI-dC ДНК (Polydeoxyinosinic-deoxycytidylic acid sodium salt, ICN) в отношении 1/800 соответственно. Реакцию проводили в течение 20 мин при комнатной температуре. В реакции связывания в присутствии специфического конкурента (немеченый двухцепочечный олигонуклеотид) с отношением меченого олигонуклеотида к немеченому 1/100 соответственно экстракты преинкубировали 15 мин при комнатной температуре. Антитела, специфичные к р65 субъединице транскрипционного фактора NFκB (р65 A; Santa Cruz), добавляли к экстракту за 30 мин до добавления меченого олигонуклеотида. По окончании реакции связавшиеся транскрипционные факторы разделяли методом электрофореза в нативном 4%-ном полиакриламидном геле (4% акриламид, 0.1% бисакриламид, ТАЭ (40 мМ Трис-НСН<sub>3</sub>СОО (рН7.5), 1 мМ ЭДТА)) в блоках геля 10×16 см при постоянном напряжении 100 В в ТАЭ буфере и высушивали на ватмане с помощью сушилки Gel Dryer m.583 (BIO-RAD) в течение одного часа при 80<sup>0</sup>С. Для получения видимого изображения высушенные гели экспонировали с рентгеновской плёнкой Kodak X-omat при -80<sup>0</sup>С.

#### **Количественный анализ ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов**

Количественный анализ ДНК-связывающей активности осуществляли, определяя интенсивность засвечивания рентгеновской плёнки соответствующими ДНК-белковыми комплексами после разделения в ПААГ. Для установления зависимости ДНК-связывающей активности от времени распластывания клеток каждый ДНК-белковый комплекс сканировали вдоль временной оси на участках, показанных на рис. 1,3,4 скобками. Денситометрию электрофоретических полос (в дальнейшем просто – «полос») проводили с помощью компьютерной программы Scion image 4.2. Результаты сканирования оформляли в виде графиков. Все полученные кривые для данной консенсусной последовательности для каждого лиганда сводили относительно среднего значения неспецифической полосы для клеток в суспензии. Эта полоса была выбрана, так как она стабильно присутствовала во всех опытах. Все значения, оказавшиеся меньше нуля, были приравнены нулю. Количества радиоактивной метки, нанесенной на каждую дорожку, при анализе были стандартизованы.

В связи с небольшим количеством повторов экспериментов (от 2 до 4) и особенностями изменений ДНК-связывающей активности ТФ не удалось провести стандартного статистического анализа данных. Полученные кривые сравнивали по форме, которая отражает все основные закономерности поведения электрофоретических полос.

Анализируя графики, отмечали периоды возникновения максимумов и минимумов ДНК-связывающей активности. В окончательный результат включали только максимумы и минимумы, стабильно повторяющиеся во всех повторах опытов.

Для проверки ошибок единичного измерения в двух опытах проведено по 3 независимых измерения одной и той же полосы с одного и того же рентгеновского снимка. Ошибка составила не более 700 отн. ед., что меньше выбранного доверительного интервала (1000 отн ед), который не влияет на форму кривых, так как максимальное значение интенсивности 100000 отн. ед. (на рисунках для удобства восприятия значения интенсивностей уменьшены в 1000 раз). Поэтому для других значений ошибку не

вычисляли. Все подсчёты, построения графиков и диаграмм проводили с помощью программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы установить, могут ли влиять определённые типы пространственной организации актинового цитоскелета на уровень ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов, нужно было сначала формализовать эти типы актинового цитоскелета. Ранее в нашей лаборатории было описано несколько типов пространственной организации актинового цитоскелета после распластывания клеток A431 в течение 1 ч на фибронектине, ламинине 2/4 или антителах к рецептору ЭФР (Are et al., 2001). Авторы также попытались проследить процесс формирования этих типов актинового цитоскелета. Однако, оказалось, что в каждый момент времени, в который клетки брали на анализ, присутствовал не один какой-либо тип актинового цитоскелета, а несколько. Это сильно осложнило последующие исследования. Была проведена работа по выделению и подсчёту различных типов актинового цитоскелета после распластывания клеток на данных лигандах в течение 1 ч (Петухова и др., 2004). Основным выводом из неё: в популяции клеток A431, распластанных в течение 1 ч на фибронектине, ламинине 2/4 или антителах к рецептору ЭФР, всегда существует доминирующий тип актинового цитоскелета, присутствующий в большинстве клеток популяции. Это дало основание для попытки сравнения уровня ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов с типами актинового цитоскелета. Предполагалось, что в случае какой-либо взаимосвязи активности транскрипционных факторов и актинового цитоскелета уровень ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов до и после организации данного типа пространственной организации актинового цитоскелета будет различаться.

В качестве исследуемой модели перестроек актинового цитоскелета использовали модель распластывания клеток на иммобилизованных лигандах фибронектине, ламинине 2/4 или антителах к рецептору ЭФР. Известно, что клетки в суспензионном состоянии не имеют сети актинового цитоскелета. Через 1 ч распластывания на лигандах сеть актиновых филаментов в клетках уже сформирована (Are et al., 2001). Кроме того, в распластываемых клетках на выбранных лигандах образуются специфичные типы актинового цитоскелета, сравнимые с теми, которые в 1992 году получили Холл и Риддли, исследуя действие малых ГТФ-аз Rho на организацию АЦ (Ridley, Hall, 1992).

Для клеток, распластанных на фибронектине, образование комплексов адгезии зависит от интегринов  $\alpha 5\beta 1$  (Genersch et al., 1996), а на ламинине – от интегриновых рецепторов  $\alpha 6\beta 4$  и  $\alpha 2\beta 1$  и от рецепторов с молекулярной массой 67 кДа (Черепанова и др., 2003). Причём оба интегриновых рецептора ( $\alpha 6\beta 4$  и  $\alpha 2\beta 1$ ) принимают участие в миграции клеток (Калмыкова и др. 2003). Распластывание клеток на антителах к рецептору ЭФР предполагалось использовать в качестве контроля, когда адгезия приводит к образованию актинового цитоскелета, но не запускает сигнальных процессов, так как рецептор ЭФР не используется клеткой в процессе адгезии, а полученные на него антитела 5A9 не индуцируют его тирозинкиназной активности (Сорокин и др., 1989).

Вначале необходимо было обозначить временные границы исследования. Нужно было определить время первого исследуемого состояния клеток от помещения их на лиганд и последнего. Для определения последней границы провели исследование изменений актинового цитоскелета в интервале времени от 1 ч после помещения клеток на лиганд до 24 ч. Оказалось, что после 2-3 ч распластывания клеток на лигандах актиновый цитоскелет начинает постепенно дезорганизовываться, появляются клетки без сети актинового цитоскелета, изменяются формы клеток в сторону неправильных, вытянутых.

Клетки, в конечном счёте, открепляются. Эти явления, по-видимому, мало зависят от действия на клетки иммобилизованного лиганда.

Другая граница была определена в исследовании изменений ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов при культивировании клеток на гидрофильном пластике или полилизине в течение 20 и 60 мин после помещения клеток на подложку. Известно, что в течение этого времени ни на пластике, ни на полилизине клетки не распластываются и сеть актинового цитоскелета в них не образуется. В то же время ДНК-связывающая активность транскрипционных факторов в наших экспериментах изменялась. Это говорило о том, что сигнал от касания клеток к подложке проходит к ядру без наличия организованной сети актиновых филаментов и, соответственно, необходимо исследовать ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов также в тех случаях, когда актиновый цитоскелет ещё не сформирован.

Таким образом, были определены временные границы исследования: начиная с самых ранних сроков после помещения клеток на лиганд, когда сеть актинового цитоскелета в них ещё не образовалась, до 2 ч распластывания, пока сохраняются выделенные специфические типы актинового цитоскелета.

На следующем этапе исследования провели определение и подсчёт долей типов пространственной организации актинового цитоскелета при распластывании клеток на лигандах. Оказалось, что существует закономерная смена типов актинового цитоскелета в течение процесса распластывания клеток.

В процессе проведения данного исследования стало очевидно, что установить конкретную зависимость активации транскрипционных факторов от стадий формирования актинового цитоскелета будет невозможно по следующим причинам. Во-первых, взаимодействие клеток с белками внеклеточного матрикса может влиять на организацию актинового цитоскелета и на активацию транскрипционных факторов параллельными, но независимыми путями. Количество посредников между актиновыми структурами и транскрипционными факторами тоже может быть различно. Во-вторых, процесс организации цитоскелета при распластывании клеток сопровождается одновременным образованием и перестройками различных актиновых структур, которые вместе образуют общий тип пространственной организации цитоскелета на данной ступени его формирования. Следовательно, невозможно связать изменения в активации того или иного транскрипционного фактора с появлением или исчезновением той или иной конкретной структуры актинового цитоскелета.

Поэтому было решено упростить задачу и попытаться в ходе данного исследования ответить на ряд более простых вопросов.

1. На каких стадиях формирования актинового цитоскелета при распластывании клеток активируются избранные транскрипционные факторы? Происходит ли эта активация однократно в процессе всего хода распластывания клеток или многократно? Зависит ли динамика их активации от типа лиганда?

2. Можно ли установить временные соответствия между стадиями формирования цитоскелета, когда превалирует определённый тип его пространственной организации, и активацией транскрипционных факторов?

Для клеток, распластанных на всех исследуемых лигандах, были выделены стадии формирования актинового цитоскелета и определены их временные границы.

**1 а)** Анализ динамики формирования актинового цитоскелета в процессе распластывания клеток на фибронектине показал, что через 10 мин после нанесения клеток на лиганд (рис. 1, I, а) 90 % всех клеток только прикрепились, структур актинового цитоскелета ещё нет, наблюдается диффузное окрашивание преимущественно по

периферии клеток (назовём эту стадию формирования актинового цитоскелета стадией олигомеризации). Через 20 мин (рис. 1, I, б) примерно 80 % всех клеток начинают распластываться, имеют в прямой проекции округлую форму, актиновый цитоскелет представлен тонкими пучками филаментов, расположенными циркулярно по периферии, и агрегатами актина в центре клеток (стадия краевых структур). Через 30 мин и далее до 2 ч доминируют округлые или полярные клетки (рис. 1, I, в) с пучками актина по всему объёму цитоплазмы, фокальными контактами, стресс-фибриллами и диффузно распределёнными агрегатами актина (стадия цитоплазматических структур). Максимум доли этих клеток (~ 75 %) приходится на промежуток времени от 40 до 50 мин после нанесения клеток на лиганд. Через 60 мин доля таких клеток снижается примерно до 52 %, хотя они и продолжают доминировать. Появляется больше полярных клеток. В то же время увеличивается до 30 % доля клеток с наиболее развитой, специфичной для распластывания на фибронектине организацией актинового цитоскелета (рис. 1, I, г). Большая доля этих клеток (~ 35 %) приходится на 90-ю мин (стадия развитого цитоскелета). Они имеют округлую или многоугольную форму, хорошо выраженные стресс-фибриллы и фокальные контакты, не имеют агрегатов актина. Через 2 ч после нанесения клеток на лиганд появляются полярные клетки только с агрегатами актина (рис. 1, I, д). Выявляются клетки ещё одного типа (рис. 1, I, е). Такие клетки уже через 10 мин после начала инкубации на лиганде хорошо распластаны, имеют хорошо выраженные стресс-фибриллы, которые расположены радиально от центра клеток. Общий вид и доля этих клеток (~ 10 %) в дальнейшем не изменяются («ранний» тип организации актинового цитоскелета, который, вероятно, зависит от стадии клеточного цикла). Следует отметить, что через 30 мин после посадки клеток на лиганд наблюдается наибольшее разнообразие форм цитоскелета.

Все стадии формирования актинового цитоскелета идут последовательно и занимают определённые промежутки времени. Соответственно этим промежуткам времени регистрируются максимумы долей клеток, характеризующихся наличием цитоскелета на соответствующей стадии формирования. Максимум долей клеток, имеющих актиновый цитоскелет на стадии олигомеризации, регистрируется в период от 5 до 15 мин после нанесения клеток на лиганд; на стадии краевых структур – в период 15-25 мин; на стадии цитоплазматических структур – в период 25-55 мин; на стадии развитого цитоскелета – в период 55-120 мин. В отличие от выше перечисленных типов, клетки последнего типа в период своего максимума не составляют абсолютного большинства клеток. В это время по абсолютному значению продолжают доминировать клетки предыдущего типа.

**1 б)** *На тех же сроках распластывания клеток проводили анализ специфической ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов, взаимодействующих с консенсусными последовательностями *κB*, *SRE* и *AP1*. Поскольку ранее было установлено, что выявленные комплексы специфичны, анализу подвергались все области образования электрофоретических полос, соответствующих данным ДНК-белковым комплексам. На рис. 1, II приведены типичные электрофореграммы ДНК-белковых комплексов для клеток, распластанных на фибронектине. Обращает на себя внимание волнообразный характер изменения ДНК-связывающей активности для всех исследуемых транскрипционных факторов.*

Так как исходное состояние культивируемых клеток (рис. 1, II, а, дорожка II) по степени ДНК-связывающей активности изучаемых транскрипционных факторов было различным, за начальную точку отсчёта принимали ДНК-связывающую активность

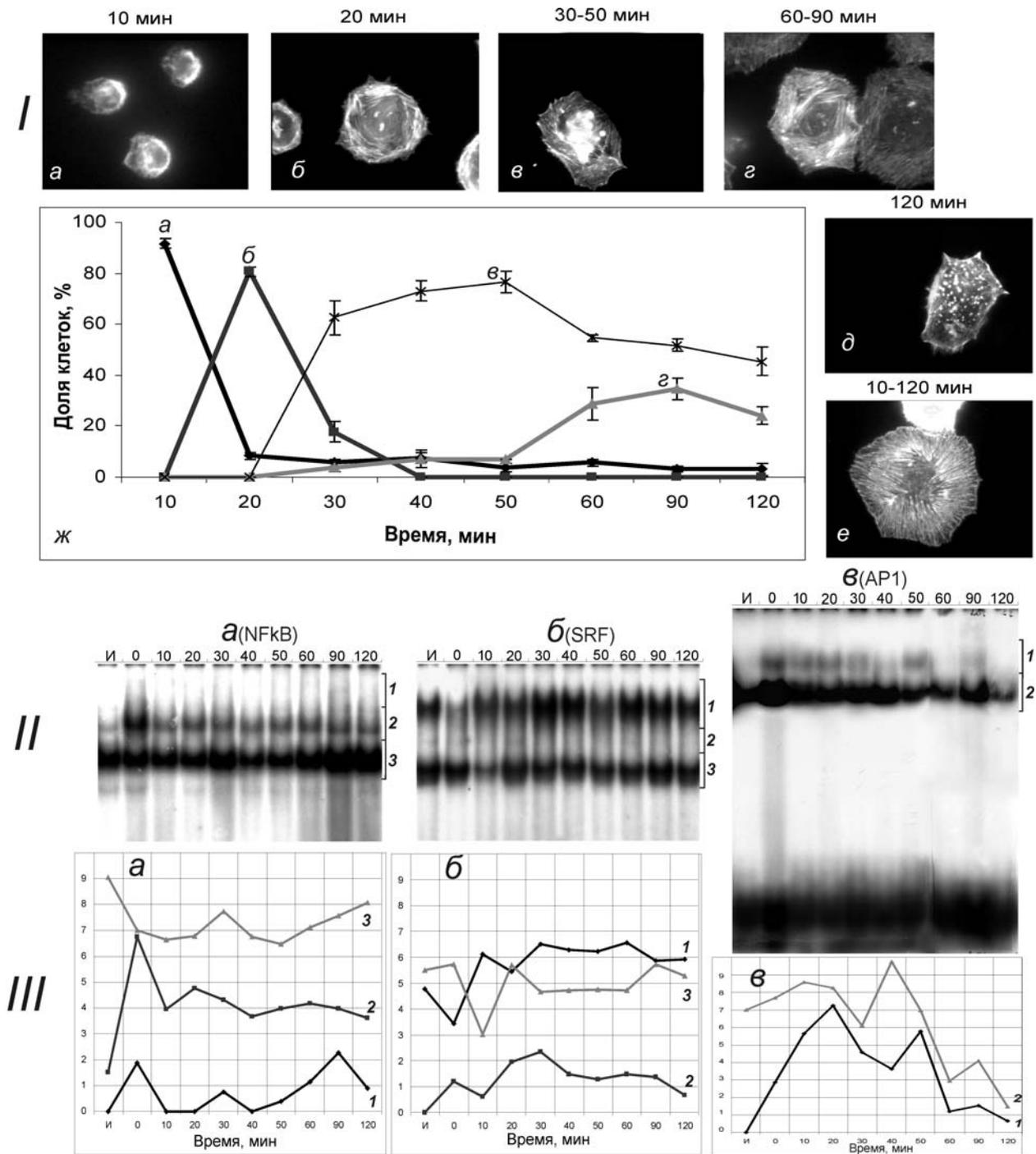


Рис. 1. Динамика актинового цитоскелета и ДНК-связывающей активности NFκB, SRF и AP1 в процессе распластывания клеток на фибронектине.

*I* (а, б, в, з, д) – стадии формирования актинового цитоскелета; д – клетки такого типа присутствуют только на 120 мин их распластывания (~ 18 % от общего числа клеток); е – клетки, постоянно присутствующие на всех сроках исследования без изменения доли (~ 10 %); *сверху* над фотографиями указано время от начала распластывания, когда доля клеток данного типа максимальна; *ж* – диаграмма, отображающая изменения доли клеток каждого типа (а, б, в, з) с течением времени; Величина рамки 60 × 78 мкм. *II* – динамика ДНК-связывающей активности белковых комплексов, содержащих транскрипционные факторы NFκB (а), SRF (б) и AP1 (в). Для AP1 представлена полная фотография электрофореграммы. Электрофоретические полосы у нижнего края электрофореграммы – не связавшийся с белком ДНК-фрагмент. Данный фрагмент использовали для оценки и получения значений активности связывания белковых комплексов с консенсусными последовательностями κB, SRE и AP1; *III* – денситограммы полос соответствующих электрофореграммам (*II*, а-в); по вертикали – оптическая плотность, отн. ед. *И* – исходные клетки, выращенные на пластике; *0* – клетки в суспензионном состоянии; 1, 2, 3 – ДНК-белковые комплексы (*квадратными скобками* обозначена ширина областей сканирования). На диаграммах ДНК-связывающей активности (*III*) погрешность одного измерения не превышает размера точки.

транскрипционных факторов в клетках после перевода их в суспензионное состояние (*дорожка 0*). В этом случае всегда наблюдали активацию транскрипционных факторов, и, таким образом, выравнивали исходное состояние клеток.

При анализе уровня ДНК-связывающей активности NFκB обнаружили, что общий ход кривых интенсивностей всех электрофоретических полос (комплексы 1, 2, 3 на рис. 1, III) совпадает. Легко выделяются области повышения активности для всех трёх ДНК-белковых комплексов. Выявляется 2 последовательных цикла возрастания ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов (первый – от 0 до 20-30 мин и второй – от 20-30 до 60-90 мин) со средним периодом первого цикла около 25 мин (0-25 мин) и второго – 50 мин (25-75 мин). В повторных опытах описанные выше соотношения сохранялись.

В отличие от хода изменений ДНК-связывающей активности белковых комплексов, содержащих NFκB, временной ход изменений уровня связывания SRE разными белковыми комплексами различается (рис. 1, III, б). Данные повторных опытов не дают полного совпадения. Только для комплекса 1 можно выявить во всех опытах постоянное увеличение ДНК-связывания через 30 мин от начала распластывания клеток.

Представляет интерес временное соотношение активности у двух выявляемых ДНК-белковых комплексов, содержащих AP1 (рис. 1, III, в). В то время как у комплекса 1 во всех опытах выявляется максимум ДНК-связывающей активности в период от 20 до 30 мин после посадки клеток на лиганд, у комплекса 2 в этот период времени наблюдается минимум активности. Хотя регистрируемые пики активности AP1 повторяются во всех повторных опытах, направление общего вектора изменений ДНК-связывания не сохраняется.

Сопоставляя между собой данные для всех трёх исследуемых транскрипционных факторов при распластывании клеток на фибронектине, следует подчеркнуть, что основные изменения в уровне их ДНК-связывающей активности приходятся на период от 10 до 40 мин после нанесения клеток на лиганд и выражаются в значительной частоте повышений и понижений этого уровня. В дальнейшем их ДНК-связывающая активность не приходит к исходным значениям. Пики активности транскрипционных факторов продолжают возникать, но с меньшей частотой. Хорошо заметны качественные различия в ходе кривых изменений активности разных транскрипционных факторов.

**1 в) Сравнительный анализ** изменений ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов и смены типов актинового цитоскелета при распластывании клеток на фибронектине показал, что для NFκB они, вероятно, изменяются согласованно (рис. 2). Действительно, минимум на 10-й мин соответствует стадии олигомеризации (рис. 2, а); максимум на 20-30-й мин – стадии краевых структур (рис. 2 б). Следующий минимум (40-50 мин) приходится на время абсолютного доминирования клеток с актиновым цитоскелетом на стадии цитоплазматических структур (рис. 2, в). В дальнейшем, одновременно с типом «в» появляются клетки на стадии развитого цитоскелета (рис. 2, г). Максимум во временном интервале 60-90 мин соответствует стадии клеток «г». Клеткам с цитоскелетом на стадии цитоплазматических структур соответствует, по-видимому, именно минимум ДНК-связывающей активности NFκB. Если бы это было иначе, то мы бы увидели длительное повышение ДНК-связывающей активности NFκB в течение всего времени его доминирования. В данном случае максимум в интервале 60-90 мин может объясняться присутствием в это время значительной доли клеток на стадии развитого цитоскелета. Анализ ДНК-связывания SRF и AP1 при распластывании клеток на фибронектине и анализ ДНК-связывания транскрипционных

факторов при распластывании клеток на ламинине 2/4 или антителах к рецептору

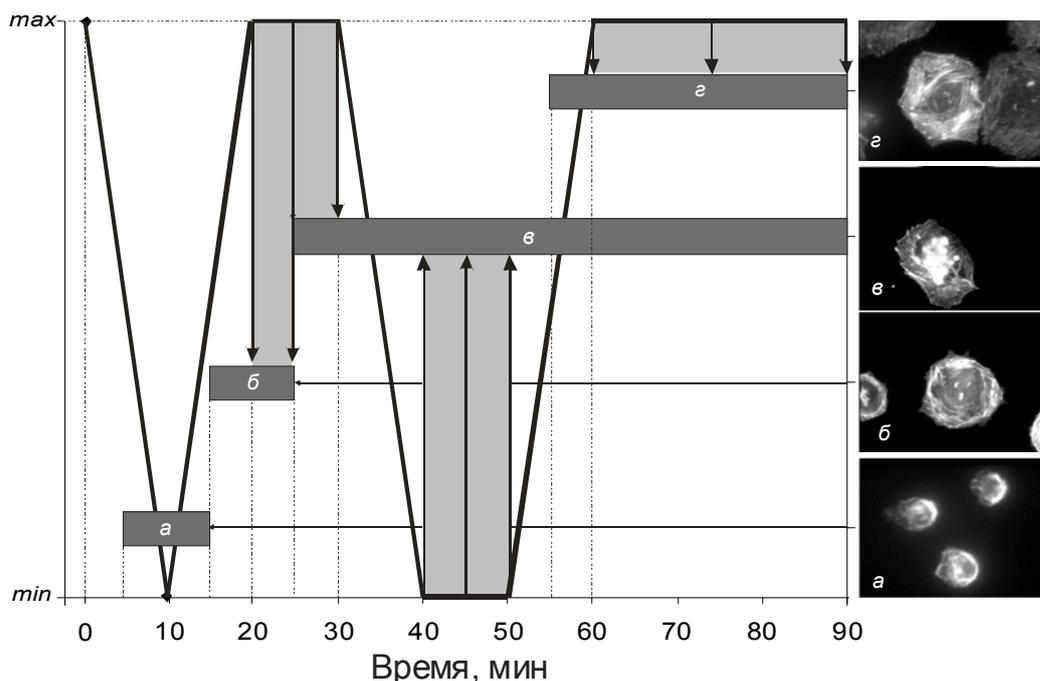


Рис. 2. Сравнительный анализ изменений уровня ДНК-связывающей активности NFκB клеток и смены их типов, соответствующих последовательным стадиям формирования актинового цитоскелета.

Данный график получен наложением графического изображения выделенных временных стадий формирования актинового цитоскелета (*тёмные прямоугольные полосы*) на график, отображающий периоды максимальных и минимальных значений активности NFκB (*чёрная ломаная линия*). *а, б, в, г* – клетки типов, соответствующих стадиям формирования актинового цитоскелета; по горизонтали отображено время, мин; на вертикали указаны значения только максимума (*max*) и минимума (*min*). Данные значения не отображают истинные значения интенсивностей электрофоретических полос, но только фиксируют наличие или отсутствие максимума или минимума. *Вертикальными стрелками* (нисходящими и восходящими) отображено соответствие максимумов и минимумов ДНК-связывающей активности NFκB стадиям формирования актинового цитоскелета.

ЭФР проводился аналогично показанному на рис. 2.

Для *SRF* сравнительный анализ изменений ДНК-связывающей активности и смены типов актинового цитоскелета при его формировании в течение распластывания клеток на фибронектине (рис. 1) не даёт оснований для установления уверенных соотношений между ними. Повышение уровня ДНК-связывающей активности комплекса 1 *SRF* через 30 мин может быть связано с тем, что именно в этот промежуток времени наблюдается наибольшая скорость распластывания клеток. Несовпадение результатов в отдельных временных интервалах свидетельствует, вероятнее всего, об отсутствии зависимости между уровнем ДНК-связывающей активности данного транскрипционного фактора и значимыми перестройками актинового цитоскелета в эти промежутки времени.

Для *API* сравнительный анализ показал, что его ДНК-связывающая активность, вероятно, не согласуется со сменой типов актинового цитоскелета при его формировании в течение распластывания клеток на фибронектине. Так, для комплекса 1 наблюдается наличие нескольких максимумов и минимумов активности во время существования максимума доли клеток, имеющих один тип актинового цитоскелета. В частности, он имеет варьирующие сроки начала изменений ДНК-связывания, что даёт дополнительные основания к выводу о независимости изменений уровня его ДНК-связывающей активности и процесса формирования актинового цитоскелета. Уровень

ДНК-связывающей активности комплекса 2, по крайней мере, до 50 мин распластывания клеток изменяется в противоположной фазе к уровню комплекса 1 и тоже имеет варьирующие сроки начала изменений ДНК-связывания.

Таким образом, при распластывании клеток на фибронектине только ДНК-связывающая активность  $\kappa B$ -зависимых белковых комплексов наиболее вероятно изменяется согласованно со стадиями формирования актинового цитоскелета. Стабильная активация ДНК-связывающей активности комплекса 1 SRF на 30-й мин после начала инкубации клеток на лиганде, по-видимому, связана с формированием сети актиновых филаментов при образовании ламелл в течение распластывания клеток.

Аналогичным образом анализировали ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов при распластывании клеток на ламинине 2/4 или антителах к рецептору ЭФР (рис. 3; рис. 4).

**2 а)** Анализ динамики формирования актинового цитоскелета в процессе распластывания клеток на ламинине 2/4 показал, что через 10 мин после нанесения клеток на лиганд (рис. 3 I, а,) 95 % всех клеток имеют актиновый цитоскелет на стадии олигомеризации. Но, по сравнению с распластыванием на фибронектине, уже на этой стадии у клеток выявляется незначительная полярность. Через 20 мин большинство клеток достаточно хорошо распластаны. Подавляющая доля клеток (~ 85 %), несмотря на некоторые внешние различия, имеет актиновый цитоскелет на стадии образования цитоплазматических структур (рис. 3, I, б, в, г). В отличие от распластывания на фибронектине здесь нет фокальных контактов и стресс-фибрилл, пучки актина расположены, в основном, продольно или перпендикулярно длинной оси клеток. Через 30 мин общее соотношение клеточных типов изменяется мало. Структуры актинового цитоскелета утолщаются. В части клеток отчётливо проявляются «фокусы» актина, от которых отходят актиновые пучки (рис. 3, I, в'). Через 50 мин после нанесения клеток на лиганд наблюдается истончение актиновых структур, появление агрегатов, что, по-видимому, свидетельствует о начале следующей стадии реорганизации цитоскелета. Через 60-90 мин такую картину можно наблюдать практически во всех клетках. По форме через 90 мин распластывания около 78 % клеток напоминают клетки типа «в». Так же как и при распластывании клеток на фибронектине, выявляются клетки типа «ранней» организации актинового цитоскелета (рис. 3, I, д). Его доля (~ 4 %) с течением времени не изменяется.

Таким образом, стадии формирования актинового цитоскелета и максимумы количества клеток того или иного типа при распластывании на ламинине 2/4 не совпадают. Одна и та же стадия образования цитоскелета может наблюдаться как в клетках доминирующего на данный момент типа, так и в клетках других типов. Выделили следующие стадии формирования актинового цитоскелета: 1 – стадия олигомеризации, 0-10 мин; 2 – стадия цитоплазматических структур, 20-40 мин; 3 – стадия реорганизации актинового цитоскелета, 40-90 мин.

**2 б)** Сопоставляя уровень ДНК-связывающей активности NF $\kappa$ B (рис. 3, II, а) с выделенными стадиями формирования актинового цитоскелета при распластывании клеток на ламинине 2/4 (рис. 3, I), можно убедиться, что наибольшие значения активности приходятся на период 20-40 мин после посадки клеток на лиганд, то есть как раз на стадию образования цитоплазматических структур. Обе стадии несформированного цитоскелета характеризуются снижением уровня ДНК-связывающей активности NF $\kappa$ B. Общий ход ДНК-связывающей активности разных белковых комплексов NF $\kappa$ B совпадает. Совпадают также и данные повторных опытов.

**2 в)** Соответственно стадиям формирования актинового цитоскелета изменяется и уровень ДНК-связывающей активности SRF (рис. 3, II, б). Отметим, что ход

кривых комплексов 2 и 3 в средней части диаграммы (рис. 3, III, б) сходен с ходом кривых для NFκB (рис. 3, III, а). Но в отличие от NFκB кривые уровней ДНК-связывающей активности комплекса 1 и комплексов 2, 3 у SRF идут в противофазе друг к другу.

Как и в случае распластывания клеток на фибронектине, ход ДНК-связывающей активности разных белковых комплексов, содержащих AP1, не совпадает (рис. 3, II, в, III, в). Имеется несогласованность начала изменений ДНК-связывания (период от 0 до 10 мин) обоих белковых комплексов. Наблюдается несоответствие значений уровня ДНК-связывания комплекса 2 на одних и тех же сроках в разных опытах. Ход изменений ДНК-связывающей активности комплекса 1 в разных опытах сходен, но пики активности довольно сильно смещены относительно друг друга так, что периоды их возникновения не совпадают со стадиями формирования актинового цитоскелета.

Таким образом, при распластывании клеток на ламинине 2/4 ДНК-связывающая активность NFκB и SRF изменяется, по-видимому, согласованно со стадиями формирования актинового цитоскелета, а ДНК-связывающая активность AP1 – нет.

**3 а)** *Актиновый цитоскелет всех клеток через 10 мин после нанесения на антитела к рецептору ЭФР находится на стадии олигомеризации. Через 10 мин распластывания на антителах клетки явно менее распластаны, чем на фибронектине или ламинине к этому же времени (рис. 4, I, а). Они абсолютно не полярны. Через 20 мин 55 % клеток начинают активно распластываться (рис. 4, I, б). Они имеют округлую форму и покрыты множеством мелких микроворсинок, содержащих пучки актина. В цитоплазме другие структуры актинового цитоскелета не выявляются, наблюдается только диффузное окрашивание клеток с более яркой циркулярной областью ближе к периферии, от которой отходят микроворсинки (стадия первичных структур). Через 30 мин 62 % клеток имеют очень характерные цитоскелетные структуры, состоящие из коротких пучков актина, сходящихся к одному центру (рис. 4, I, в). Таких центров относительно немного. Они расположены правильно по кругу, ограничивая объём клетки (стадия центрообразования). Клетки с цитоскелетом на стадии центрообразования постепенно (через 60 мин) сменяются клетками, характеризующимися очень тонкой ламеллой. Эта ламелла с трудом выявляется на препаратах (рис. 4, I, г) (стадия тонкой ламеллы). В это же время появляются хорошо распластанные клетки с наиболее развитой организацией актинового цитоскелета. Максимум этих клеток приходится на 120-ю мин (стадия развитого цитоскелета; рис. 4, I, д). Клетки имеют правильную округлую форму, широкую круговую ламеллу с актином по краю, кольцевой пояс волокнистых актиновых структур ближе к центру и крупный агрегат актина в центре клетки.*

Таким образом, клетки, содержащие актиновый цитоскелет на стадии олигомеризации, доминируют в период времени от 5 до 15 мин после помещения клеток на антитела, на стадии первичных структур – от 15 до 25 мин, на стадии центрообразования – от 25 до 50 мин, на стадии тонкой ламеллы – от 50 до 100 мин и на стадии развитого цитоскелета – от 100 мин и далее.

**3 б)** *Сравнение изменений ДНК-связывающей активности NFκB и SRF с ходом формирования актинового цитоскелета при распластывании клеток на антителах к рецептору ЭФР выявляет вероятную их согласованность. Первый пик ДНК-связывающей активности NFκB совпадает со стадией центрообразования, а второй – со стадией развитого цитоскелета. Наоборот ДНК-связывающая активность комплекса 1 SRF наиболее высока на стадиях первичных структур и тонкой ламеллы. Изменения ДНК-связывающей активности AP1 не согласуются со стадиями формирования актинового цитоскелета. Здесь опять, как и во всех предыдущих случаях, наблюдается несогласованность начала изменений ДНК-связывания.*

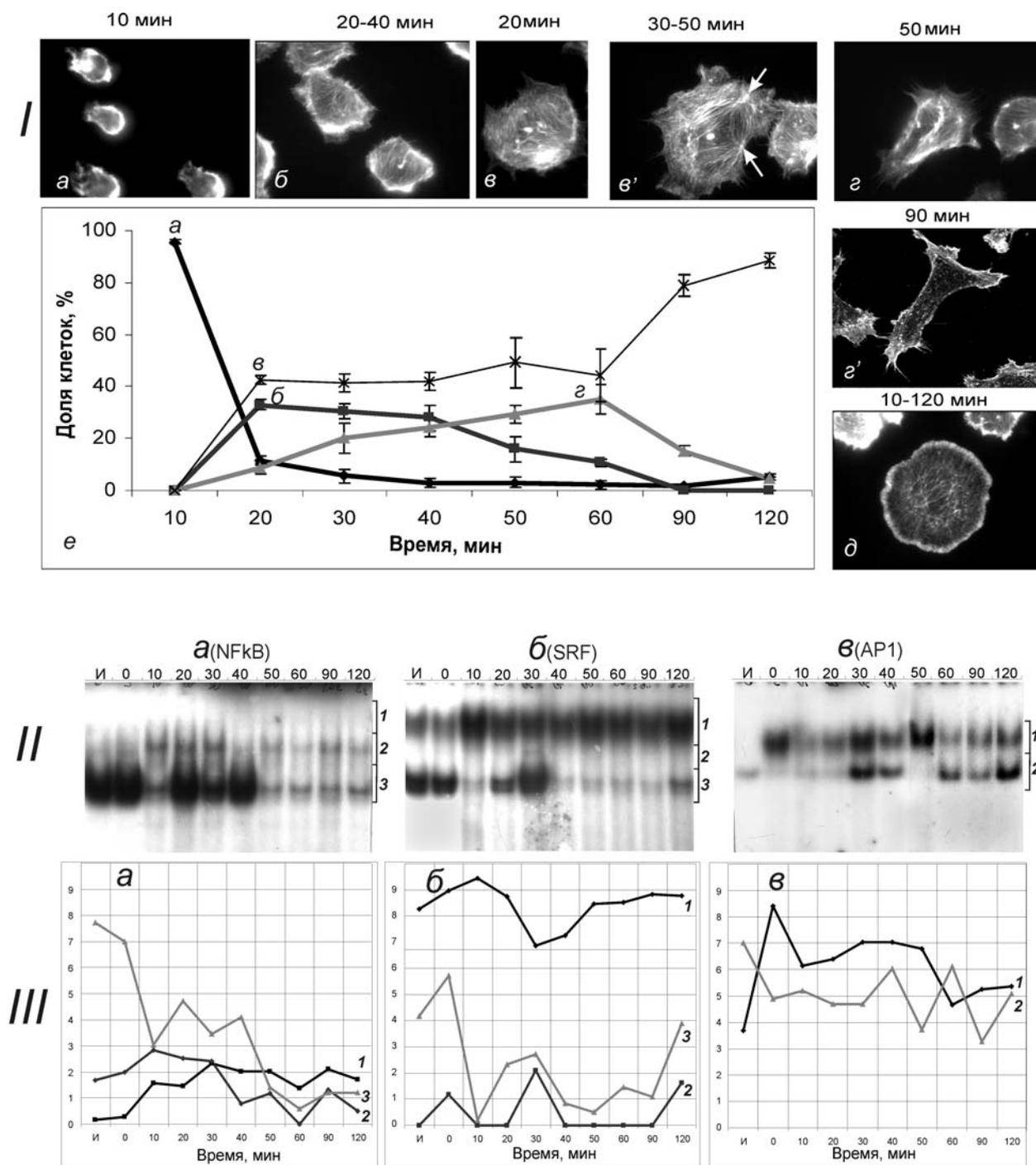


Рис. 3. Динамика актинового цитоскелета и ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов NFκB, SRF и AP1 в процессе распластывания клеток на ламинине 2/4.

*I* (*a*, *б*, *в*, *г*) – варианты клеток (не соответствуют стадиям формирования актинового цитоскелета, объяснения в тексте); *д* – клетки типа, постоянно присутствующего на всех сроках исследования без изменений доли от общего числа клеток (~4 %); *в'* – клетки типа «*в*» через 30-50 мин от начала распластывания, *стрелками* показаны «фокусы» схождения пучков актина. *г'* – клетки типа «*г*» через 60-90 мин; *e* – диаграмма, отображающая изменения долей клеток каждого типа (*a*, *б*, *в*, *г*) с течением времени. *II* и *III* – то же, что и на рис. 1.

Таким образом, при распластывании клеток на антителах 5A9 к рецептору ЭФР согласованно со стадиями формирования АЦ изменяется ДНК-связывающая активность

NFκB и SRF, а ДНК-связывающая активность AP1 изменяется со стадиями формирования в клетках АЦ не согласованно.

**4** Для того чтобы установить, какие из образующихся пучков актиновых филаментов являются истинно стресс-фибриллами, было проведено выявление винкулина на разных стадиях распластывания клеток на фибронектине и ламинине 2/4 в течение 2 ч.

При распластывании клеток на фибронектине винкулин уже на стадии краевых структур частично сосредотачивается на концах актиновых пучков, что может свидетельствовать об образовании стресс-фибрилл на этой стадии формирования актинового цитоскелета. Остальная часть цитоплазмы клеток на стадии краевых структур, кроме области ядра, остаётся свободной от винкулина. На стадии цитоплазматических структур агрегаты винкулина на концах актиновых филаментов укрупняются. Центральная область, содержащая винкулин, расширяется к периферии клеток. На стадии развитого цитоскелета чётко прослеживаются стресс-фибриллы с фокальными контактами на концах, в которых содержится винкулин. Остальная часть винкулина более или менее равномерно распределяется по всему объёму цитоплазмы клеток.

При распластывании клеток на ламинине 2/4 винкулин на более ранних стадиях формирования актинового цитоскелета обнаруживается в несколько большей степени в ядерной и окооядерной областях, чем на периферии клеток. На более поздних стадиях винкулин более или менее равномерно распределяется по всему объёму цитоплазмы клеток. Такое распределение винкулина напоминает распределение винкулина при распластывании клеток на фибронектине. Но в отличие от фибронектина, при распластывании клеток на ламинине винкулин в структурах на концах актиновых пучков не наблюдался.

Таким образом, при распластывании клеток на фибронектине точки роста стресс-фибрилл, по-видимому, образуются уже на самых ранних стадиях формирования актинового цитоскелета. Одновременно с процессом формирования стресс-фибрилл происходит постепенное перераспределение винкулина, не участвующего в образовании фокальных контактов, от области ядра к периферии клеток. При распластывании клеток на ламинине 2/4 ни на какой стадии формирования актинового цитоскелета, по-видимому, не наблюдается образование стресс-фибрилл.

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что каждой стадии формирования актинового цитоскелета при распластывании клеток на лигандах соответствует определенный тип его пространственной организации. Причем при распластывании клеток на фибронектине или антителах к рецептору ЭФР каждой стадии формирования актинового цитоскелета соответствует определённый выделенный нами тип клеток, а при распластывании клеток на ламинине 2/4 один и тот же тип цитоскелета могут иметь клетки различных типов.

**5** При исследовании изменений ДНК-связывающей активности всех ТФ оказалось, что они не носят характера монотонного повышения активности или поддержания её на одном уровне, а имеют несколько пиков активности. Частота возникновения пиков уменьшается по мере распластывания клеток в среднем в 1.5-2 раза для всех ТФ. Так, если время между ближайшими пиками в начале распластывания клеток составляет 15-25 мин, то к 1-1,5 ч распластывания – 40-50 мин.

Колебания уровня активности наблюдали и ранее для NFκB, активацию которого исследовали при стимуляции фактором некроза опухолей (TNFα) в нескольких клеточных линиях (Hoffman et al., 2002; Ting, Endy, 2002; Nelson et al., 2004).

Исследуя ДНК-связывающую активность тем же методом торможения в геле, Хоффманн с сотрудниками на мышинных фибробластах, нокаутированных по генам I $\kappa$ B  $\beta$  и  $\epsilon$ , обнаружили пики активности NF $\kappa$ B с периодом 1.5-2 ч, который тоже увеличивался по мере удаления от начала воздействия TNF $\alpha$  (Hoffmann et al., 2002). Примерно такой же по длительности цикл (100 мин) перемещения NF $\kappa$ B из ядра в цитоплазму и обратно был обнаружен в нейробластомных клетках под действием TNF $\alpha$  в опытах других авторов (Nelson et al., 2004).

Выявленные в данной работе колебания активности NF $\kappa$ B, SRF и AP1 не могут быть объяснены только лишь миграцией факторов из цитоплазмы в ядро и обратно. Так например, SRF и AP1 имеют преимущественно ядерную локализацию (Ding et al., 2001; Hess et al., 2004). Вероятно, здесь могут играть роль быстрые конформационные перестройки молекулы ТФ в результате действия сигнальных молекул, поступающих из цитоплазмы. Причину и механизм колебаний предстоит ещё выяснить.

Сравнивая изменения ДНК-связывающей активности разных ТФ, можно констатировать, что профили этих изменений имеют характерный вид как для каждого ТФ, так и для каждого исследуемого лиганда. Следует отметить, что максимумы и минимумы активности ТФ отражают не увеличение или уменьшение реакционной способности фактора, а количество его молекул, связавшихся с ДНК.

Обращает на себя внимание тот факт, что для каждого из изученных ТФ имеется несколько ДНК-связывающих белковых комплексов. Из различий их подвижности следует, что они имеют разную молекулярную массу, которая должна определяться их различным белковым составом, что, в свою очередь, может определять особенности их трансактивирующей активности, то есть запуск экспрессии различных генов.

В этой связи показательно, что ДНК-связывающая активность белкового комплекса 1 SRF, который, по всей видимости, содержит кроме самого димера SRF ещё один из белков Ets-семейства (p62<sup>TSF</sup>, Elk или SAP-1), образуя тройной комплекс (Zinck et al., 1993), в данной серии опытов всегда противоположна по своему значению активности других комплексов, в состав которых входит только димер SRF (Zinck et al., 1993). Эти данные могут объяснять дифференциальную активность генов, зависимых от SRF.

Сходным образом активность различных ДНК-связывающих комплексов NF $\kappa$ B тоже имеет характерные отличия в определённые периоды распластывания клеток. Особенно это касается самого высокомолекулярного комплекса. Учитывая, что данный транскрипционный фактор может взаимодействовать с актином как прямо (Are et al., 2000), так и опосредованно (Бабаков и др., 2004), вполне возможно допустить, что значимые влияния на ДНК-связывающую активность различных его белковых комплексов могут быть обусловлены особенностями реорганизаций цитоскелета в процессе распластывания клеток.

При сопоставлении изменений морфологии и активации ТФ уровень ДНК-связывания для некоторых из них можно соотнести со стадиями формирования АЦ. Наиболее чётко с этими стадиями соотносится активность NF $\kappa$ B. Обращает на себя внимание, что пики его активности приходятся на стадии формирования АЦ, которые характеризуются наличием хорошо выраженных контактов при распластывании клеток на фибронектине. На ламинине 2/4 и антителах аналогичным является наличие так называемых «фокусов», которые тоже, по-видимому, представляют собой какие-то комплексы адгезии, так как к ним крепятся пучки микрофиламентов.

ДНК-связывающая активность SRF зависит, по-видимому, не столько от наличия стресс-фибрилл и разнообразных пучков актиновых филаментов, сколько от формирования сети актиновых филаментов в процессе роста ламеллы на периферии клетки

или на её ведущем крае. Так, его активность наблюдалась именно в фазы либо быстрого распластывания клеток, либо их поляризации, в отличие от NFκB, для активации которого характерны устойчивые состояния АЦ. Это предположение подтверждают и данные о влиянии глобулярного актина на активность SRF (Sotiropoulos et al., 1999) и влиянии SRF на включение глобул актина в актиновые филаменты (Schratt et al., 2002).

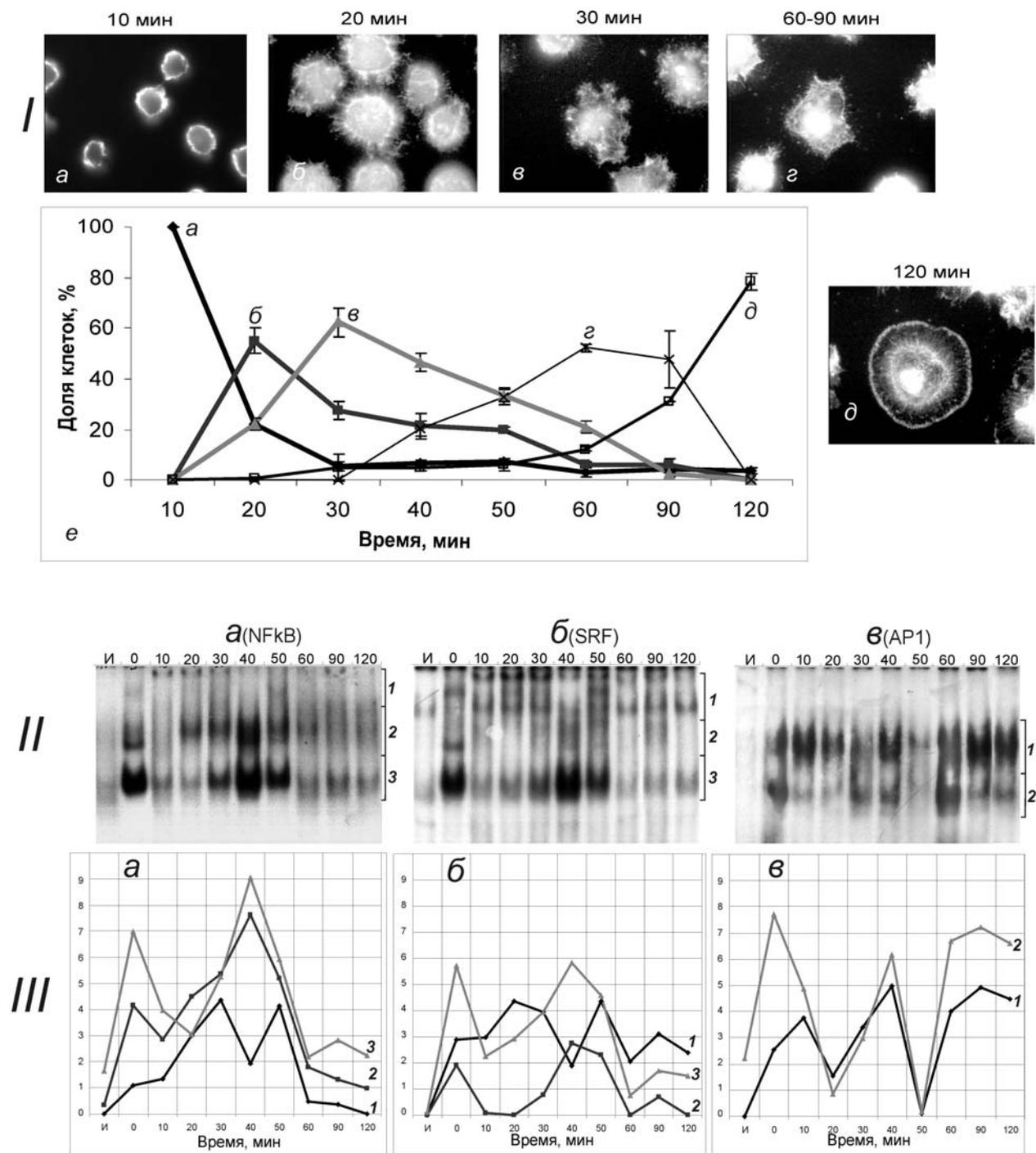


Рис. 4. Динамика актинового цитоскелета и ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов NFκB, SRF и AP1 в процессе распластывания клеток на антителах 5A9 к рецептору ЭФР.

Все типы (I, а-д) соответствуют стадиям формирования актинового цитоскелета в клетке. Объяснения те же, что и к рис. 1 и 3.

В процессе анализа разных экспериментальных подходов в настоящей работе не удалось выявить соответствий между динамикой ДНК-связывающей активности AP1 и сменой клеточных типов ни на одном из исследованных лигандов. По-видимому, активация AP1 не имеет отношения к реорганизациям АЦ, и в этом случае активирующую роль выполняют другие механизмы. Это может говорить о том, что АЦ не принимает участия в регуляции проведения любых сигналов от мембраны клетки к её ядру.

Из полученных данных следует, что формирование того или иного типа АЦ, а также профиль изменений уровня ДНК-связывающей активности того или иного ТФ зависят от лиганда, на котором распластываются клетки и, соответственно, от образующихся сложных белковых комплексов адгезии.

Использованные в работе иммобилизованные лиганды фибронектин, ламинин 2\4 и онтитела к рецептору ЭФР различаются между собой по количеству мест связывания с поверхностными рецепторами клетки. Так, например, ламинин имеет около 10 таких аминокислотных последовательностей, фибронектин – значительно меньше, а антитела взаимодействуют только с одним рецептором. Поэтому вполне возможно, что взаимодействие клетки с субстратом может осуществляться не однократно, а иметь несколько стадий взаимодействия, когда могут происходить последовательно контакты с разными участками белковой молекулы. Кроме того, рецептор ЭФР при взаимодействии со специфическим лигандом может взаимодействовать с другими поверхностными рецепторами (Riese et al., 1996; Miyamoto et al., 1996).

Принимая во внимание сложность таких взаимодействий, можно было ожидать, что при распластывании клеток на ранних стадиях будет происходить ряд последовательных реакций, индуцирующих активацию соответствующих ТФ. Волнообразный характер ДНК-связывающей активности ТФ в процессе распластывания вполне согласуется с таким предположением.

Оценить вероятность и экспериментально проверить это предположение, по-видимому, удастся только с помощью исключения из взаимодействия с лигандом тех или иных поверхностных рецепторов, например, путём предобработки клеток антителами к соответствующим интегринам. Подобный подход уже был использован для клеток A431 и нормальных кератиноцитов для оценки роли разных рецепторов в осуществлении миграции клеток, распластанных на лиганде (Калмыкова и др. 2003).

Полученные при распластывании клеток результаты необходимо было проверить и по возможности уточнить. За основу последующих проверок взяли действие на сеть актиновых филаментов ЭФР, который, как показано, при воздействии на клетку приводит сначала к дезорганизации, а потом к восстановлению её актиновой сети (Are et al., 2001).

**6 а)** *С этой целью провели выделение и подсчёт клеточных типов при воздействии ЭФР на клетки, распластанные на лигандах в течение 1 ч. Оказалось, что после быстрой разборки АЦ (в течение 5 мин), когда все клетки похожи друг на друга, популяция клеток, распластанных на фибронектине и ламинине, распадается на два основных типа (через 30 мин после начала инкубации клеток с ЭФР). Часть клеток возвращается к исходному типу. Другая часть тоже восстанавливает сеть актиновых филаментов, но к исходному типу не возвращается. Эти клетки характеризуются наличием фокальных контактов как у клеток, распластанных на фибронектине, так и на ламинине. Последний факт выявлен впервые потому, что обычно при распластывании клеток на ламинине типичные фокальные контакты не обнаруживаются. Такое действие ЭФР в данном случае можно объяснить только взаимодействием рецепторов ЭФР с интегриновыми рецепторами. Данное предположение подтверждают результаты экспериментов других авторов о*

кластеризации интегриновых и ЭФР-рецепторов (Miyamoto et al., 1996), а также данные о прямом взаимодействии ЭФР-Р и актина (Van der Heyden et al., 1997).

**6 б)** Анализ ДНК-связывающей активности ТФ показал, что её волнообразные изменения сохраняются после 1 ч распластывания клеток в течение всего времени проведения экспериментов по воздействию на клетки ЭФР. Более того, изменения ДНК-связывающей активности ТФ в результате воздействия на клетку ЭФР тоже имеют волнообразный характер. Это создавало дополнительные трудности для анализа уровня ДНК-связывающей активности ТФ, поскольку он зависел, фактически, от сложения двух волновых процессов, точные периоды и амплитуды которых были не известны.

Таким образом, выявляемый при денситометрии уровень ДНК-связывающей активности являлся результатом сложения действия ЭФР на активность ТФ и её волнообразных изменений, происходящих независимо от действия ростового фактора.

Чтобы устранить эти недостатки для каждой исследуемой временной точки был сделан свой контроль: клетки, распластанные на том же лиганде в течение всего времени от помещения их на лиганд и инкубации с ЭФР. Полученные таким образом контрольные значения активности вычитались из ответных значений, что позволяло выявить истинное влияние ЭФР на уровень ДНК-связывающей активности ТФ.

Сравнительный анализ изменений уровня ДНК-связывающей активности ТФ и перестройки АЦ в данной серии опытов подтвердил все сделанные ранее заключения и внёс несколько уточнений: изменения уровня ДНК-связывающей активности белкового комплекса 2 NFκB согласуются с процессами сборки и разборки стресс-фибрилл и (или) пучков актиновых филаментов; изменения уровня ДНК-связывающей активности белкового комплекса 1 SRF согласуются с процессами сборки и разборки сети актиновых филаментов с основанием ламеллы.

**7 В** следующей серии экспериментов ограничились только исследованием изменений уровня ДНК-связывающей активности комплекса 2 NFκB и комплекса 1 SRF, которые изменялись согласованно с перестройками АЦ. Главная задача этой серии экспериментов, как и предыдущей, заключалась в подтверждении и уточнении ранее полученных результатов (1. Изменения уровня ДНК-связывающей активности комплекса 2 NFκB согласуются с процессом сборки-разборки стресс-фибрилл и пучков актиновых филаментов. 2. Изменения уровня ДНК-связывающей активности комплекса 1 SRF согласуются с процессом сборки-разборки сети актиновых филаментов в основании ламеллы клеток). Однако, в отличие от опытов с ЭФР, где использовался прямой подход (т. е. сделанные заключения относились к предшествующим заключениям, полученным в опытах по распластыванию клеток в течение 1 ч), нужно было использовать обратный подход (т. е. предсказать заранее, каким образом будет изменяться уровень ДНК-связывающей активности ТФ в результате того или иного воздействия и сравнить результат опыта с предсказанным). Фактически, нужно было смоделировать уже изученные в данном исследовании процессы разборки или сборки сети АЦ. Такой подход был необходим для корректного доказательства сделанных заключений, поскольку все данные были получены одним методом без использования альтернативных подходов.

За основу будущей модели взяли действие ЭФР на АЦ и ДНК-связывающую активность ТФ. Это действие можно разделить на две фазы: фазу дезорганизации сети АЦ и фазу последующей организации АЦ (Are et al., 2001). Таким образом, создавалась возможность смоделировать действие ЭФР, заменив его на какой-либо другой агент, в течение первой или второй фазы действия. На наш взгляд, удобнее всего было моделировать фазу дезорганизации АЦ, поскольку при моделировании второй фазы действия ЭФР было бы непонятно, что мы наблюдаем: продолжающееся действие ЭФР

или того реагента, которым воздействуем на клетки. ЭФР-Р обладает достаточно высоким сродством к ЭФР (Cohen et al., 1982b), комплекс ЭФР-ЭФР-Р интернализуется (Никольский и др., 1987) и даже может попадать в ядро клетки (Holt et al., 1995). Что же касается моделирования первой фазы действия ЭФР, то существует достаточное количество веществ, приводящих к дезинтеграции АЦ и легко удаляемых из клеток. Одно из таких веществ – цитохалазин Д. В нашем случае нужно было разрушить сеть АЦ цитохалазином Д, смоделировав первую фазу действия ЭФР, потом отмыть его и добавить ЭФР, который осуществлял бы собственное действие во вторую фазу.

Действие цитохалазина Д на АЦ заключается в дезорганизации сети актиновых филаментов, димеризации глобулярного актина, гидролизе актиновой АТФ до АДФ и кепировании образовавшихся димеров с «-» конца (Sampath, Pollard, 1991). Изменения трансактивирующей активности NFκB и SRF в ответ на воздействие цитохалазином Д изучали с помощью регистрации увеличения или уменьшения экспрессии NFκB- и SRF-зависимых генов. Например, в ответ на воздействие цитохалазина Д показано повышение экспрессии NFκB-зависимого гена IL-8 эпителиальных клеток тонкого кишечника (Nemeth et al., 2004), SRF-зависимой экспрессии гена α-актина кардиомиоцитов (Wei et al., 2001) и гена *fos* мышечных клеток линии NIH3T3 (Sotiropoulos et al., 1999). Влияние цитохалазина Д на ДНК-связывающую активность изучалось только для NFκB. Обнаружено повышение уровня ДНК-связывания NFκB в ответ на воздействие цитохалазина Д (Nemeth et al., 2004). Однако во всех случаях повышение как трансактивирующей, так и ДНК-связывающей активности наблюдали не ранее чем через 2 ч после начала инкубации клеток с цитохалазином Д. На более ранних сроках данные характеристики никто не смотрел.

Мы использовали инкубацию клеток с цитохалазином Д в течение 30 мин. За это время происходит полная разборка сети актиновых филаментов.

Чтобы проверить, работает ли наша модель, сначала провели эксперименты с клетками, выращенными на пластике. В качестве исходного процесса, как уже говорилось, было взято действие ЭФР на АЦ и ДНК-связывающую активность ТФ. С результатами воздействия ЭФР сравнивали результаты последовательного действия ЭФР и цитохалазина Д. Наше предположение подтвердилось. Действительно, во всех принципиальных моментах действие ЭФР и последовательное действие цитохалазина Д и ЭФР соответствовали друг другу. Таким образом, создалась возможность предсказать, как будет изменяться ДНК-связывающая активность ТФ при последовательном воздействии цитохалазина Д и ЭФР на клетки, распластанные на лигандах.

Результаты экспериментов с цитохалазином Д подтвердили сделанные ранее заключения: изменения уровня ДНК-связывающей активности белкового комплекса 2 NFκB согласуются с процессами сборки и разборки стресс-фибрилл и (или) пучков актиновых филаментов; изменения уровня ДНК-связывающей активности белкового комплекса 1 SRF согласуются с процессами сборки и разборки сети актиновых филаментов в основании ламеллы. Кроме того, оказалось возможным сделать дополнительное предположение относительно изменений уровня ДНК-связывающей активности SRF. Уровень его активности в отсутствие ламелл и, соответственно, сети актиновых филаментов в её основании, соотносится, по-видимому, с концентрацией глобулярного актина в цитоплазме клетки.

Таким образом, наличие тех или иных стабильных состояний – типов пространственной организации АЦ может мало влиять на проведение сигнала, ДНК-связывающую активность ТФ и, следовательно, экспрессию генов. Скорее всего, на все эти процессы влияет процесс реорганизации тех или иных структур АЦ. Так, в наших

экспериментах получилось, что на ДНК-связывающую активность SRF могут влиять именно процессы сборки и разборки сети актиновых филаментов в основании ламелл и (или) уменьшения или увеличения G-актина, а на активность NFκB – процессы сборки и разборки стресс-фибрилл или пучков актиновых филаментов.

Все наши данные относительно SRF согласуются с исследованиями, сделанными ранее (Sotiropoulos et al., 1999; Posern et al., 2004). По данным работам следует, что активность SRF зависит от количества глобулярного актина. Если G-актин включается в фибриллы, то, соответственно, действие его на SRF становится меньше за счёт выключения из взаимодействия с SRF связавшихся молекул актина. Можно предположить подобный механизм и для регуляции NFκB.

**8** *Чтобы уточнить возможный механизм влияния быстрых перестроек АЦ на ДНК-связывающую активность NFκB, провели исследование перемещений p65 в течение распластывания клеток на лигандах и воздействия на распластаные клетки ЭФР и (или) цитохалазином Д. Направленность перемещений p65 сравнивали с направлением изменений уровня ДНК-связывающей активности комплекса 2 NFκB. Следует отметить, что по нашим данным, только уровень ДНК-связывающей активности комплекса 2 NFκB согласуется с перестройками АЦ. Именно в этом комплексе другими авторами обнаружено присутствие субъединицы p65, в то время как ДНК-белковый комплекс 3, по их данным, содержит только p50 и p52 (Nemeth et al., 2004). По нашим данным, субъединица p65 присутствует и в ДНК-белковом комплексе 3 наряду с другими формами NFκB, но в значительно меньших количествах относительно этих форм, чем в комплексе 2. По-видимому, именно по этой причине изменения уровня ДНК-связывающей активности комплекса 3 NFκB не во всех случаях соотносятся с перестройками АЦ.*

Как и следовало ожидать, длительно протекающие перемещения p65 из цитоплазмы клеток в ядро и обратно не согласовались с быстрыми изменениями его уровня ДНК-связывающей активности. Более того, на ранних сроках воздействия на клетки ЭФР или цитохалазина они были разнонаправленными: в то время как p65 следовал из цитоплазмы в ядро, уровень его ДНК-связывающей активности в ядре не увеличивался, а, наоборот, падал. Эти данные говорят об отсутствии прямой зависимости ДНК-связывающей активности p65 от его ядерно-цитоплазматических перемещений.

NFκB в цитоплазме находится в составе надмолекулярных комплексов. По крайней мере, часть этих комплексов, по-видимому, физически связаны с АЦ (Are et al., 2000). В состав комплексов могут входить не только ингибиторные субъединицы IκB, но и другие регуляторные молекулы, как в сплайсосоме (Habib et al., 2001), и актин-связывающие белки (Бабаков и др., 2004). При разрушении сети АЦ эти комплексы могут не диссоциировать на отдельные составляющие или диссоциировать частично. Показано, что для транспорта NFκB в ядро и обратно не обязательно высвобождение его от IκB (Huang et al., 2000). Таким образом, видимо, неактивный NFκB в комплексе с другими белками может находиться в ядре клетки и мигрировать в этом состоянии между цитоплазмой и ядром. Такую мысль косвенно подтверждает наличие на наших электрофорезах ядерных экстрактов с мечеными κB-олигонуклеотидными последовательностями (не всегда заметного) наиболее медленного комплекса 1.

С другой стороны, в ядре клеток A431 всегда присутствует некоторое количество свободного NFκB (Verma et al., 1995; Дариева и др., 1999). Именно этот NFκB может быстро реагировать на быстрые перестройки АЦ. Прямое взаимодействие G-актина и NFκB не показано. Однако показано взаимодействие с NFκB актинина 4 (Бабаков и др., 2004). Кроме того, этот белок обнаружен также в ядре (Honda et al., 1998). Учитывая известный механизм действия глобулярного актина на активность SRF, можно

предположить похожие взаимодействия для NFκB с актинином 4. Такое предположение подтверждают также наши неопубликованные данные о том, что актинин 4 присутствует в фокальных контактах и взаимодействует со стресс-фибриллами или пучками актиновых филаментов. Именно с перестройками этих структур связана, по настоящим исследованиям, и активность NFκB.

Таким образом, актинин 4 представляется удобным кандидатом для осуществления регуляторных воздействий, связанных с перестройками АЦ, на ДНК-связывающую активность NFκB.

## ВЫВОДЫ

1. Распластывание клеток на иммобилизованных лигандах сопровождается закономерной сменой типов пространственной организации актинового цитоскелета, наблюдаемых в большинстве клеток популяции в течение определённых временных интервалов. Особенности формирования и смена типов актинового цитоскелета зависят от лиганда, на котором распластываются клетки.
2. При распластывании клеток А431 в течение 2 ч на иммобилизованных лигандах и при инкубации в течение 2 ч с ЭФР клеток, распластанных на иммобилизованных лигандах, уровень ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов NFκB, SRF и AP1 изменяется волнообразно с коротким периодом 15-40 мин. Особенности изменений уровня ДНК-связывающей активности данных транскрипционных факторов зависят от типа лиганда, на котором распластываются клетки.
3. Изменения уровня ДНК-связывающей активности белкового комплекса 2, содержащего субъединицу p65 NFκB, и тройного белкового комплекса, содержащего димер SRF и один из белков Ets-семейства согласуются с перестройками актинового цитоскелета. Изменения ДНК-связывающей активности AP1 с перестройками актинового цитоскелета не согласуются. Изменения ДНК-связывающей активности NFκB согласуются с процессами сборки-разборки стресс-фибрилл, пучков актиновых филаментов и фокальных контактов. Изменения ДНК-связывающей активности SRF согласуются с процессами сборки-разборки сети актиновых филаментов в основании ламелл клеток.
4. Прямой зависимости короткопериодических изменений уровня ДНК-связывающей активности NFκB от ядерно-цитоплазматических перемещений p65 не выявлено.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Емельянов А. Н., Пинаев Г. П. 2001. Изменения в популяции клеток эпидермоидной карциномы А431, распластанных на разных субстратах, при действии лизофосфатидиловой кислоты (ЛФК) и эпидермального фактора роста (ЭФР) в соответствии со структурой актинового цитоскелета. Цитология. 43(9): 884.
2. Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Емельянов А. Н., Пинаев Г. П. 2002. ДНК-связывающая активность факторов транскрипции SRF, NFκB и AP1 при изменении организации актинового цитоскелета под влиянием иммобилизованных белков внеклеточного матрикса. Тезисы научных докладов III Съезда Биохимического общества, СПб, с.411.
3. Petoukhova O. A., Turoverova L. V., Kropacheva I. V., Emel'yanov A. N., Pinaev G. P. 2003. DNA binding activities of transcription factor SRF, NFκB and AP1 in A431 cells spread on immobilized extracellular matrix proteins. Eur. J. Biochem. V. 270. Suppl. 1. p. 98.
4. Емельянов А. Н., Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2003. Динамика ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов SRF, AP-1 и NFκB ядерных экстрактов клеток А431 в зависимости от времени распластывания на фибронектине, ламинине 2/4 и антителах к рецептору ЭФР. Цитология. 45(9): 873.
5. Петухова О. А., Туроверова Л. В., Емельянов А. Н., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 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. 47(2):175-183.

6. **Емельянов А. Н.,** Большакова А. В., Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2005. Особенности распределения р65 субъединицы транскрипционного фактора NF-κB в клетках A431, распластанных на фибронектине, ламинине или антителах к рецептору ЭФР. Цитология. 47(9): 808.
7. **Емельянов А. Н.,** Большакова А. В., Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2005. Распределение р65 субъединицы транскрипционного фактора NFκB в клетках A431, распластанных на фибронектине, ламинине или антителах к рецептору ЭФР, при разборке актинового цитоскелета цитохалазином. Цитология. 47 (9): 809.
8. *Petukhova O., Emelyanov A., Bolshakova A., Turoverova L., Babakov V., Kropacheva I., Magnusson K-E, Pinaev G.* 2005. Effect of EGF on redistribution of p65 NF-κB/RelA in A431 cells spread on immobilized ligands. Abstracts the American Society for Cell Biology, 45th Annual Meeting. p. 100a.
9. **Емельянов А. Н.,** Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2006. Динамика ДНК-связывающей активности факторов транскрипции в процессе распластывания клеток A431 на иммобилизованных лигандах. Цитология. 48(11): 935-947.
10. **Большакова А. В., Емельянов А.Н.,** Петухова О. А, Бабаков В. Н., Туроверова Л. В, Тентлер Д. Г, Магнуссон К.-Е., Пинаев Г. П. 2006. Перераспределение р65 субъединицы транскрипционного фактора NF-κB в клетках A431 при восстановлении актинового цитоскелета и стимуляции ЭФР. Цитология. 48(9): 746.

### СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бабаков В. Н., Бобков Д. Е., Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачёва И. В., Подольская Е. П., Пинаев Г. П.* 2004. α-Актинин-4 и р65-субъединица транскрипционного фактора NFκB солокализуются и совместно мигрируют в ядро в клетках A431 под действием эпидермального фактора роста. Цитология. 46: 1064-1071.
2. *Дариева З. А., Поспелов В. А., Поспелова Т. В.* 1999. транскрипционный фактор NF-κB/Rel конститутивно активирован и локализуется в ядре E1A+cHA-Ras трансформантов. Цитология. 41: 622-627.
3. *Калмыкова Н. В., Черепанова О. А., Блинова М. И., Пинаев Г. П.* 2003. Вклад интегриновых рецепторов в процесс миграции клеток A431 на ламинине 2/4 по действию ЭФР. Цитология. 45: 882.
4. *Никольский Н. Н., Сорокин А. Д., Сорокин А. Б.* 1987. Эпидермальный фактор роста. Ленинград, Наука: 200с.
5. *Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачёва И. В., Пинаев Г. П.* 2004. Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A431, распластанных на иммобилизованных лигандах. Цитология. 46(1): 5-15.
6. *Сорокин А. Б., Нестеров А. М., Сорокин А. Д., Игнатова Т. Н., Галактионов К. И., Кудрявцева Н. В.,* 1989. Получение и характеристика моноклональных антител к наружному домену рецептора ЭФР эпидермальной карциномы человека A431. Цитология 31(5): 549-555.
7. *Черепанова О. А., Калмыкова Н. В., Воронкина Н. В., Аре А. Ф., Горелик Ю. В., Пинаев Г. П.* 2002. Различия в характере взаимодействия нормальных и трансформированных кератоцитов человека с изоформами ламинина. Цитология 44(2): 151-152.
8. *Are A. F., Galkin V. E., Pospelova T. V., Pinaev G. P.* 2000. The p65/RelA subunit of NF-κB interacts with actin containing structures. Exp. Cell Res. 256: 533-544.
9. *Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U.* 2001. Attachment of A431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. Cell Motil. Cytoskelet. 48:24-36.
10. *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.
11. *Clark T. G., Merriam R. W.* 1977. Diffusible and bound actin nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. Cell. 12: 883-991.
12. *Cohen S.* 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J. Biol. Chem. 237: 1555-1562.
13. *Ding W, Gao S, Scott R. E.,* 2001. Senescence represses the nuclear localization of the serum response factor and differentiation regulates its nuclear localization with lineage specificity. J Cell Sci. 114: 1011-1108.
14. *Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K. M.* 2001. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2: 793-805.
15. *Geneitis D., Treisman R.,* 2001. Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. J. Biol.Chem. 276: 24531-24539.
16. *Genersch E., Schuppan D., Lichtner R. B.* 1996. Signaling by epidermal growth factor differentially affects integrin-mediated adhesion of tumor cells to extracellular matrix proteins. J. Mol. Med. 74: 609-616.
17. *Habib A. A., Chatterjee S., Park S-K., Ratan R. R., Lefebvre S., Vartanian T.* 2001. The epidermal growth factor receptor interacting protein and nuclear factor κB (NF-κB)-inducing kinase to activate NF-κB. J. Biol. Chem. 276: 8865-8874.
18. *Hall A.* 1998. Rho GTPases and actin cytoskeleton. Science. 279: 509-514.
19. *Hess J., Angel P., Schorpp-Kistner M.* 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. J. Cell Sci. 117: 5965-73.
20. *Hoffmann A., Levchenko A., Scott M. L., Baltimore D.* 2002. The IκB – NF-κB signaling module: temporal control and selective gene activation. Science 298: 1241-1245.
21. *Holt J. T., Gopal T. V., Moulton A. D., Nienhuis A. W.* 1986. Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 4794-8.

22. 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.
23. Hopkins A. M., Li D., Mrsny R. J., Walsh S. V., Nusrat A., 2000. Modulation of tight junction function by G protein-coupled events. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41(3): 329-40.
24. Huang T. T., Kudo N., Yoshida M., Miyamoto S. 2000. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I $\kappa$ B controls cytoplasmic localization of inactive NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 1014-9.
25. Hynes R. O. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9: M33-M37.
26. Malliri A., Symons M., Henningan R. F., Huristone A. F. L., Lamb R., Wheeler T., Ozanne B. W. 1998. The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of Rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangement, motility, and *in vivo* invasion of A431 cells. *J. Cell Biol.* 143:1087-1099.
27. Maniotis A. J., Chen C. S., Ingber D. E. 1997. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(3): 849-854.
28. May M. J., Ghosh S. 1998. Signal transduction through NF $\kappa$ B. *Immunol. Today* 19: 80-88.
29. Miyamoto S., Teramoto H., Gutkind J. S., Yamada K. M. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 135: 1633-42.
30. Miyamoto S., Katz B. Z., Lafrenie R. M., Yamada K. M. 1998. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling and morphogenesis. *Ann. N-Y Acad. Sci.* 857: 119-129.
31. Nelson D. E., Ihekweaba A. E. C., Elliot M., Johnson J. R., Gibney C. A., Foreman B. E., Nelson G., See V., Horton C. A., Spiller D. G., Edwards S. W., McDowell H. P., Unitt J. F., Sullivan E., Grimley R., Benson N., Broomhead D., Kell D. B., White M. R. H. 2004. Oscillations in NF- $\kappa$ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306: 704-708.
32. Nemeth Z. H., Wong H. R., Odoms K., Deitch E. A., Szabo C., Vizi E. S., Hasko G. 2004. Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells. *Mol Pharmacol.* 65(2): 342-349.
33. Posern G., Miralles F., Guettler S., Treisman R. 2004. Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J.* 23: 3973-83.
34. Puck T. T., Krystosek A. 1992. Role of the cytoskeleton in genome regulation and cancer. *Int. Rev. Cytol.* 132: 75-108.
35. Ridley A. L., Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399.
36. Riese D. J., Kim E. D., Elenius K., Buckley S., Klagsbrun M., Plowman G. D., Stern D. F. 1996. The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor- $\alpha$ , heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J. Biol. Chem.* 271: 20047-52.
37. Sampath P., Pollard T. D. 1991. Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry* 19:30: 1973-80.
38. Sastry S. K., Horwitz A. F. 1993. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 819-831.
39. Schoenwaelder S. M., Burridge K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 274-286.
40. Schrott G., Philippar U., Berger J., Sxhwarz H., Heidenreich O., Nordheim A. 2002. Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 156: 737-750.
41. Small J. V., Rottner K., Kaverina I., Anderson K. I. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404: 271-81.
42. Small J. V., Rottner K., Kaverina I. 1999. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 54-60.
43. Sotiropoulos A., Gineitis D., Copeland J., Treisman R. 1999. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamic. *Cell.* 98: 159-169.
44. Ting A. Y., Endy D. 2002. Decoding NF- $\kappa$ B signaling. *Science* 298: 1189-1190.
45. Van Aelst L., S'Souza-Schorey C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Develop.* 11: 2295-2322.
46. Van der Heyden M. A., Oude Weernink P. A., Van Oirschot B. A., Van Bergen en Henegouwen P. M., Boonstra J., Rijksen G. 1997. Epidermal growth factor-induced activation and translocation of c-Src to the cytoskeleton depends on the actin binding domain of the EGF-receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1359: 211-21.
47. Verma I. M., Stevenson J. K., Schwarz E. M., Van Antwerp D., Miyamoto S. 1995. Rel/NF- $\kappa$ B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9:2723-35.
48. Wei L., Wang L., Carson J. A., Agan J. E., Imanaka-Yoshida K., Schwartz R. J. 2001. beta1 integrin and organized actin filaments facilitate cardiomyocyte-specific RhoA-dependent activation of the skeletal alpha-actin promoter. *FASEB J.* 15: 785-96.
49. Yamada K. M., Miyamoto S. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:681-689.
50. Yamada K. M., Geiger B. 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 76-85.
51. Yin H. L., Janmey P. A. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* 65:761-89.
52. Zinck R., Hipskind R. A., Pingout V., Nordheim A. 1993. C-fos transcriptional activation and repression correlate temporally with the phosphorylation status of TCF. *EMBO J.* 12: 2377-2387.

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам Института цитологии проф. Пинаеву Г. П., своему научному руководителю к.б.н. Петуховой О. А., к.б.н. Туровой Л. В., к.б.н. Кропачёвой И. В., д.б.н. Морозову В. И., к.б.н. Бабакову В. Н., к.б.н. Чистяковой И. А., асп. Большаковой А. В., к.б.н. Блиновой М. И., к.б.н. Калмыковой Н. В., к.б.н. Черепановой О. А. и д.б.н. Корниловой Е. С. за помощь в работе.

Особенно благодарен автор своей жене Анне Юрьевне Марковой за неоценимую помощь и поддержку в течение всего времени выполнения работы.