

ДИНАМИКА ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ В ПРОЦЕССЕ РАСПЛАСТЫВАНИЯ КЛЕТОК A431 НА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ЛИГАНДАХ

© А. Н. Емельянов, О. А. Петухова,¹ Л. В. Туроверова, И. В. Кропачева, Г. П. Пинаев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: olvial@mail.cytspb.rssi.ru

Динамика актинового цитоскелета с параллельным анализом ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов, взаимодействующих с консенсусными последовательностями ДНК *κB*, *SRE* и *API*, были прослежены в течение 2 ч распластывания клеток A431 на фибронектине, ламинине-2/4 или антителах к рецептору эпидермального фактора роста. Показано, что распластывание сопровождается последовательным формированием структур актинового цитоскелета, пространственная организация которого зависит от типа иммобилизованного лиганда. Определены временные промежутки, в течение которых те или иные формы цитоскелета качественно не изменяются и характерны для доминирующего числа клеток в популяции. Установлено, что ДНК-связывающая активность исследуемых факторов изменяется циклически в процессе распластывания. Циклические изменения ДНК-связывающей активности определяются природой транскрипционного фактора, зависят от типа лиганда и имеют период 15—40 мин. Сопоставление процессов формирования цитоскелета и ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов свидетельствует о вероятном наличии связи между активацией NF-κB и SRF и перестройками актинового цитоскелета.

Ключевые слова: транскрипционные факторы, адгезия, внеклеточный матрикс, динамика актиновых структур.

Распластывание клеток на иммобилизованных белках внеклеточного матрикса является модельной системой, которая позволяет выявлять процессы, связанные с адгезией, как на молекулярном, так и на субклеточном уровнях организации клетки. Взаимодействие клеток с белками внеклеточного матрикса осуществляется поверхностными рецепторами адгезии, среди которых лучше всего охарактеризованы интегрины (Van Aelst, D'Souza-Schorey, 1997; Hall, 1998; Schoenwaelder, Burridge, 1999). Интегрины активируют сигнальные молекулы в образующихся трансмембранных комплексах, что способствует переносу в ядро белковых факторов, индуцирующих транскрипцию генов (Clark, Brugge, 1995; Miyamoto et al., 1998).

Актиновый цитоскелет тоже является обязательным участником процесса адгезии, взаимодействуя с рецепторами и способствуя стабилизации множественных белковых взаимодействий и определяя форму клетки (Hynes, 1999; Geiger et al., 2001). При этом происходит его реорганизация под влиянием элементов внеклеточного матрикса. Структуры актинового цитоскелета в культивируемых клетках представлены стресс-фибриллами, разнообразными пучками микрофиламентов в цитоплазме и филоподиях, а также сетью микрофиламентов в ламеллах клеток (Small et al., 1999). Перечисленные структуры образуются при распластывании клеток эпидермальной карциномы A431 на фибронектине (стресс-фибриллы), ламинине (ламеллы) и антителах к рецептору ЭФР (филоподии и ламеллы) (Are et al., 2001). Было

показано, что эти типичные структуры, соответствующие каждому лиганду, на котором распластываются клетки, характерны для большинства распластанных в течение 1 ч клеток (Петухова и др., 2004).

В ряде работ показано наличие связи между состоянием актинового цитоскелета и проведением сигнала (Puck, Krystosek, 1992; Yamada, Geiger, 1997). Это приводит к предположению о том, что изменение пространственной организации цитоскелета может оказывать влияние на процесс активации определенных транскрипционных факторов (ТФ).

Для проверки этого предположения были выбраны ТФ, которые специфически взаимодействуют с последовательностями *κB*, *SRE* и *API*. Показано, что активность данных факторов может изменяться в связи с адгезией и реорганизацией актинового цитоскелета (Qwarnstrom et al., 1994; Zhu et al., 1998; Sotiropoulos et al., 1999; Ingram, 2000; Gineitis, Treisman, 2001). В нашей лаборатории получены данные о взаимодействии ТФ с актиновым цитоскелетом. Было установлено, что субъединица p65 транскрипционного фактора NF-κB взаимодействует с актином и актинсвязывающим белком α-актинином и перераспределяется в цитоплазме клетки в зависимости от характера организации актиновых структур (Are et al., 2000; Бабаков и др., 2004).

Если активация ТФ (которую оценивали по степени их ДНК-связывающей активности) зависит от взаимодействия сигнальных молекул с какими-либо актиновыми структурами, то любые перестройки цитоскелета мо-

гут влиять на этот процесс. Ранее было установлено, что открепление и перевод клеток в суспензионное состояние, когда происходит разрушение любых форм актинового цитоскелета, приводят к изменению ДНК-связывающей активности всех трех исследованных ТФ (NF-κB, SRF и AP1). При распластывании клеток на иммобилизованных лигандах в течение 1 ч ДНК-связывающая активность этих ТФ также изменяется (Петухова и др., 2005). Активный цитоскелет, однако, к этому сроку уже сформирован, поэтому трудно было установить, в какой степени активация ТФ может быть связана с процессом организации специфического цитоскелета.

В настоящей работе исследовали динамику ДНК-связывающей активности выбранных ТФ в процессе распластывания клеток на разных лигандах, в течение которого идут активное формирование и перестройки актин-содержащих структур. Результаты сравнительного анализа динамики ДНК-связывания ТФ и процесса формирования актинового цитоскелета дают основание считать, что активность по крайней мере одного из ТФ, а именно NF-κB, непосредственно связана с наличием в клетке определенных типов пространственной организации актинового цитоскелета.

Материал и методика

Клетки эпидермоидной карциномы линии A431 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Клетки открепляли от субстрата смесью растворов трипсина и версена в соотношении 3 : 7 и наносили на предметные стекла (2 · 10⁵ кл./мл по 100 мкл) или на чашки Петри (1.25 · 10⁶ кл./мл по 4 мл), покрытые белками внеклеточного матрикса фибронектином, или ламинином-2/4, или антителами 5A9 к рецептору эпидермального фактора роста (ЭФР). Белки внеклеточного матрикса и антитела 5A9 выделяли по специальной методике, описанной ранее (Age et al., 2001; Черепанова и др., 2002). Клетки анализировали в течение 2 ч с интервалом в 10 мин в течение 1-го ч распластывания и с интервалом 30 мин в течение 2-го ч распластывания. Для флуоресцентного анализа пространственной организации актиновых структур клетки окрашивали родамин-фаллоидином (Age et al., 2001).

Для изучения динамики формирования актинового цитоскелета и ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов NF-κB, SRE и AP1 в клеточной популяции в процессе распластывания клетки исследовали через 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 и 120 мин с момента посадки на тот или иной субстрат. В качестве контроля использовали клетки, выращенные до субконфлюентного состояния на пластике, и клетки после перевода в суспензионное состояние. Те же показатели клеток в суспензионном состоянии служили в качестве временной точки «0».

Процедура численного анализа клеточных типов подробно описана ранее (Петухова и др., 2004). В зависимости от структуры актинового цитоскелета и формы клеток выделяли клетки нескольких типов и подсчитывали долю клеток, принадлежащих к каждому типу. На рисунках приведены средние значения доли клеток, принадлежащих к данному морфологическому типу.

Связывающую активность ДНК определяли методом торможения в геле (EMSA, electrophoretic mobility shift assay; Kingston, 1990). Процедура подробно описана ранее (Петухова и др., 2005). Суспензию клеток (1.7 · 10⁶ кл./мл) наносили на чашки, покрытые лигандами, и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение необходимого времени. Клетки лизировали в буфере, содержащем 0.32 М сахарозы, 2 мМ MgCl₂, 0.1 мМ EDTA, 0.1 % Тритона X-100, 10 мМ Триса, pH 7.9, 1.0 мМ DTT и 0.5 мМ PMSF. Выделенные ядра очищали центрифугированием в 0.5 М сахарозе (Марзлав, Хуан, 1987), и фракции, содержащие транскрипционные факторы, экстрагировали буфером, содержащим 400 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, pH 7.9, 25 % глицерина, 1.5 мМ MgCl₂, 0.4 мМ EDTA, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ DTT и 2 мМ Na₃VO₄. В реакции связывания использовали равные количества белка (7 мкг). Экстракты инкубировали в буфере (50 мМ KCl, 20 мМ HEPES, pH 7.9, 10 мМ MgCl₂, 0.5 мМ DTT и 12 % глицерина), содержащем поли(dI-dC) и олигонуклеотидные пробы. Олигонуклеотиды SRE (*c-fos*), κB и AP1 (*c-jun*) (5'-GGATGTCCATATTAGGACATC-3', 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' и 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' соответственно) метили γ³²P-АТФ (Amersham, США) в Т₄-полинуклеотидкиназной реакции (Fermentas, Литва). Реакцию связывания проводили 20 мин при комнатной температуре. По окончании реакции пробы разделяли в нативном 4%-ном ПААГ при постоянном напряжении (10 В/см) в ТАЕ-буфере. Гели высушивали и экспонировали с пленкой Kodak X-omat при -80 °С.

Количественный анализ ДНК-связывающей активности осуществляли, определяя интенсивность засвечивания рентгеновской пленки 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 и 4 квадратными скобками. Денситометрию электрофоретических полос (в дальнейшем — полос) проводили с помощью компьютерной программы Scion image 4.2. Результаты сканирования оформляли в виде диаграмм. 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 к нулю. Количество радиоактивной метки, нанесенной на одну дорожку, было стандартизовано.

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

Анализируя диаграммы, 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 было 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 мень-

ше выбранного доверительного интервала (1000 отн. ед.), который не влияет на форму кривых (на рисунках для удобства восприятия значения интенсивностей уменьшены в 1000 раз). Поэтому для других значений ошибку не вычисляли. Все подсчеты, построения графиков и диаграмм проводили с помощью программы Microsoft Excel.

Использовали реактивы фирмы Sigma (США).

Результаты

Распластывание клеток на фибронектине. 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 еще нет, наблюдается диффузное окрашивание преимущественно по периферии клеток (назовем 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 объему цитоплазмы, фокальными контактами, стресс-фибриллами и диффузно распределенными агрегатами актина (стадия цитоплазматических структур). Максимум количества этих клеток (около 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). Максимум этих клеток (около 35 %) приходится на 90 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 еще 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 (около 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 определенные промежутки времени. Соответственно этим промежуткам времени регистрируются максимумы долей клеток, характеризующихся наличием цитоскелета на соответствующей стадии формирования. Максимум количества 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 вышеперечисленных типов клетки последнего типа в период своего максимума не составляют абсолютного большинства клеток. В это время по абсолютному значению продолжают доминировать клетки предыдущего типа.

На тех же сроках распластывания клеток проводили анализ специфической ДНК-связывающей активности ТФ, взаимодействующих с консенсусными последовательностями *κB*, *SRE* и *AP1* (рис. 1, II). При связывании ТФ выявляется от 2 до 3 ДНК-белковых комплексов (3 для *κB* и *SRE* и 2 для *AP1*), различающихся по электрофоретической подвижности. Поскольку ранее (Петухова и др., 2005) 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 ТФ.

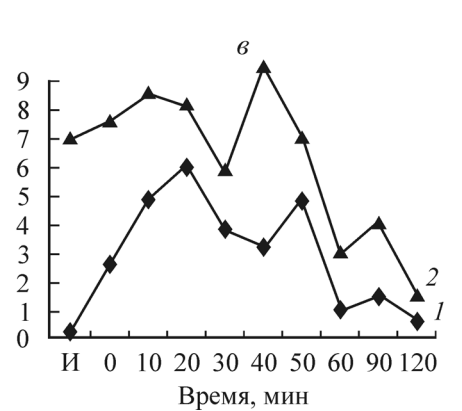
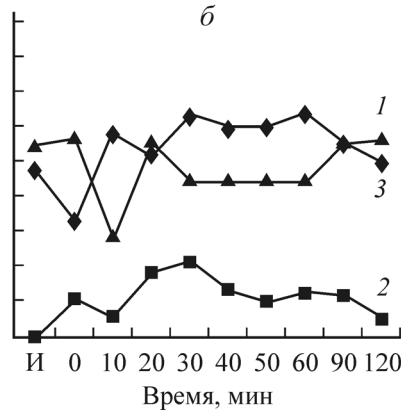
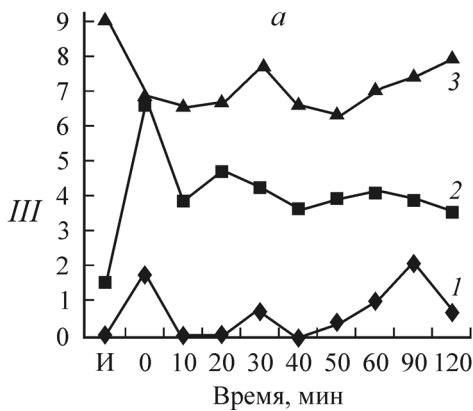
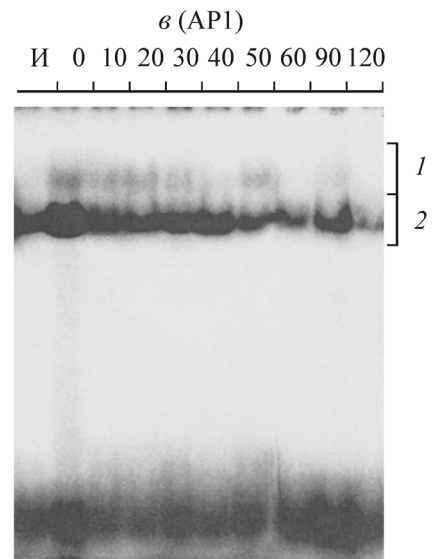
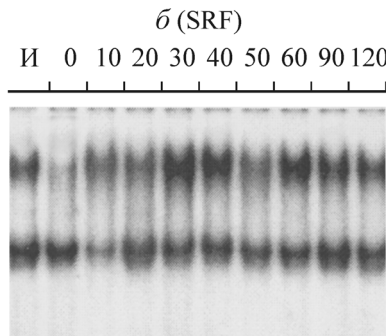
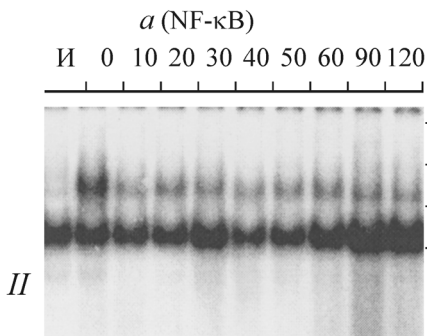
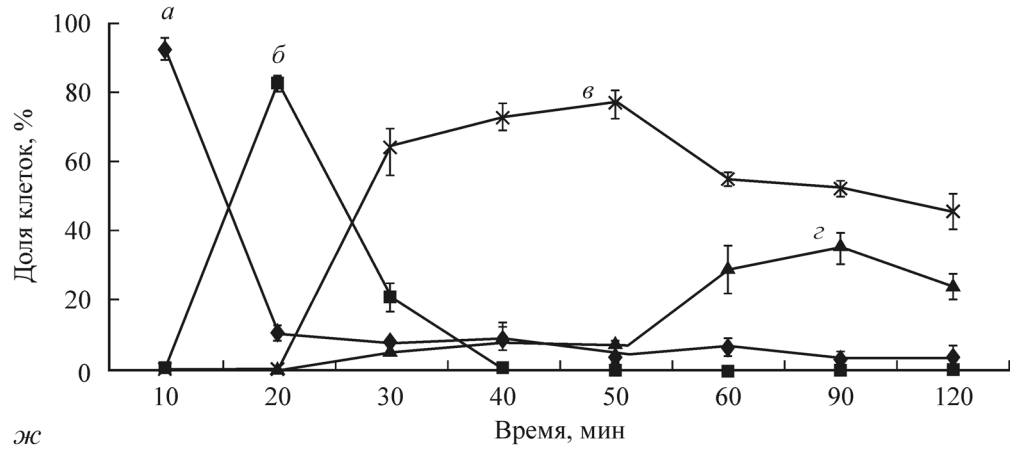
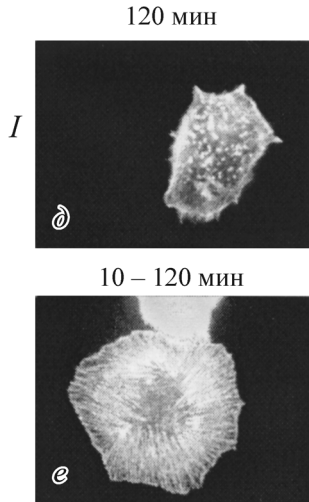
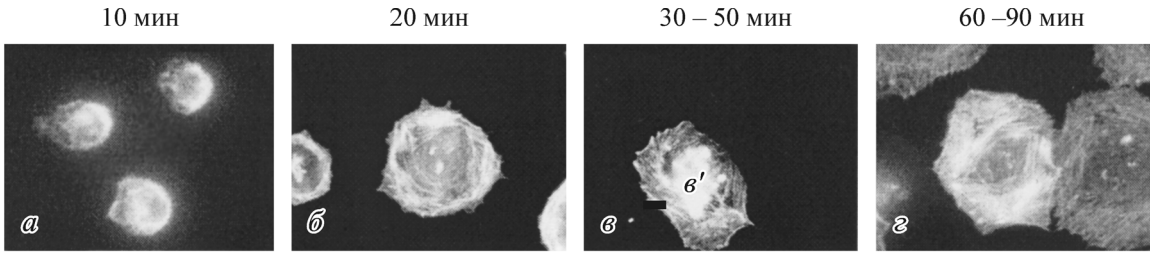
Так как исходное состояние культивируемых клеток (рис. 1, II, а, дорожка И) по степени ДНК-связывающей активности изучаемых ТФ было различным, за начальную точку отсчета принимали ДНК-связывающую активность ТФ в клетках после перевода их в суспензионное состояние (дорожка 0). В этом случае всегда наблюдали активацию ТФ и, таким образом, выравнивали исходное состояние клеток.

Для анализа уровня ДНК-связывающей активности NF-κB денситометрировали 3 области расположения полос ДНК-белковых комплексов, обозначенных на рис. 1, II цифрами 1—3. Общий ход кривых интенсивностей всех электрофоретических полос (комплексы 1—3 на рис. 1, III) совпадает. Легко выделяются области повышения активности для всех трех ДНК-белковых комплексов (см. таблицу). Точка 120 мин в анализ не включена из-за значительного разброса данных разных опытов в этой точке.

Как видно из данных таблицы, выявляются 2 последовательных цикла возрастания ДНК-связывающей активности ТФ (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 NF-κB, 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 (см. таблицу).



Хотя регистрируемые пики активности AP1 повторяются во всех повторных опытах, направление общего вектора изменений ДНК-связывания не сохраняется. Можно еще отметить, что случай, изображенный на рис. 1, II, в, наглядно показывает необязательность полного совпадения данных, видимых на электрофореграмме глазом, и данных денситометрии после введения всех поправок. Действительно, здесь визуально яркость полос дорожки 0 выше, чем соответствующих им полос дорожек 10—50. На гистограмме же эти соотношения выглядят иначе. Данный феномен объясняется тем, что значения ДНК-связывающей активности ТФ на диаграммах, помещенных под фотографиями электрофореграмм, получены уже с учетом выравнивания количества метки на каждой дорожке. Для этой цели использовали электрофоретические полосы в нижней части электрофореграмм, которые представляют собой не связавшуюся с белком метку.

Сопоставляя между собой данные для всех трех исследуемых ТФ 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 ДНК-связывания ТФ. В дальнейшем их ДНК-связывающая активность не приходит к исходным значениям. Пики активности ТФ продолжают возникать, но с меньшей частотой. Хорошо заметны качественные различия в ходе кривых изменений активности разных ТФ.

Сравнительный анализ изменений ДНК-связывающей активности ТФ и смены типов актинового цитоскелета при его формировании показал, что для NF-κB 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 60—90 мин соответствует стадии клеток «г». Клеткам с цитоскелетом на стадии цитоплазматических структур соответствует, по-видимому, именно минимум ДНК-связывающей активности NF-κB. Если бы это было иначе, то мы увидели бы длительное повышение ДНК-связывающей активности NF-κB в течение всего времени его доминирования. В данном случае максимум 60—90 мин может объясняться только присутствием в это время значительной доли клеток на стадии развитого цитоскелета.

Для SRF сравнительный анализ изменений ДНК-связывающей активности и смены типов актинового цито-

Время появления максимумов (max) и минимумов (min) ДНК-связывающей активности некоторых белковых комплексов транскрипционных факторов (ТФ) при распластывании клеток А431 на разных субстратах

Лиганд	ТФ	Белковый комплекс	Время, мин	
			max	min
Фибронектин	NF-κB	Все	0	10
			20—30	40—50
			60—90	
	AP1	1	20—30	0—10
			50	30—40
			90	60
Ламинин-2/4	AP1	1	0—10	20—30
			30—40	60—90
			40—50	60—90

Примечание. Время отсчитывается от момента помещения клеток на лиганд.

скелета при его формировании не дает основания для каких-либо утверждений. 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. Нестабильность результатов свидетельствует, вероятнее всего, об отсутствии зависимости между уровнем ДНК-связывающей активности данного ТФ и последовательными стадиями формирования актинового цитоскелета.

Для AP1 сравнительный анализ показал, что его ДНК-связывающая активность, вероятно, не изменяется согласованно со сменой типов актинового цитоскелета при его формировании. Так, комплекс 1 исключается однозначно, его активность имеет несколько максимумов и минимумов в течение максимума одного типа актинового цитоскелета. В частности, он имеет нестабильное начало изменений ДНК-связывания, что дает дополнительные основания для вывода о независимости изменений уровня его ДНК-связывающей активности и процесса формирования актинового цитоскелета. Комплекс 2, по крайней мере до 50-й мин распластывания, изменяется в противоположной фазе к уровню комплекса 1 и тоже имеет признак нестабильности начала изменений ДНК-связывания.

Таким образом, при распластывании клеток на фибронектине только ДНК-связывающая активность κB-зависимых белковых комплексов наиболее вероятно изменяется согласованно со стадиями формирования актино-

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

I (а—д) — стадии формирования актинового цитоскелета; д — клетки этого типа присутствуют только на 120-й мин их распластывания (около 18 % от общего числа клеток); е — клетки, постоянно присутствующие на всех сроках исследования без изменения доли (около 10 %); сверху над фотографиями указано время от начала распластывания, когда доля клеток данного типа максимальна; ж — диаграмма, отображающая изменения доли клеток каждого типа (а—г) с течением времени. II — динамика ДНК-связывающей активности белковых комплексов, содержащих транскрипционные факторы NF-κB (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 при оценке полученных 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—3 — ДНК-белковые комплексы (квадратными скобками обозначена ширина областей сканирования). На диаграммах ДНК-связывающей активности (III) погрешность одного измерения не превышает размера точки.

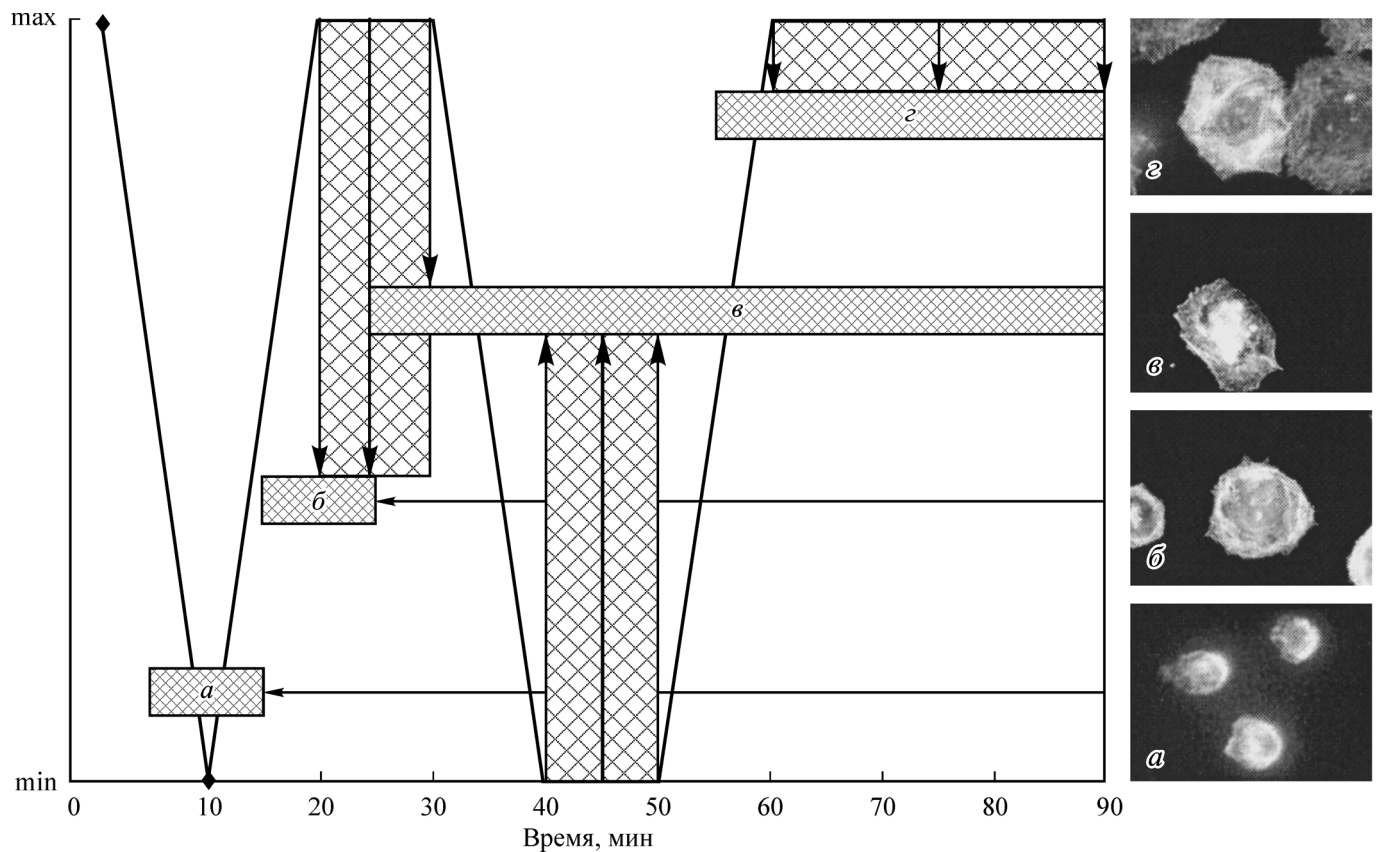


Рис. 2. Сравнительный анализ изменений уровня ДНК-связывающей активности NF-κB клеток и смены их типов, соответствующих последовательным стадиям формирования актинового цитоскелета.

Данный график получен наложением графического изображения выделенных временных стадий формирования актинового цитоскелета (темные прямоугольные полосы) на график, отображающий периоды максимальных и минимальных значений активности NF-κB (черная ломаная линия). *a—z* — клетки типов, соответствующих стадиям формирования актинового цитоскелета; по горизонтали — время, мин; по вертикали указаны значения только максимума (max) и минимума (min). Данные значения не отображают истинных значений 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 NF-κB стадиям формирования актинового цитоскелета.

вого цитоскелета. Стабильная активация ДНК-связывающей активности комплекса 1 SRF на 30-й мин после начала инкубации клеток на лиганде, по-видимому, связана с образованием ламелл при распластывании клеток.

Распластывание клеток на ламинине-2/4. 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) 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 (около 85 %), несмотря на некоторые внешние различия, имеет актиновый цитоскелет на стадии образования цитоплазматических структур (рис. 3, I, б—z). 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 отчетливо проявляются «фокусы» актина, от которых отходят актиновые пучки (рис. 3, I, в'). Через 50 мин после нанесения клеток на лиганд наблюдаются истончение актиновых структур и по-

явление 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). Их доля (около 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.

Сопоставляя уровень ДНК-связывающей активности NF-κB с выделенными стадиями формирования актинового цитоскелета (рис. 3, II, а), можно убедиться, что наибольшие значения активности приходятся на период 20—40 мин после посадки клеток на лиганд, т. е. как раз на стадию образования цитоплазматических структур.

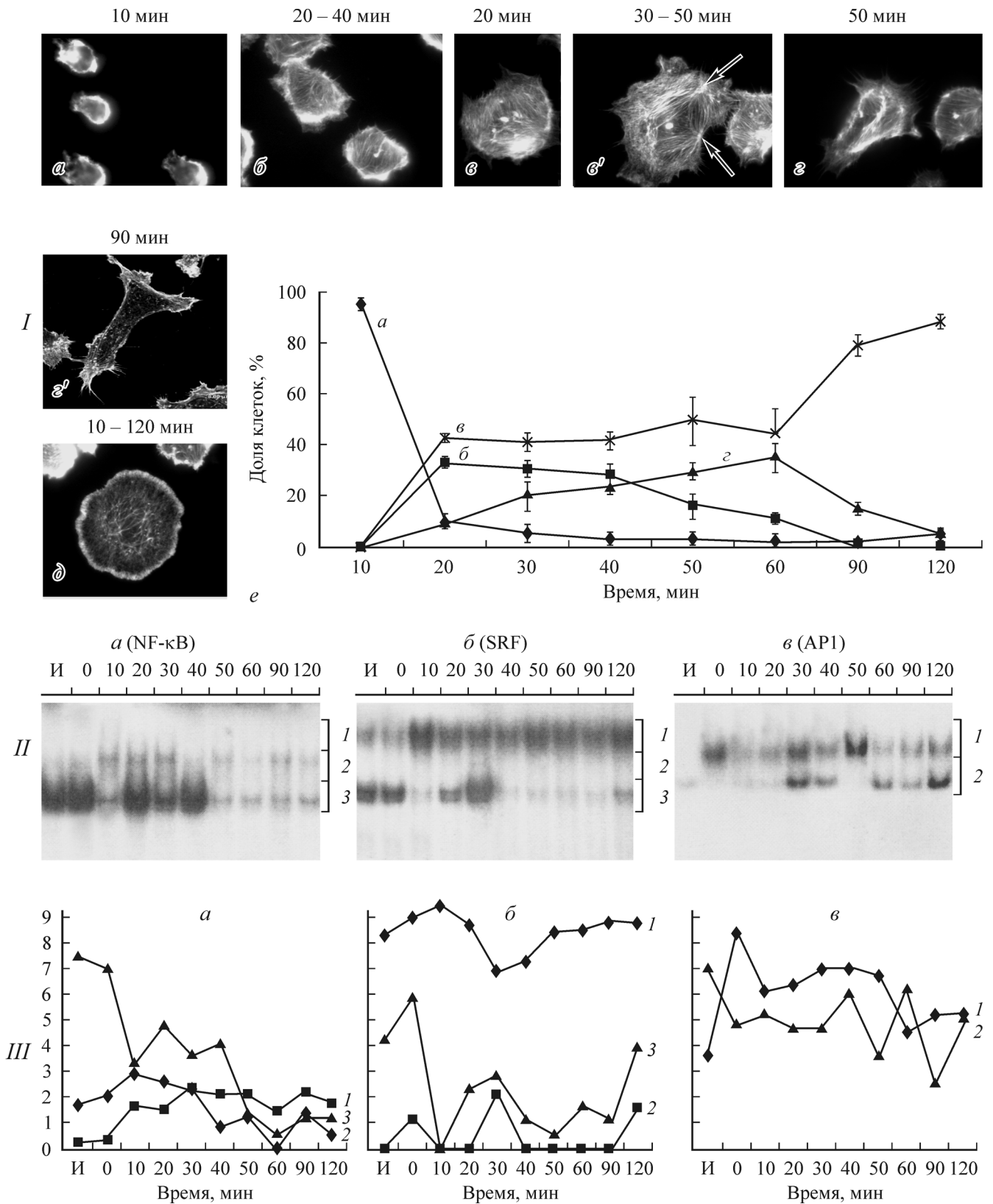


Рис. 3. Динамика актинового цитоскелета и ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов NF-κB, SRF и AP1 в процессе расплывания клеток на ламинине-2/4.

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

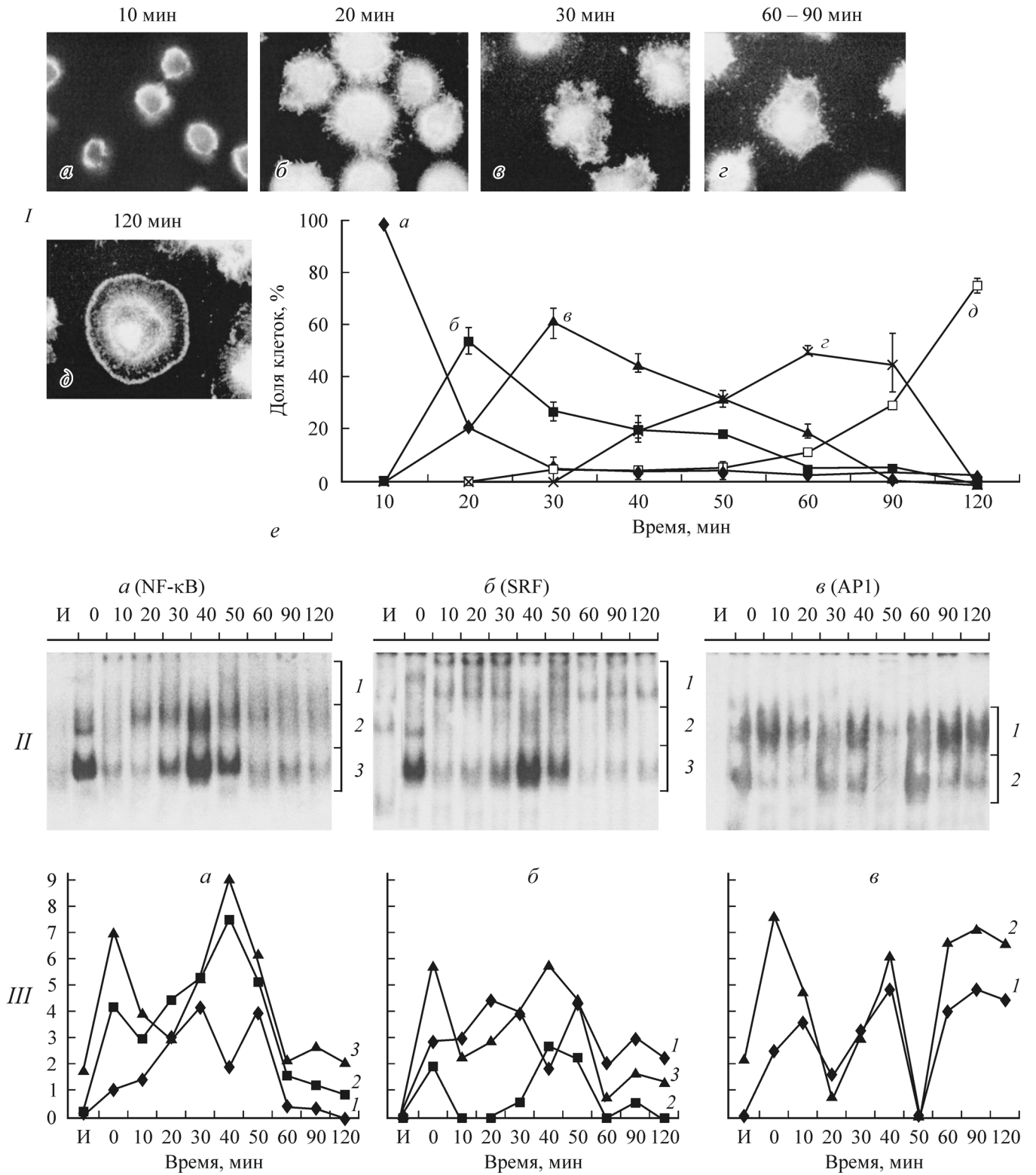


Рис. 4. Динамика актинового цитоскелета и ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов NF-κB, SRF и AP1 в процессе расплывания клеток на антителах 5A9 к рецептору ЭФР.

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

Обе стадии несформированного цитоскелета характеризуются снижением уровня ДНК-связывающей активности NF-κB. Общий ход ДНК-связывающей активности разных белковых комплексов NF-κB совпадает. Совпадает также и данные повторных опытов.

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 NF-κB (рис. 3, III, а). Но в отличие от NF-κB кривые уровней ДНК-связывающей активности комплекса 1 и комплексов 2 и 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 нестабильность начала изменений ДНК-связывания (период от 0 до 10 мин) обоих белковых комплексов. Имеется нестабильность 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 (см. таблицу).

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

Распластывание на антителах 5 A9 к рецептору ЭФР. Актиновый цитоскелет всех клеток через 10 мин после нанесения их на антитела 5A9 находится на стадии олигомеризации. Через 10 мин распластывания на антителах клетки явно менее распластаны, чем на фибронектине и 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. Структур актинового цитоскелета не видно, наблюдается 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 объем клетки (стадия центрообразования). Клетки с цитоскелетом на стадии центрообразования постепенно (через 60 мин) сменяются клетками, характеризующимися очень тонкой ламеллой. Эта ламелла очень тонкая и с трудом выявляется на препаратах (рис. 4, I, г) (стадия тонкой ламеллы). В это же время появляются клетки с наиболее развитой специфичной для распластывания на антителах организацией актинового цитоскелета (рис. 4, I, д). Максимум этих клеток приходится на 120-ю мин (стадия развитого цитоскелета). 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 пе-

риод 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, на стадии развитого цитоскелета — от 100 мин и далее.

Анализ ДНК-связывающей активности белковых комплексов, содержащих NF-κB (рис. 4, II, а), показывает, что ход активности всех трех комплексов совпадает. Исключением является временная точка 40 мин. На этом сроке наблюдаются обратные отношения хода активностей комплекса 1 и комплексов 2 и 3. В общем, период времен от 30 до 90 мин после нанесения клеток на лиганд оказывается периодом максимальной ДНК-связывающей активности NF-κB.

Так же как и на ламинине-2/4, ход кривых изменений ДНК-связывающей активности комплексов 2 и 3 SRF в общем повторяет ход изменений активности NF-κB. Активность комплекса 1 SRF изменяется к ним в противофазе (рис. 4, II, б).

ДНК-связывающая активность обоих белковых комплексов, содержащих AP1, в данном случае изменяется синхронно (рис. 4, II, в).

Сравнение изменений ДНК-связывающей активности NF-κB и SRF с ходом формирования актинового цитоскелета выявляет вероятную их согласованность. Первый пик ДНК-связывающей активности NF-κB 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 нестабильность начала изменений ДНК-связывания.

Таким образом, при распластывании клеток на антителах 5A9 к рецептору ЭФР согласованно со стадиями формирования актинового цитоскелета изменяется ДНК-связывающая активность NF-κB и SRF, а ДНК-связывающая активность AP1 изменяется со стадиями формирования в клетках актинового цитоскелета несогласованно.

Обсуждение

В процессе проведения настоящего исследования стало очевидно, что установить конкретную зависимость активации ТФ 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 ТФ параллельными, но независимыми путями. Количество посредников между актиновыми структурами и ТФ 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 организации цитоскелета на данной ступени его формирования. Следовательно, невозможно связать изменения в активации того или иного ТФ с появлением или исчезновением той или иной конкретной структуры актинового цитоскелета.

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

1. На каких стадиях формирования актинового цитоскелета при распластывании клеток активируются избранные ТФ? 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 преобладает определенный тип его пространственной организации, и активацией ТФ?

На самом первом этапе этих исследований было необходимо выявить определенные временные стадии формирования актинового цитоскелета.

Динамику организации актинового цитоскелета при распластывании клеток изучали и ранее, и были получены сходные с нашими результаты (Are et al., 2001). Но авторы не ставили перед собой задачи выявления временных интервалов последовательных ступеней формирования определенных типов цитоскелета, характерных для клеток, распластанных на различных иммобилизованных лигандах.

Для клеток, распластанных на всех исследуемых лигандах, были выделены стадии формирования актинового цитоскелета и определены их временные границы. Каждой стадии соответствует определенный тип пространственной организации актинового цитоскелета. Интересно, что если при распластывании на фибронектине и антителах стадии формирования актинового цитоскелета соответствуют клеткам определенного типа, то на ламинине один и тот же тип цитоскелета могут иметь клетки, различающиеся по форме. В этом случае актинового цитоскелета начинает формироваться раньше, чем в клетках, распластывающихся на фибронектине или антителах. Через 30—40 мин распластывания наблюдается уже хорошо выраженная сеть актиновых пучков, которые сходятся в «фокусы». Но к 1-му ч распластывания большинство клеток перестраивают такой тип цитоскелета и остается лишь сеть филаментов в ламеллах с одновременной поляризацией клеток, свидетельствующая о большой склонности клеток к движению на этой стадии. В клетках, распластанных на фибронектине, процессы реорганизации стабильных актиновых структур начинают проявляться только ко 2-му ч распластывания.

Рецептор ЭФР не используется клеткой в процессе адгезии, а полученные на него антитела 5A9 не индуцируют его тирозинкиназной активности (Сорокин и др., 1989). В связи с этим предполагалось использовать прикрепление и распластывание клеток на них в качестве контроля, когда адгезия приводит к формированию цитоскелета, но не запускает сигнальные процессы. Однако наши результаты показывают, что при распластывании клеток на антителах происходят и формирование характерного типа пространственной организации актинового цитоскелета, и активация ТФ. На антителах клетки дольше всего остаются на начальной стадии распластывания, позже всего формируют наиболее характерные для этого взаимодействия типы пространственной организации цитоскелета и, по всей видимости, адгезируют без первичного участия каких-либо сигнальных путей по крайней мере в течение 20 мин распластывания, когда наблюдается активация SRF. Через 30 мин распластывания формируются «фокусы», которые чем-то напоминают «фокусы» цитоскелета клеток на ламинине, тоже формирующиеся через 30 мин распластывания клеток.

Следует отметить, что через 30 мин распластывания клетка сама начинает синтезировать и секретировать собственные белки внеклеточного матрикса, с которыми также может взаимодействовать (Sobel, Rosenberg, 1984). Поэтому обнаруженные структуры («фокусы») могут быть результатом такого взаимодействия и соответственно дополнительным источником сигнала.

В общем, можно отметить, что наибольшая активность формообразования актинового цитоскелета наблюдается для всех случаев в пределах 20—40 мин от посадки клеток на лиганд.

При исследовании изменений ДНК-связывающей активности всех ТФ оказалось, что они не носят характера монотонного повышения активности или поддержания ее на одном уровне, а имеют несколько пиков активности. Частота возникновения пиков уменьшается по мере распластывания клеток в среднем в 1.5—2.0 раза для всех ТФ. Так, если время между ближайшими пиками в начале распластывания клеток составляет 15—25 мин, то через 1.0—1.5 ч распластывания — 40—50 мин.

Из исследуемых факторов колебательный процесс наблюдали ранее для NF-κB, активацию которого исследовали при стимуляции фактором некроза опухолей (TNFα) в нескольких клеточных линиях (Hoffmann 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 IκB β и ε, обнаружили пики активности NF-κB с периодом 1.5—2.0 ч, который тоже увеличивался по мере удаления от начала воздействия TNFα (Hoffmann et al., 2002). Примерно такой же по длительности цикл (100 мин) перемещения NF-κB из ядра в цитоплазму и обратно был обнаружен в нейробластомных клетках под действием TNFα в опытах других авторов (Nelson et al., 2004).

Выявленные в настоящей работе колебания активности NF-κB, SRF и AP1 не могут быть объяснены только лишь миграцией факторов из цитоплазмы в ядро и обратно. Так, SRF, например, имеет преимущественно ядерную локализацию (Ding et al., 2001). Вероятно, здесь могут играть роль быстрые конформационные перестройки его молекулы в результате фосфорилирования—дефосфорилирования или других подобных процессов. Причину и механизм колебаний предостойт еще 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, т. е. запуск экспрессии различных генов.

В этой связи показательно, что ДНК-связывающая активность белкового комплекса I SRF, который, по всей видимости, содержит кроме самого димера SRF еще один из белков Ets-семейства (p62^{TSF}, Elk или SAP-1), образуя тройной комплекс (Zinck et al., 1993), всегда про-

тивноположна 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-κB тоже имеет в определенные периоды распластывания клеток характерные отличия. 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.

Роль актинового цитоскелета может заключаться в поддержании в цитоплазме надмолекулярных комплексов, способствующих ингибированию NF-κB в одной структуре цитоскелета и активирующих NF-κB при изменении состава комплекса, связанного со сменой структуры. Предполагается, что в состав этих комплексов могут входить не только ингибиторные субъединицы IκB, но и другие регуляторные молекулы, как в сплайсосоме (Nabib et al., 2001), и актинсвязывающие белки (Бабаков и др., 2004).

При сопоставлении изменений морфологии и активации ТФ уровень ДНК-связывания для некоторых из них можно соотносить со стадиями формирования актинового цитоскелета. Наиболее четко с ними соотносится активность NF-κB. Обращает на себя внимание, что пики его активности приходятся на стадии формирования актинового цитоскелета, которые характеризуются наличием хорошо выраженных контактов при распластывании клеток на фибронектине. На ламине-2/4 и антителах аналогичным является наличие «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 того или иного пространственного типа организации цитоскелета, сколько от наличия или отсутствия растущей ламеллы с широкой сетью быстро перестраивающихся актиновых филаментов. Так, его активность наблюдается именно в фазы либо быстрого распластывания клеток, либо их поляризации в отличие от NF-κB, для активации которого характерны устойчивые состояния актинового цитоскелета. 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).

Нам не удалось выявить корреляции между динамикой ДНК-связывающей активности AP1 и сменой клеточных типов ни на одном из исследованных лигандов. По-видимому, к реорганизациям актинового цитоскелета активация AP1 не имеет отношения и здесь играют роль другие механизмы. Это может говорить о том, что актиновый цитоскелет не обязательно участвует в регуляции проведения любых сигналов от мембраны клетки к ее ядру.

Ясно, что формирование того или иного типа актинового цитоскелета, а также профиль активности того или иного ТФ зависят от лиганда, на котором распластываются клетки, и соответственно от образующихся сложных белковых комплексов адгезии. Для клеток, расплас-

танных на фибронектине, образование комплексов адгезии зависит от интегринов α5β1 (Genersch et al., 1996), а на ламинине — от интегриновых рецепторов α6β4 и α2β1 и от рецепторов с мол. массой 67 кДа (Черепанова и др., 2003). Причем оба интегриновых рецептора (α6β4 и α2β1) принимают участие в миграции клеток (Калмыкова и др., 2003).

По всей вероятности, именно ТФ первично реагируют на лиганд-рецепторное взаимодействие клетки, так как активируются, как правило, раньше, чем начинают формироваться сложные структуры цитоскелета. Наряду с этим пространственная организация актинового цитоскелета, несомненно, тоже может влиять на активность связанных с ним ТФ.

Использованные в работе иммобилизованные лиганды фибронектин, ламинин-2/4 и антитела 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 осуществляется не однократно, а имеет несколько этапов взаимодействия, когда могут происходить последовательно контакты с разными участками белковой молекулы. Кроме того, как отмечалось выше, рецептор ЭФР при взаимодействии со специфическим лигандом может взаимодействовать с другими поверхностными рецепторами.

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 с помощью выключения из взаимодействия с лигандом тех или иных поверхностных рецепторов, например, путем 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).

Таким образом, еще предстоит выяснить, каким образом обеспечиваются обнаруженные циклические изменения ДНК-связывающей активности ТФ, каков состав комплексов адгезии при распластывании на разных лигандах и как влияют изменения ДНК-связывающей активности на экспрессию регулируемых этими факторами генов.

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 С.-Петербургского научного центра РАН.

Список литературы

Бабаков В. Н., Бобков Д. Е., Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Подольская Е. П., Пинаев Г. П. 2004. α-Актинин-4 и р65-субъединица транскрипционного фактора NF-κB солокализуются и совместно мигрируют в ядро в клет-

- ках A431 под действием эпидермального фактора роста. Цитология. 46 (12) : 1064—1071.
- Калмыкова Н. В., Черепанова О. А., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2003. Стабилизирующая роль интегрин $\alpha 6 \beta 4$ в процессе миграции эпидермальных клеток на ламинине-2/4. Трансплантология. (Киев). 4 : 30—32.
- Марзлав У., Хуан Р. 1987. Транскрипция РНК в изолированных ядрах. В кн.: Транскрипция и трансляция. М.: Мир. 111—159.
- Петухова О. А., Туроверова Л. В., Емельянов А. Н., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2005. ДНК-связывающая активность транскрипционных факторов, взаимодействующих с последовательностями SRF, NF- κ B, и AP-1, индуцированная адгезией клеток A431, коррелирует с перестройками актинового цитоскелета. Цитология. 47 (2) : 175—183.
- Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2004. Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A431, распластанных на иммобилизованных лигандах. Цитология. 46 (1) : 5—15.
- Сорокин А. В., Нестеров А. М., Сорокин А. Д., Игнатов Т. Н., Галактионов К. И., Кудрявцева Н. В. 1989. Получение и характеристика моноклональных антител к наружному домену рецептора ЭФР эпидермоидной карциномы человека A431. Цитология. 31 (5) : 549—555.
- Черепанова О. А., Калмыкова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2003. Вклад интегриновых рецепторов $\beta 1$ - и $\beta 4$ -субъединицами и рецептора ламинина с молекулярной массой 67 кДа во взаимодействие клеток линии A431 с изоформами ламинина. Цитология. 45 (3) : 271—276.
- 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 кератицитов человека с изоформами ламинина. Цитология. 44 (2) : 151—152.
- Аре А. Ф., Галкин В. Е., Пospelova Т. В., Пинаев Г. П. 2000. The p65 of NF- κ B interacts with actin-containing structures. Exp. Cell Res. 256 : 533—544.
- Аре А., Пинаев Г., Бурова Е., Линдберг У. 2001. Attachment of A431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. Cell Motil. Cytoskeleton. 48 : 24—36.
- Clark E. A., Brugge J. S. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science. 268 : 233—239.
- 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.
- Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K. M. 2001. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2 : 793—805.
- 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.
- Gineitis D., Treisman R. 2001. Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. J. Biol. Chem. 276 : 24 531—24 539.
- 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 κ B (NF- κ B)-inducing kinase to activate NF- κ B. J. Biol. Chem. 276 : 8865—8874.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and actin cytoskeleton. Science. 279 : 509—514.
- Hoffmann A., Levchenko A., Scott M. L., Baltimore D. 2002. The I κ B — NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. Science. 298 : 1241—1245.
- Hynes R. O. 1999. Cell adhesion: old and new questions. Trends Cell Biol. 9 : M33—M37.
- Ingram A. J., James L., Cai L., Ly H., Scholey J. W. 2000. NO inhibits stretch-induced MAPK activity by cytoskeletal disruption. J. Biol. Chem. 275 : 40 301—40 306.
- Kingston R. E. 1990. DNA-protein interactions. In: Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons. 12.0.1—12.2.10.
- 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.
- 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- κ B signaling control the dynamics of gene expression. Science. 306 : 704—708.
- Puck T. T., Krystosek A. 1992. Role of the cytoskeleton in genome regulation and cancer. Int. Rev. Cytol. 132 : 75—108.
- Qwarnstrom E., Ostberg C., Turk G., Richardson C., Bomszyk K. 1994. Fibronectin attachment activates the NF- κ B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 269 : 30 745—30 768.
- Schoenwaelder S. M., Burridge K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. Curr. Opin. Cell Biol. 11 : 274—286.
- Schratt G., Philippar U., Berger J., Schwarz 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.
- 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.
- Small J. V., Rottner K., Kaverina I. 1999. Functional design in the actin cytoskeleton. Curr. Opin. Cell Biol. 11 : 54—60.
- Sobel S., Rosenberg M. D. 1984. Characterization of cellular attachment and spreading molecules at liquid—liquid interfaces. Analyt. Biochem. 140 : 486—489.
- Ting A. Y., Endy D. 2002. Decoding NF- κ B signaling. Science. 298 : 1189—1190.
- Van Aelst L., S'Souza-Schorey C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. Genes Develop. 11 : 2295—2322.
- Yamada K. M., Geiger B. 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. Curr. Opin. Cell Biol. 9 : 76—85.
- Zhu P., Xiong W., Rodgers G., Qwarnstrom E. 1998. Regulation of interleukin 1 signalling through integrin binding and actin reorganization: disparate effects on NF- κ B and stress kinase pathways. Biochem. J. 330 : 975—981.
- 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.

DYNAMIC OF DNA-BINDING ACTIVITY OF TRANSCRIPTION FACTORS IN A431 CELLS
DURING THEIR SPREADING ON IMMOBILIZED LIGANDS*A. N. Emelyanov, O. A. Petukhova,¹ L. V. Turoverova, I. V. Kropacheva, G. P. Pinaev*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: olvial@mail.cytspb.rssi.ru

Dynamics of actin cytoskeleton in A431 cells and specific NF- κ B SRF and AP-1 DNA-binding activities were studied during a 2 h spreading of these cells on fibronectin, laminin-2/4 or an antibody to epidermal growth factor receptor. Cell spreading was shown to be accompanied by sequential formation of actin cytoskeleton structures, whose spatial organization depends on the type of immobilized ligand. We have determined the time intervals, within which certain forms of cytoskeleton do not change qualitatively and are specific for dominant part of cell population. It has been shown that DNA-binding activities of the above transcription factors studied oscillate during cell spreading. The cycles of DNA-binding activity were found to be equal to 15—40 min. The character of oscillations depends on both transcription factor and ligand type. The temporal comparison of processes of actin cytoskeleton formation and DNA-binding activity of NF- κ B and SRF times suggest that actin cytoskeleton reorganization may be presumably associated with activation of NF- κ B and SRF.

Key words: transcription factors, adhesion, extracellular matrix, actin dynamics.
