

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ СУБКЛЕТОЧНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ α -АКТИНИНА 1 И α -АКТИНИНА 4 В КЛЕТКАХ А431

© А. В. Большакова,¹ О. А. Петухова,¹ Г. П. Пинаев,¹ К.-Е. Магнуссон²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Университет г. Линчепинг, Швеция;
¹ электронный адрес: asyab@mail.ru

α -Актинин 1 и α -актинин 4 являются актинсвязывающими белками, которые кроме выполнения структурной функции могут принимать участие в регуляции различных процессов в клетке. На основании ранее полученных данных о разном характере распределения этих белков в ядре и цитоплазме в настоящей работе было детально исследовано присутствие α -актинина 1 и α -актинина 4 в субклеточных фракциях клеток А431, распластанных на фибронектине. Показано, что выявление α -актининов в той или иной фракции зависит от способа лизиса и от того, применяли ли предварительное низкотемпературное замораживание клеток. Использование различных методов фракционирования позволило сделать вывод о том, что α -актинин 4 присутствует во всех цитоплазматических и субъядерных фракциях, а α -актинин 1 помимо цитоплазмы может выявляться во фракции ядерной мембраны.

Ключевые слова: α -актинин 1, α -актинин 4, субклеточное фракционирование.

Актиновый цитоскелет участвует в поддержании клеточной формы, миграции клеток, эндо- и экзоцитозе и обеспечивает контакт клеток с субстратом и межклеточные контакты (Bershadsky, Vasiliev, 1988; Papakonstanti et al., 2000). В последнее время появились работы, подтверждающие участие цитоскелета в передаче сигналов с поверхности клеток в ядро и регуляции экспрессии генов (Schmidt, Hall, 1998; Fazal et al., 2007).

Различные функции и пространственная организация актинового цитоскелета осуществляются при участии определенных актинсвязывающих белков, которые необходимы для образования сети актиновых структур. Эти белки выполняют не только структурные функции, но и способны принимать участие в регуляции сигнальных каскадов, поскольку они могут взаимодействовать с сигнальными молекулами (Bennerah et al., 2003; Vatcelor et al., 2004). Одним из таких актинсвязывающих белков является α -актинин (Otey, Capren, 2004). К семейству α -актининов принадлежат 4 белка с мол. массой около 103—104 кДа, которые описаны впервые как актинсвязывающие белки: две изоформы немышечные (1 и 4) и две мышечные (2 и 3). α -Актинины 1 и 4 имеют высокую степень гомологии (около 86 % аминокислотной последовательности) (Honda et al., 1998). α -Актинин присутствует во многих субклеточных компартментах, включая межклеточные контакты и контакты клеток с матриксом, ламеллоподии и стресс-фибриллы. По-видимому, изоформы α -актининов выполняют в клетках различные функции. α -Актинин 1 экспрессируется во многих немышечных клетках в большем количестве по сравнению с α -актинином 4. Одной из отличительных особенностей α -актинина 4 является его способность транслоцироваться в ядро и взаимодействовать с факторами транскрипции (Poch et al., 2004; Coffart et al., 2006).

В наших работах были получены данные, позволяющие предположить, что α -актинин 4 может принимать участие в процессе транслокации транскрипционного фактора NF- κ B и, возможно, его активации. Так, α -актинин 4 в отличие от α -актинина 1 обнаруживался в иммунопреципитатах, осаждающихся антителами к субъединице p65 фактора NF- κ B в цитоплазматических и ядерных комплексах. Колокализация RelA/p65 и α -актининов 1 и 4, а также различия в распределении α -актинина 1 и α -актинина 4 в клетках А431 были выявлены иммунофлуоресцентным методом (Babakov et al., 2008).

Помимо общих областей локализации для обеих изоформ α -актинина вдоль стресс-фибрилл существуют специфические зоны для каждой изоформы: для α -актинина 4 — ядро и концы стресс-фибрилл в области фокальных контактов, для α -актинина 1 — перинуклеарная область (Bolshakova et al., 2007).

Вестерн-блот-анализ выявил в цитоплазматической фракции помимо полноразмерных α -актининов 1 и 4 с мол. массой около 100 кДа фрагменты с мол. массой около 75 кДа. α -Актинин 1 в большинстве экспериментов не обнаруживался в ядре (Bolshakova et al., 2007; Babakov et al., 2008), хотя в отдельных случаях он выявлялся в ядерных фракциях. Мы относили эти результаты к загрязнению ядерной фракции белками цитоплазмы, поскольку эти белки принадлежат к белкам цитоскелета — той субклеточной фракции, которая может быть выделена вместе с ядерными белками. Однако неоднократно воспроизводимые результаты иммунофлуоресцентного анализа, демонстрирующего локализацию α -актинина 1 в околоядерной области, показали необходимость проведения дополнительных исследований по определению положения изоформ α -актинина и его фрагментов в клетке.

Биохимические данные, приведенные выше, получены с использованием метода, в котором клетки были предварительно заморожены.

В литературе описано несколько подходов к получению клеточных фракций, и некоторые из них предполагают применение предварительного низкотемпературного ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) замораживания клеток (Петухова и др., 2005), для того чтобы избежать перемещения молекул между субклеточными фракциями в процессе выделения. Однако существует ряд методов, которые не предполагают предварительного замораживания, используются также разные способы для получения ядерной и цитоплазматической фракций. Поэтому было необходимо выяснить, влияет ли замораживание, а также способ субклеточного фракционирования и состав лизирующего буфера на результаты выявления анализируемых белков в той или иной фракции.

В настоящей работе проведено фракционирование клеток несколькими способами, в том числе с использованием соответствующего коммерческого набора.

Материал и методика

Клетки эпидермоидной карциномы линии A431 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 . Клетки снимали смесью 0.25%-ного трипсина и 0.02%-ного ЭДТА. Суспензию клеток в среде ДМЕМ ($1.25 \cdot 10^6$ кл./мл) наносили на гидрофобные чашки Петри (90 мм) или (100 мкл при концентрации $1 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^5$ кл./мл) на силиконизированные покровные стекла, покрытые фибронектином в концентрации 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO_2 . Клетки промывали раствором PBS и либо замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, либо подвергали лизису, не замораживая.

Иммунофлуоресценция. Клетки, посаженные на покровные стекла, фиксировали в течение 10 мин 3.7%-ным раствором параформальдегида на PBS, а затем пермеабелизовали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 15 мин с последующей 4-кратной промывкой PBS. Препараты инкубировали с первыми и вторыми антителами (40 мин) с трехкратной промывкой PBS после каждой инкубации. Затем клетки обрабатывали родамин-фаллоидином (Molecular Probes, США) для выявления актинового цитоскелета. Окраску ядер проводили с помощью Торго-3 (Molecular Probes, США).

Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL. Для возбуждения флуоресценции использовали аргонный лазер с длиной волны 488 нм для вторых антител Alexa 488 и HeNe-лазер с длиной волны 543 нм для родамин-фаллоидина и HeNe-лазер с длиной волны 633 нм для Торго-3. Целостность ядер после лизиса клеток оценивали с помощью микроскопа Axioscope после окраски DAPI (1 мг/мл в разведении 1 : 5000; Sigma, США), используя объектив 100 \times .

В работе использовали следующие антитела: поликлональные антитела к N-терминальному полипептиду α -актина 4 в разведениях 1 : 300 для иммунофлуоресценции и 1 : 1000 для иммуноблотинга (ImmunoGlobe, Германия); моноклональные антитела к α -актину 1 в разведениях 1 : 300 для иммунофлуоресценции и 1 : 1000 для иммуноблотинга (Sigma, США). Для визуализации

ядер использовали Торго-3 в разведении 1 : 1000 (Molecular Probes, США), для актинового цитоскелета — родамин-фаллоидин (Molecular Probes, США). Для иммунофлуоресценции использовали вторичные антитела AlexaFluor 488, для иммуноблотинга — антикроличьи и антимышьиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Dako, Дания).

Способ 1. Получение фракций из предварительно замороженных клеток. Замороженные клетки на чашках лизировали в буфере 1, содержащем 0.32 М сахарозы, 2 мМ MgCl_2 , 0.1 мМ ЭДТА, 0.1 % Тритона X-100, 10 мМ Трис- HCl , pH 8.0, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Германия). Клетки снимали скрэпером и гомогенизировали, пропуская последовательно через иглы 21G (15 раз) и 27G (3 раза). Ядра осаждали при 2000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, содержащую цитоплазматическую фракцию, замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ядра очищали центрифугированием в 0.5 М сахарозе 10 мин при 10 000 об/мин (Марзлав, Хуан, 1987). Ядерные фракции, содержащие транскрипционные факторы (фракция 0.4 М NaCl), экстрагировали при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 40 мин буфером, содержащим 400 мМ NaCl , 20 мМ HEPES, pH 7.9, 25 % глицерина, 1.5 мМ MgCl_2 , 0.4 мМ ЭДТА, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ и 2 мМ Na_3VO_4 , и центрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин. Осадок содержал белки, условно названные «прочно связанные с хроматином». Концентрацию белков в ядерных и цитоплазматических экстрактах определяли по методу Бредфорд (Bredford, 1976). Выделенные белки хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Способ 2. Получение фракций из клеток без предварительного замораживания. Клетки лизировали в буфере 3, содержащем 0.32 М сахарозы, 2 мМ MgCl_2 , 0.1 мМ ЭДТА, 0.05 % Тритона X-100, 10 мМ Трис- HCl , pH 8.0, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Германия). Буфер 3 отличается от буфера 1 только содержанием Тритона X-100. Дальнейшее выделение — см. способ 1 (Марзлав, Хуан, 1987).

Способ 3. Ядерное фракционирование с использованием буфера 4 для лизиса клеток (Dwyer, Blobel, 1976). Буфер содержал 250 мМ сахарозы, 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ ЭДТА, 25 мМ Трис- HCl , pH 7.2, 1 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF, 1 мМ Na_3VO_4 и коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Германия) (Blobel, Potter, 1966; Бабаков и др., 2004). Гомогенизацию клеток проводили с помощью игл 21G (15 раз) и 27G (3 раза). Ядра осаждали при 2000 g в течение 10 мин и очищали центрифугированием в 0.5 М сахарозе в течение 10 мин при 10 000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 0.1 мМ MgCl_2 с последующим добавлением ДНКазы I (1 мг/мл), 10 % сахарозы, 10 мМ триэтаноламина, pH 8.5, и 0.1 мМ MgCl_2 и инкубировали 20 мин при $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Центрифугировали в 30%-ной сахарозе 10 мин при 18 000 g и $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Надосадочная жидкость содержала белки нуклеоплазмы (D_1S). Осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 10 % сахарозы, 10 мМ триэтаноламина, pH 7.5, 0.1 мМ MgCl_2 и ДНКазу I (1 мг/мл), и инкубировали 20 мин при $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Центрифугировали в 30%-ной сахарозе 10 мин при 18 000 g и $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Осадок затем ресуспендировали в растворе, содержащем 10 % сахарозы, 10 мМ триэтаноламина, pH 7.5, 0.1 мМ MgCl_2 и 2 % Тритона X-100, инкубировали 10 мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и центрифугировали 10 мин при 18 000 g и $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Надосадочная жидкость содержала Тритон-растворимые белки ядерной оболочки (D_2TS). Осадок ресуспендировали буфером, со-

державшим 10 % сахарозы, 10 мМ триэтанолamina, pH 7.5, 0.1 мМ MgCl₂ и 2 % Тритона X-100, далее добавляли 2 М NaCl, 100 мМ триэтанолamina, pH 7.5. После 10-минутной инкубации смесь центрифугировали 10 мин при 18 000 г и 4 °С. Надосадочная жидкость содержала белки, экстрагируемые высокими концентрациями солей (D₂TSs), а осадок — белки комплекса ядерной ламина (D₂TSp).

Способ 4. Для фракционирования с помощью коммерческого набора (Qiagen, Германия) с получением фракций несвязанных цитоплазматических белков, мембранных белков, белков, связанных с цитоскелетом, и белков ядерной ламина использовали протокол фирмы-производителя.

Иммуноблоттинг белковых экстрактов клеток (Towbin et al., 1979). Белки разделяли в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS в Трис-глициновом буфере, pH 8.3, при 100 В (Laemmli, 1970). После разделения белки переносили на мембрану PVDF в Трис-глициновом буфере, содержащем 20 % метанола и 0.1 % SDS, с помощью установки для переноса (BioRad, США) (Trans-blot SD Semy-dry transfer cell). После переноса мембрану промывали 20 мин раствором TBS-T (20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 100 мМ NaCl и 0.1 % Tween 20) с последующим блокированием 5%-ным обезжиренным сухим молоком, разведенным на TBS-T. Для усиления сигнала на иммуноблоттинге использовали систему хемилюминесценции ECL с использованием субстратов люминола (1.25 мМ) и паракумаровой кислоты (0.2 мМ), 0.01 % H₂O₂ в 150 мМ Трис-HCl, pH 8.8. Хемилюминесцентное излучение регистрировали с помощью рентгеновской пленки Kodak X-Omat K Film.

Результаты

Иммунофлуоресцентный анализ распределения изоформ α-актина. Ранее в наших работах было показано, что α-актинин 4 локализуется вдоль

стресс-фибрилл, может распределяться в ядре и диффузно по всей клетке. α-Актинин 1, так же как α-актинин 4, колокализуется со стресс-фибриллами, обнаруживается диффузно распределенным по клетке, но в отличие от α-актина 4 имеет области локализации в перинуклеарной области, но не в ядре. В настоящей работе для уточнения локализации α-актининов в ядре и в области ядра было проведено тройное окрашивание фиксированных клеток: на актин — родамин-фаллоидином (красный), на α-актинины — Alexa 488 (зеленый), на ядра — Торг-3 (условный цвет синий) (рис. 1). Была подтверждена локализация α-актина 4 в ядре и α-актина 1 в околоядерной области.

Принимая во внимание результаты иммунофлуоресцентного анализа, решили использовать биохимические методы для выявления данных белков в субклеточных фракциях. Для этого использовали разные методы фракционирования.

Оценка целостности ядер после клеточного лизиса. В используемых нами методах субклеточного фракционирования первым этапом является получение ядерной и цитоплазматической фракций, поэтому важно было убедиться в том, что, с одной стороны, действительно происходит полный лизис клеток, а с другой стороны, что ядро клеток в процессе лизиса не разрушается. В каждом эксперименте контролировали степень лизиса клеток и целостность ядер после окрашивания DAPI и с помощью световой микроскопии.

Было исследовано влияние состава трех буферных растворов для лизиса клеток в присутствии ингибиторов протеаз: 1) сахарозный буфер, содержащий 0.1 % Тритона X-100; 2) сахарозный буфер, не содержащий Тритона X-100; 3) сахарозный буфер, содержащий 0.05 % Тритона X-100. При использовании буфера 1 (0.1 % Тритона X-100) для лизиса предварительно замороженных клеток наблюдали разрушение клеток при сохранении целостности ядер. При использовании буфера 2 (без Тритона X-100) для предварительно замороженных клеток более

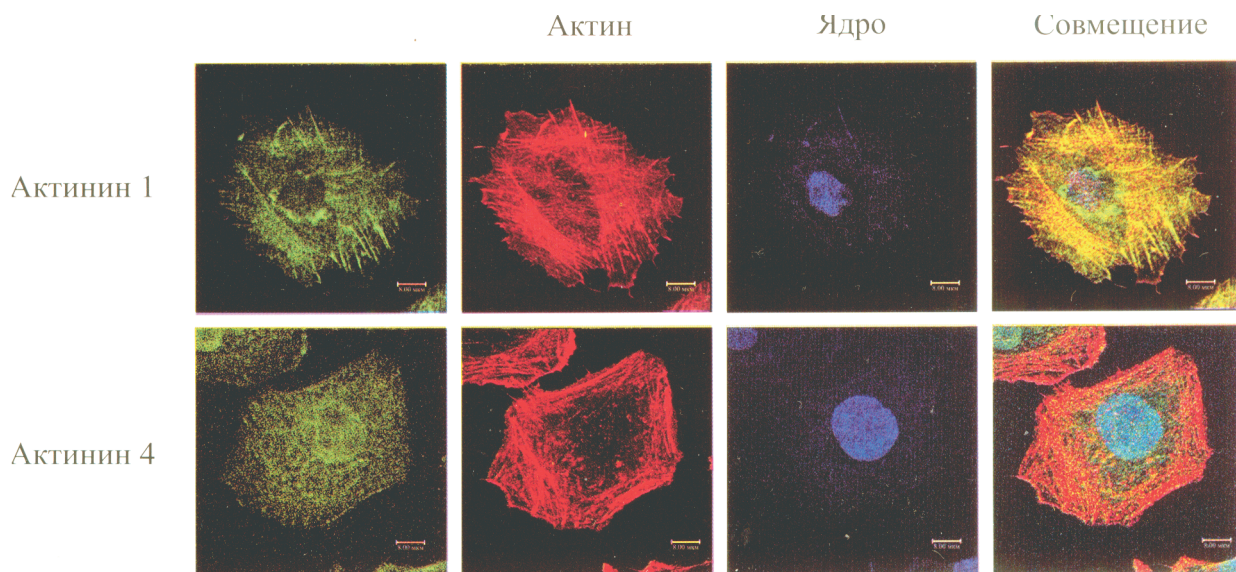


Рис. 1. Локализация α-актина 1 и α-актина 4 в клетках A431, распластанных на фибронектине в течение 1 ч.

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки снимали смесью трипсина и версена (3 : 7), промывали ДМЕМ 2 раза и затем наносили на стекла, покрытые фибронектином. После фиксации и пермеабилзации клетки окрашивали с помощью поликлональных антител к α-актину 4 с последующей окраской вторыми антителами, конъюгированными с Alexa 488 (зеленый), или моноклональными антителами к α-актину 1 и вторыми антителами, конъюгированными с Alexa 488 (зеленый). Актин окрашивали с помощью родамин-фаллоидина (красный), ядра — Торг-3 (синий). Об. 64×.

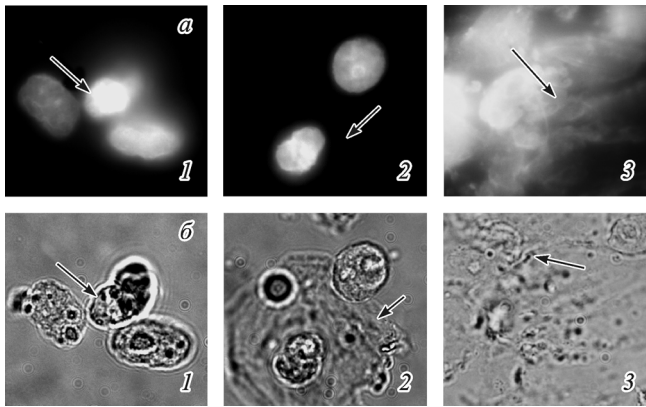


Рис. 2. Характеристика степени лизиса клеток и целостности ядер при использовании разных лизирующих буферных растворов.

Предварительно замороженные клетки, 0.1 % Тритона X-100 (1а, 1б) или отсутствие Тритона X-100 (2а, 2б). Клетки без предварительного замораживания, 0.1 % Тритона X-100 (3а, 3б). а — окраска DAPI. б — микрофотография в проходящем свете; об. 100×. Стрелками указаны неразрушенное ядро (1а, 1б), неразрушенная клетка (2а, 2б) и разрушенное ядро (3а, 3б).

чем в 50 % случаев не наблюдали лизиса клеток. На рис. 2 приведены примеры неповрежденного ядра после лизиса клеток (рис. 2, 1а, 1б), интактной (нелизированной) клетки (рис. 2, 2б) и пример не только разрушения клетки, но и ядра (рис. 2, 3а, 3б).

Когда для лизиса клеток без предварительного замораживания применяли буфер 1, наблюдали не только полный лизис клеток, но и разрушение ядер (рис. 2, 3а, 3б). Поэтому использовали буфер 2 и буфер 3. В этих случаях мы добились того, что происходил лизис клеток при сохранении целостности ядер (рис. 2, 1а, 1б). В дальнейших экспериментах мы остановились на буфере 3 для лизиса клеток без предварительного замораживания, чтобы как можно меньше изменить состав буфера.

Таким образом, предварительно замороженные клетки лизировали буфером, содержащим 0.1 % Тритона, а клетки без предварительного замораживания лизировали буфером, содержащим 0.05 % Тритона X-100, для того чтобы целостность ядер сохранялась, а клетки при этом разрушались.

Поскольку для лизиса предварительно замороженных клеток и клеток без предварительного замораживания использовали разные условия, необходимо было выяснить, можно ли получить идентичные результаты при выявлении изоформ α -актина в разных фракциях при использовании разных подходов субклеточного фракционирования.

На первом этапе анализировали цитоплазматическую и две ядерных фракции, исследовали ядерную фракцию 0.4 М NaCl, обогащенную транскрипционными факторами, и ядерную фракцию белков, прочно связанных с хроматином, для того чтобы проверить предположение о влиянии метода фракционирования на выявление α -актининов в субклеточных фракциях. Поскольку один из методов предполагает предварительное замораживание клеток, было необходимо проанализировать влияние замораживания на полученные результаты.

Изоформы α -актина из предварительно замороженных клеток и клеток без предварительного замораживания. Анализ цитоплазматической фракции показал, что состав α -актининов в ней не

зависел от процедуры предварительного замораживания и содержания Тритона X-100 (0.1 % или 0.05 %) в лизирующем буфере. Полноразмерные α -актинины 1 и 4 и их фрагменты с мол. массой ~75 кДа выявлялись в цитоплазме как предварительно замороженных, так и незамороженных клеток (рис. 3, а).

В отличие от цитоплазматической фракции результаты обнаружения α -актининов в ядерных фракциях были неодинаковы в предварительно замороженных клетках и в клетках без предварительного замораживания.

Вестерн-блот-анализ ядерной фракции, экстрагируемой 0.4 М NaCl, и фракции белков, прочно связанных с хроматином, при фракционировании предварительно замороженных клеток, лизированных буфером 1 (0.1 % Тритона X-100), не обнаружил α -актина 1 ни в одной из ядерных фракций (рис. 3, б, в), тогда как фракционирование клеток без предварительного замораживания, лизированных буфером 3 (0.05 % Тритона X-100), показало, что α -актинин 1 выявлялся в обоих описанных выше ядерных фракциях, в которых он был представлен преимущественно фрагментом ~65 кДа, а во фракции белков, прочно связанных с хроматином, еще и фрагментом ~37 кДа. Полноразмерный α -актинин 1 в этом случае в ядре был представлен в незначительных количествах (рис. 3, б, в).

В предварительно замороженных клетках во фракции белков, прочно связанных с хроматином, помимо полноразмерного α -актина 4 обнаруживался фрагмент ~65 кДа (рис. 3, в). В ядерной фракции, экстрагируемой 0.4 М NaCl, обогащенной факторами транскрипции, α -актинин 4 выявлялся в незначительных количествах (рис. 3, б). В отличие от предварительно замороженных клеток в случае лизиса клеток без их предварительного замораживания в ядерной фракции, экстрагируемой 0.4 М NaCl, α -актинин 4 выявлялся в значительных количествах как в полноразмерном виде, так и фрагментом ~65 кДа. Кроме того, во фракции прочно связанных с хроматином белков помимо фрагмента ~65 кДа выявлялся еще и фрагмент ~37 кДа (рис. 3, б, в). Таким образом, выявление α -актининов в ядерных фракциях зависит от применения предварительного замораживания клеток.

Дополнительное фракционирование ядер. Поскольку α -актинин 4 обнаруживался в ядерной фракции белков, которые не экстрагировались 0.4 М NaCl и, вероятно, имели более прочные связи с ядерными струк-

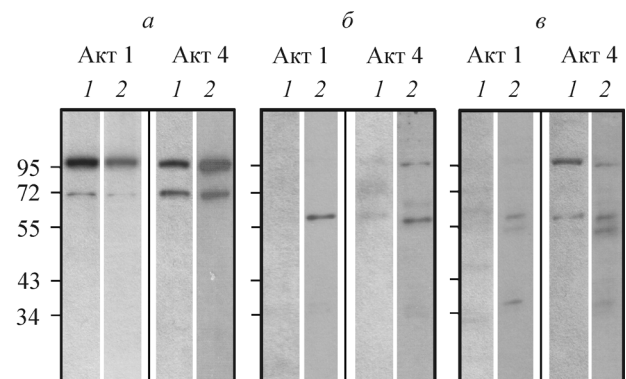


Рис. 3. α -Актинин 1 (Акт1) и α -актинин 4 (Акт4) в субклеточных фракциях: цитоплазматической (а), ядерной (б) и фракции белков, прочно связанных с хроматином (в).

Вестерн-блот с антителами к α -актинам. Дорожки: 1 — предварительно замороженные клетки, 2 — клетки без предварительного замораживания. Цифры слева — маркеры молекулярных масс кДа.

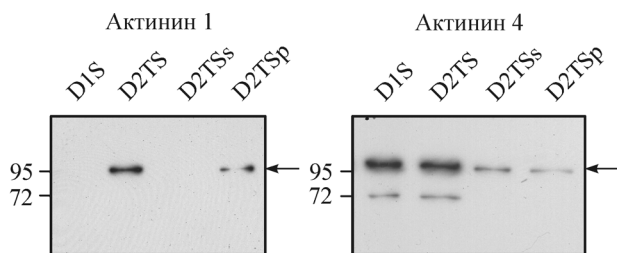


Рис. 4. α -Актинин 1 и α -актинин 4 во внутриядерных фракциях: D1S (нуклеоплазме), D2TS (Тритон-растворимой фракции белков ядерной оболочки), D2TSs (фракции белков, экстрагируемых высокими концентрациями солей) и D2TSp (фракции белков комплекса ядерной ламини).

Вестерн-блот-анализ с антителами к α -актинам. Цифры слева — маркеры молекулярных масс, кДа; стрелкой указаны полноразмерные α -актинины.

турами и хроматином, а α -актинин 1 выявлялся при одном из способов фракционирования в ядре, была предпринята попытка дополнительного фракционирования ядер (Dwyer, Blobel, 1976). В цитируемой методике очищенные ядра подвергали экстракции различными буферами, в том числе содержащими Тритон X-100. Поэтому лизис клеток без предварительного замораживания проводили буфером, не содержащим Тритона X-100, чтобы предотвратить экстракцию белков, чувствительных к содержанию Тритона, таких как мембранные белки. Напомним, что в этом случае происходил полный лизис клеток при сохранении целостности ядер.

Внутриядерные фракции выделяли путем последовательных экстракций различными буферами (см. раздел «Материал и методика»): D₁S — белки нуклеоплазмы, D₂TS — Тритон-растворимые белки ядерной оболочки, D₂TSs — белки, экстрагируемые высокими концентрациями солей, D₂TSp — белки комплекса ядерной ламини. В этом случае полноразмерный α -актинин 1 обнаруживался в двух ядерных фракциях — фракции Тритон-растворимых белков ядерной оболочки и фракции белков ядерной ламини — и отсутствовал в белках нуклеоплазмы (рис. 4). Полноразмерный α -актинин 4 выявлялся во всех субъядерных фракциях. Кроме того, помимо полноразмерного α -актинина 4, во фракции нуклеоплазмы и Тритон-растворимых белков ядерной оболочки обнаруживался фрагмент ~75 кДа (рис. 4). Таким образом, и в этом

случае фракционирования α -актинин 1 выявлялся в ядерных фракциях, а именно во фракциях, связанных с ядерной мембраной.

Суммируя вышеприведенные результаты, можно сказать, что α -актинин 1 может обнаруживаться в ядерных фракциях при выделении ядер из клеток без предварительного замораживания. Причем полноразмерный α -актинин 1 обнаруживался в двух ядерных фракциях, связанных с ядерной мембраной и белками ядерной ламини, фрагмент ~65 кДа — во фракции, экстрагируемой 0.4 M NaCl, и во фракции прочно связанных с хроматином белков, а фрагмент ~37 кДа — только во фракции прочно связанных с хроматином белков. α -Актинин 4 выявлялся во всех субклеточных фракциях при различных способах выделения. Процесс замораживания сказывался на доле полноразмерного α -актинина 4 во фракции белков, экстрагируемых 0.4 M NaCl.

С целью сравнения результатов, полученных нами при использовании разных буферных растворов, с данными, полученными с помощью коммерческих наборов, было проведено фракционирование клеток с помощью набора фирмы Qiagen (Германия). Фракции свободных белков цитоплазмы, мембранных белков, ядерных белков (в том числе комплекса ламини) и белков цитоскелета анализировали Вестерн-блот-анализом.

Субклеточное фракционирование с помощью коммерческого набора проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Клетки не замораживали, а сразу через 1 ч распластывания на фибронектине начинали последовательное получение фракций, описанных выше. Полноразмерный α -актинин 1 был обнаружен во всех субклеточных фракциях, в том числе в ядерной. Фрагмент ~75 кДа выявлялся в двух фракциях — свободных цитоплазматических и мембранных белков (рис. 5). В отличие от α -актинина 1 как полноразмерный α -актинин 4, так и его фрагмент ~75 кДа были обнаружены во всех фракциях. Кроме того, фрагмент ~65 кДа выявлялся во фракции свободных цитоплазматических мембранных и ядерных белков. В ядерной фракции обнаружили также фрагмент ~55 кДа (рис. 5).

Таким образом, с использованием нескольких методов фракционирования полноразмерный α -актинин 1 мы обнаружили во фракции ядерных белков, включающих в себя ядерную оболочку и ядерную ламину. Как полноразмерный α -актинин 4, так и его фрагменты можно выявить во всех субклеточных и субъядерных фракциях.

Обсуждение

Работа посвящается выяснению различий в распределении изоформ актинина в клетках эпидермоидной карциномы A431. Основной вывод работы заключается в том, что выявление α -актининов в той или иной субклеточной фракции зависело от изменения таких параметров при получении фракций, как состав лизирующего буфера и применение предварительного замораживания. Дискуссионным вопросом является обнаружение α -актинина 1 в ядре, поскольку в предыдущих работах лаборатории и в литературе другими авторами α -актинин 1 в ядре не выявлялся (Honda et al., 1998; Бабаков и др., 2004).

Работа основана на ранее полученных результатах иммунофлуоресцентного анализа. Было показано, что обе изоформы α -актинина в клетках, распластанных на фиб-

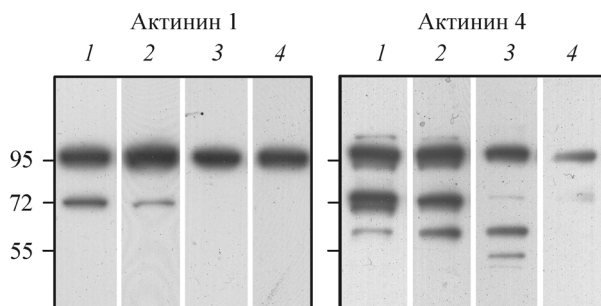


Рис. 5. α -Актинин 1 и α -актинин 4 в субклеточных фракциях: свободной цитоплазматической (1), мембранной (2), ядерной фракции, в том числе комплекса ядерной ламини (3), цитоскелетной (4).

Вестерн-блот с антителами к α -актинам. Фракционирование проводили с помощью коммерческого набора фирмы Qiagen (Германия). Цифры слева — маркеры молекулярных масс, кДа.

ронектине, колокализуются со стресс-фибриллами, обнаруживаются в ламелле и диффузно распределяются по цитоплазме клеток. Особенностью α -актинина 1 является его локализация в околядерной области, а α -актинина 4 — локализация в ядре и более плотная на концах стресс-фибрилл. Наши данные о цитоплазматической локализации отличаются от данных другой работы, в которой впервые была описана немышечная изоформа α -актинина 4 в фибробластах эндометрия матки (Honda et al., 1998). В ней α -актинин 4 в отличие от α -актинина 1 не обнаруживался на концах стресс-фибрилл в области фокальной адгезии. Такое несоответствие между данными этой работы и нашей может быть связано с особым характером распределения α -актининов в клетках эпителиального ряда. Другой причиной может служить влияние адгезии, приводящее к перераспределению актинина 4 в области фокальных контактов, поскольку клетки A431, распластавшие на фибронектине, характеризуются появлением стресс-фибрилл, заканчивающихся фокальными контактами у большинства клеток (Aye et al., 2001; Петухова и др., 2004).

Сложность в анализе распределения α -актининов заключается в том, что они принадлежат к белкам цитоскелета и в некоторых случаях при выделении цитоскелетная фракция может загрязнять ядерную фракцию. Вопрос о разделении цитоплазматических белков, в том числе белков цитоскелета, и ядерных белков неоднократно обсуждался в литературе (Fey et al., 1984; Chiang et al., 2000; Pederson, Aebi, 2002; Blessing et al., 2004). Широко представлены работы с применением различных методов субклеточного фракционирования, многие из которых основаны на дифференциальном центрифугировании либо на последовательной экстракции с использованием различных детергентов (Schütze et al., 1990; Ramsby et al., 1994; Chiang et al., 2000). Мы использовали методы, применяемые в практике нашей лаборатории, и методы, приведенные в литературе. Мы анализировали влияние Тритона X-100 в буфере для лизиса и применение предварительного замораживания клеток. Самый первый этап фракционирования, а именно разделение цитоплазмы и ядра, оказался чувствительным к присутствию 0.1%-ного Тритона X-100 в случае лизиса клеток без предварительного замораживания, что приводило к разрушению ядер. Поэтому для лизиса клеток без предварительного замораживания мы использовали меньшую концентрацию Тритона X-100 (0.05 %).

Сравнительный анализ выявления α -актинина в различных условиях для лизиса клеток показал, что качественный состав α -актининов в суммарной цитоплазматической фракции при этом не изменялся и не зависел от применения предварительного замораживания. Белки, узнаваемые антителами к α -актинам, представлены полноразмерными α -актинами 1 и 4 и фрагментами ~75 кДа для обеих изоформ α -актинина. Что касается ядерной фракции, результаты варьировали в зависимости от метода фракционирования и определялись тем, были или нет клетки предварительно заморожены.

Присутствие α -актинина 4 в ядре показано всеми применяемыми способами, подтверждает данные, ранее полученные в лаборатории, и данные других авторов и не вызывает сомнений (Бабаков и др., 2004; Poch et al., 2004; Chakraborty et al., 2006). Однако предварительное замораживание клеток оказывало влияние на распределение α -актинина 4 внутри ядра, изменяя соотношение его во фракциях, растворимых в 0.4 М NaCl и прочно связанных

с хроматином белков, что позволяет предполагать его лабильное положение в ядре.

Ситуация с выявлением α -актинина 1 в ядре оказалась более сложной. α -Актинин 1 не выявлялся в ядре при использовании иммунофлуоресцентного метода. Вестерн-блот-анализ также не обнаруживал α -актинина 1 в ядре при проведении фракционирования предварительно замороженных клеток и использовании 0.1%-ного Тритона X-100 в лизирующем буфере. Но в случае фракционирования клеток без предварительного замораживания фрагменты α -актинина 1 выявлялись в ядерных фракциях. Более того, фракционирование ядер, выделенных из клеток без предварительного замораживания, показало, что α -актинин 1 обнаруживался в Тритон-растворимой фракции ядерной оболочки и фракции комплекса ядерной ламины и отсутствовал во фракции нуклеоплазмы и фракции солерастворимых ядерных белков. Эти данные в сочетании с результатами иммунофлуоресцентного анализа, показавшими его околядерную локализацию, позволяют предполагать, что α -актинин 1 связан с ядерной оболочкой и, возможно, ламиной и что присутствие его в ядре можно объяснить взаимодействием именно с этими компонентами ядра. Особенности строения ядерной мембраны, показанные для многих клеток млекопитающих, такие как глубокие инвагинации, достигающие центра ядра, во внутриядерное пространство (Fricker et al., 1997), также могут приводить к тому, что результаты по выявлению α -актинина 1 в ядре являются неоднозначными.

Вероятно, тесное взаимодействие α -актинина 1 с ядерной оболочкой является общим свойством для спектринсодержащих белков. Исследования последних лет показали, что в наружной мембране ядерной оболочки присутствуют белки несприны. Имеющие α -актинин-подобный актинсвязывающий домен (Zhang et al., 2001; Young, Kothary, 2005; Губанова, Киселева, 2007).

Как полноразмерный α -актинин 4, так и фрагменты α -актининов 4 и 1 выявлялись во фракции белков, прочно связанных с хроматином. Поскольку фракция прочно связанных с хроматином белков включает в себя все ядерные структуры, кроме белков, растворимых в 0.4 М NaCl, мы считаем, что выявление α -актинина 1 связано с его присутствием в ядерной мембране или ламине, тогда как для α -актинина 4 действительно возможно присутствие во фракции белков, прочно связанных с хроматином. В литературе описаны белки, имеющие спектринные повторы (альфа-спектрин II), которые обнаружены не только в ядерной оболочке, но и в составе хроматинсодержащих комплексов, участвующих в репарации ДНК (McMahon et al., 1999, 2001; Sridharan et al., 2003).

Тот факт, что α -актинин 1 не обнаруживается в ядерной фракции при выделении из предварительно замороженных клеток, позволяет предположить, что процедура замораживания—размораживание разрушает связь α -актинина 1 с ядерной мембраной.

В литературе существуют данные, показывающие, что в процессе замораживания клеточные структуры испытывают механическое повреждение ледяными кристаллами. Деструкция клеток при действии низких температур возникает не только при замораживании клеток, но и при оттаивании, когда возникает перемещение кристаллов льда (миграционная перекристаллизация), которое усугубляет их деструктивное воздействие на живые клетки (Шалимов и др., 2003). Замораживание в культуре фибробластов может приводить к деградации микротрубочек (Vincent et al., 1990). Так, на культуре мышинных ос-

Список литературы

теобластов было продемонстрировано, что после оттаивания большинство F-актина разрушалось или деполимеризовалось (Liu, McGrath, 2005). В нашей работе остается невыясненным вопрос о том, почему не происходит полного лизиса предварительно замороженных клеток при использовании буфера, не содержащего Тритона X-100, тогда как при таких же условиях происходит полный лизис клеток, которые не были предварительно заморожены.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании фрагментов α -актининов 1 и 4 с разной молекулярной массой. В цитоплазме для обоих α -актининов были обнаружены фрагменты ~75 кДа. Данные фрагменты выявлялись также в некоторых ядерных подфракциях. Кроме того, антитела к α -актинином 1 и 4 узнавали ряд других фрагментов с мол. массой ниже 100 кДа в ядре. Роль фрагментов α -актина в клетках A431 остается невыясненной. Хотя данные о появлении фрагмента ~75 кДа α -актина 1 в суммарной цитоплазматической фракции после распластывания клеток A431 на фибронектине могут свидетельствовать о взаимосвязи процессов адгезии и образования фрагментов (Bolshakova et al., 2007). Литературные данные говорят о том, что протеазное расщепление α -актина трипсином и термолизом может приводить к образованию фрагментов с мол. массами 55 и 25 кДа. Нативный α -актинин имеет три сайта, по которым происходит расщепление химотрипсином (Immure et al., 1988; Communal et al., 2002). Образование фрагментов α -актина было показано *in vivo* и доказано их важное физиологическое значение (Selliah et al., 1996; Pavalko et al., 1998; Communal et al., 2002; Luikart et al., 2002).

Разные способы фракционирования приводят к обнаружению неодинакового набора фрагментов для обеих изоформ α -актина. Так, при фракционировании ядер (Dwyer, Blobel, 1976) отсутствуют фрагменты ниже 75 кДа для α -актининов в отличие от фракционирования другими способами. Это, вероятно, связано с присутствием ортованадата натрия (ингибитора тирозинфосфатаз) в буфере для лизиса при фракционировании ядра. Его действие может приводить к ингибированию протеолитического расщепления, как это показано для других белков (Meredith et al., 1998; Harrington et al., 2001), в результате чего не образуются фрагменты актина. Сопоставление нескольких методов для субклеточного фракционирования показывает, что исследуемые белки могут выявляться в разной степени в той или иной фракции в зависимости от метода разделения. Поэтому представляется обоснованным при субклеточном фракционировании использовать разные способы для получения более полной картины распределения белков в клетках. Совокупные результаты, полученные при сравнении нескольких биохимических методов и иммунофлуоресцентного анализа, позволяют предположить, что α -актинин 1 прочно связан с мембраной ядерной оболочки, а α -актинин 4 является лабильным белком и может присутствовать в разных ядерных фракциях.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48251), программы «Ведущие научные школы» (НШ-7852.2006.4) и программы Шведского института (Visby program, № 1361/2006).

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- κ B солокализуются и совместно мигрируют в ядро в клетках A431 под действием эпидермального фактора роста. Цитология. 46 (12): 1064—1072.

Бабаков В. Н., Кропачева И. В., Петухова О. А., Туроверова Л. В., Пинаев Г. П. 2004. Внутриклеточное распределение актинсвязывающих белков, фосфорилированных по тирозину, при распластывании клеток A431 на разных лигандах. Цитология. 46 (12): 1055—1063.

Губанова Н. В., Киселева Е. В. 2007. Структурная организация и функции ядерной оболочки. Цитология. 49 (4): 257—269.

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 SRE, 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.

Шалимов С. А., Кейсевич Л. В., Литвиненко А. А., Волченкова И. И., Никитин Л. Ф., Потемба Г. П., Семерников В. А., Кавецкого Р. Е. 2003. Криохирургические методы лечения неперабельных опухолей органов брюшной полости. Начало. Мед. газета «Здоровье Украины». См. Интернет: <http://www.health-ua.com/articles/269/html>.

Are A. F., Pinaev G. P., Burova E., Lindberg U. 2001. Attachment of A-431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. Cell Motil. Cytoskeleton. 48: 24—36.

Babakov V. N., Petukhova O. A., Turoverova L. V., Kropacheva I. V., Tentler D. G., Bolshakova A. V., Podolskaya E. P., Magnusson K. E., Pinaev G. P. 2008. RelA/NF- κ B transcription factor associates with alpha-actinin-4. Exp. Cell Res. 314: 1030—1038.

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.

Benmerah A., Scott M., Poupon V., Marullo S. 2003. Nuclear functions for plasma membrane-associated proteins? Traffic. 4: 503—511.

Bershadsky A. D., Vasiliev J. M. 1988. Cytoskeleton. New York: Plenum Press. 298 p.

Blessing C. A., Ugrinova G. T., Goodson H. V. 2004. Actin and ARPs: action in the nucleus. Trends Cell Biol. 14: 435—442.

Blobel G., Potter V. R. 1966. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. Science. 154: 1662—1665.

Bolshakova A. V., Petukhova O. A., Turoverova L. V., Tentler D. G., Babakov V. N., Magnusson K.-E., Pinaev G. P. 2007. Extra-cellular matrix proteins induce re-distribution of α -actinin-1 and α -actinin-4 in A431 cells. Cell Biol. Int. 31: 360—365.

Bredford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248—254.

Chakraborty S., Reineke E. L., Lam M., Li X., Liu Y., Gao C., Khurana S., Kao H. Y. 2006. Alpha-actinin 4 potentiates myocyte enhancer factor-2 transcription activity by antagonizing histone deacetylase 7. J. Biol. Chem. 281: 35 070—35 080.

Chiang E. T., Lim M. J., Patton W. F., Shepro D. 2000. NF κ B translocation in human microvessel endothelial cells using a four-compartment subcellular protein redistribution assay. J. Biochem. Biophys. Methods. 46: 53—68.

Communal C., Sumanda M., de Tombe P., Narula J., Solero R. J., Hajjar. 2002. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. PNAS. 99: 6252—6256.

- Dwyer N., Blobel G. 1976. A modified procedure for the isolation of pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 70 : 581—591.
- Fazal F., Minhajuddin M., Bijli K. M., McGrath J. L., Rahman A. 2007. Evidence for actin cytoskeleton-dependent and -independent pathways for RelA/p65 nuclear translocation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 282 : 3940—3950.
- Fey E. G., Wan K. M., Penman S. 1984. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J. Cell Biol.* 98 : 1973—1984.
- Fricker M., Hollinshead M., White N., Vaux D. 1997. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 136 : 531—544.
- Gluck U., Ben-Ze'ev A. 1994. Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *J. Cell Sci.* 107 : 1773—1782.
- Goffart S., Franko A., Clemen C. S., Wiesner R. J. 2006. Alpha-actinin and BAT 1 interaction with Cytochrome c promoter upon skeletal muscle differentiation. *Current Genetics.* 49 : 125—135.
- Harrington E. O., Smeglin A., Newton J., Ballard G., Rouns S. 2001. Protein tyrosine phosphatase-dependent proteolysis of focal adhesion complexes in endothelial cell apoptosis. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280 : 342—353.
- Honda K., Yamada T., Endo R., Ino Y., Gotoh M., Tsuda Y., 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.
- Immure M., Endo T., Kuroda M., Tanaka T., Masaki T. 1988. Substructure and higher structure of chicken smooth muscle alpha-actinin molecule. *J. Biol. Chem.* 263 : 7800—7805.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Liu B.-L., McGrath J. 2005. Response of cytoskeleton of murine osteoblast cultures to two-step freezing. *Acta biochim. biophys. Sinica.* 37 : 814—818.
- Luikart S., Masri M., Wahl D., Hinkel T., Beck J. M., Gyetko M. R., Gupta P., Oegema T. 2002. Urokinase is required for the formation of mactinin, an alpha-actinin fragment that promotes monocyte/macrophage maturation. *Biochim. biophys. acta.* 1591 : 99—107.
- McMahon L. W., Sangerman J., Goodman S. R., Kumaresan K., Lambert M. W. 2001. Human alpha spectrin II and the FANCA, FANCC, and FANCG proteins bind to DNA containing psoralen interstrand cross-links. *Biochemistry.* 40 : 7025—7034.
- McMahon L. W., Walsh C. E., Lambert M. W. 1999. Human alpha spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex. *J. Biol. Chem.* 274 : 32 904—32 908.
- Meredith J., Jr., Mu Z., Saido T., Du X. 1998. Cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta3 subunit during endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273 : 19 525—19 531.
- Otey C. A., Carpen O. 2004. alpha-Actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 58 : 104—111.
- Papakonstanti E. A., Vardaki E. A., Stournaras C. 2000. Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol. Biochem.* 10 : 257—264.
- Pavalko F. M., Chen N. X., Turner C. H., Burr D. B., Atkinson S., Hsieh Y. F., Qiu J., Duncan R. L. 1998. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Amer. J. Physiol.* 275 : 1591—1601.
- Pederson T., Aebi U. 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? *J. Struct. Biol.* 140 : 3—9.
- Poch M. T., Al-Kassim L., Smolinski S. M., Hines R. N. 2004. Two distinct classes of CCAAT box elements that bind nuclear factor-Y/alpha-actinin-4: potential role in human *CYP1A1* regulation. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 199 : 239—250.
- Ramsby M. L., Makowski G. S., Khairallah E. A. 1994. Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments. *Electrophoresis.* 15 : 265—277.
- Schmidt A., Hall M. N. 1998. Signaling to actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 14 : 305—338.
- Schütze S., Nottrott S., Pfizenmaier K., Krönke M. 1990. Tumor necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C. *J. Immunol.* 144 : 2604—2608.
- Selliah N., Brooks W. H., Roszman T. L. 1996. Proteolytic cleavage of alpha-actinin by calpain in T cells stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 156 : 3215—3221.
- Sridharan D., Brown M., Lambert W. C., McMahon L. W., Lambert M. W. 2003. Nonerythroid alphaII spectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links. *J. Cell Sci.* 116 : 823—835.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350—4354.
- Vincent C., Pruliere G., Pajot-Augy E., Campion E., Garnier V., Renard J. P. 1990. Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology.* 27 : 9—23.
- Young K. G., Kothary R. 2005. Spectrin repeat proteins in the nucleus. *BioEssays.* 27 : 144—152.
- Zhang Q., Skepper J. N., Yang F., Davies J. D., Hegyi L., Roberts R. G., Weissberg P. L., Ellis J. A., Shanahan C. M. 2001. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* 114 : 4485—4498.

Поступила 15 IX 2008

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF SUBCELLULAR FRACTIONATION METHODS FOR REVEALING OF α -ACTININ 1 AND α -ACTININ 4 IN A431 CELLS

A. V. Bolshakova,¹ O. A. Petukhova,¹ G. P. Pinaev,¹ K.-E. Magnusson²

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg and ² Linköping University, Linköping, Sweden; e-mail: asyab@mail.ru

α -Actinin 1 and α -actinin 4 belong to a family of actin-binding proteins with shared structural function and regulation of several processes in a cell. Based on previous data on different distribution of these proteins in the nucleus and cytoplasm, we have explored in detail the distribution of α -actinin 1 and α -actinin 4 in subcellular fractions in A431 cells spread on fibronectin. Several methods of subcellular fractionation were used. Complex approach allowed resuming that revealing of α -actinin isoforms in fractions depended on the composition of lysis buffer and preliminary low-temperature freezing of the cells. We have drawn a conclusion that α -actinin 4 can be found in all cytoplasmic and nuclear subfractions, while α -actinin 1 is characterized by cytoplasmic and membrane localization with specificity of its distribution tightly to the nuclear membrane.

Key words: α -actinin 1, α -actinin 4, subcellular fractionation.