

ИССЛЕДОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ α -АКТИНИНА-4 МЕТОДАМИ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© М. Г. Хотин,^{1,*} Л. В. Туроверова,¹ Е. П. Подольская,² И. А. Краснов,² А. В. Соловьева,¹
В. Ю. Аксенова,¹ К.-Э. Магнуссон,³ Г. П. Пинаев,¹ Д. Г. Тентлер¹

¹Институт цитологии РАН, ²Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург,
и ³Отдел клинической и экспериментальной медицины Линчепингского университета, Швеция;

*электронный адрес: h_mg@mail.ru

Актинсвязывающий белок α -актинин-4 принадлежит к спектрinovому суперсемейству и имеет как цитоплазматическую, так и ядерную локализацию. Однако неясно, какие функции α -актинин-4 выполняет в ядре. В данном исследовании проанализирован состав белковых комплексов, содержащих α -актинин-4 в ядре клеток A431. Методом двумерного электрофореза определено, что ядерные комплексы, содержащие α -актинин-4, состоят примерно из 50 белков. Проведен масс-спектрометрический анализ мажорных белков этих комплексов. Идентифицированы β -актин, α - и β -тубулины, рибонуклеопротеин A2/B1 (регулирует сплайсинг и ассоциирован в ядре с β -актином), пероксиредоксин-1 (участвует в защите клетки от окислительного стресса) и D-3-фосфоглицериндегидрогеназа (гликолитический фермент). Обнаружение этих белков в комплексе с α -актинином-4 в ядре позволяет предположить его участие в процессах транскрипции и сплайсинга. Методом тандемной масс-спектрометрии подтверждено наличие β -актина в исследуемых комплексах. Методом иммунопреципитации ядерных белков с антителами к α -тубулину подтверждено существование α -тубулина и α -актинина-4 в одном белковом комплексе. Ядерный α -актинин-4 представлен полноразмерной (105 кДа) и двумя укороченными (75 и 65 кДа) изоформами, тогда как в ядерном комплексе с α -тубулином присутствуют только две укороченные изоформы. Это свидетельствует о том, что α -актинин-4 входит в состав нескольких различных ядерных комплексов, которые, вероятно, выполняют различные функции.

Ключевые слова: α -актинин-4, масс-спектрометрия.

Принятые сокращения: MS-MS — метод тандемной масс-спектрометрии, PMF — peptide mass fingerprint.

С тех пор как стало известно о присутствии актина и некоторых актин-связывающих белков в ядре, исследователи разных стран предпринимают попытки определить их ядерные функции (Egly et al., 1984; Pederson, Aebi, 2002; Percipalle, Visa, 2006; Vartiainen, 2008). Существует ряд работ, в которых показано участие актина в регуляции транскрипции (Hofmann et al., 2004; Gettemans et al., 2005). Кроме того, обнаружена ядерная локализация таких актинсвязывающих белков, как α -актинин-4, зиксин, паксиллин, филламин, винкулин и эзрин (Honda et al., 1998; Wang, Gilmore, 2003; Batchelor et al., 2004). Вместе с тем функции цитоскелетных белков в ядре изучены недостаточно.

Актинсвязывающий белок α -актинин-4 принадлежит к спектрinovому суперсемейству и наряду с α -актинином-1 относится к немышечному типу α -актининов (Honda et al., 1998). α -Актинин-4 локализуется в актиновых стресс-фибриллах, в дорсальных раффах и в ядре (Honda et al., 1998; Bolshakova et al., 2007; Babakov et al., 2008). Перераспределение α -актинина-4 в ядро наблюдали при ингибировании Р13-киназы вортманнином или при деполимеризации актина цитохалазином (Honda et al., 1998; Бабаков и др., 2004).

Согласно данным из литературы, α -актинин-4 входит в состав белкового комплекса, образованного транскрипционным фактором NF- Υ при активации процесса транскрипции (Poch et al., 2004), и может связываться с промотором гена *Cyt c* (Goffart et al., 2006). Ранее в нашей лаборатории было показано, что в цитоплазме α -актинин-4 солокализован с субъединицей p65 транскрипционного фактора NF- κ B (Бабаков и др., 2004). Позднее выяснили, что при воздействии на клетки фактором некроза опухоли- α (TNF- α) или цитохалазином происходит совместная транслокация p65 и α -актинина-4 в ядро (Bolshakova et al., 2007; Babakov et al., 2008). Кроме того, эти два белка содержатся в одном ядерном белковом комплексе во фракции транскрипционных факторов (Bolshakova et al., 2007). Однако функциональная роль α -актинина-4 в ядре неясна.

Для выяснения функций α -актинина-4 в ядре важно определить те белки, с которыми он ассоциирован в ядре. В данной работе проанализирован состав ядерных белковых комплексов, в которые входит α -актинин-4. Идентифицировано 6 белков, ассоциированных с α -актинином-4 в ядре. Их функции связаны с регуляцией процессов сплайсинга и транскрипции.

Материал и методика

Клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C.

Выделение ядерных белков фракции транскрипционных факторов. Перед снятием с флаконов клетки промывали раствором PBS, нагретым до 37 °C для удаления остатков среды. Затем клетки снимали при помощи резинового скребка, отмывали в буфере, содержащем 10 mM Трис-НСl, pH 8.0, 0.32 M сахарозы, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM ЭДТА, 10 mM ДТТ, 0.05 mM PMSF и ингибиторы протеаз. После центрифугирования клетки ресуспендировали в том же буфере и инкубировали 20–40 мин (до момента лизиса) во льду. Для выделения и очистки ядер клеточный лизат 20 раз пропускали через иглу 21G. Ядра осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 3000 g и 4 °C, ресуспендировали и очищали, осаждая в 0.5 M сахарозе при тех же условиях. Сохранность и чистоту ядер контролировали под микроскопом. Выделение ядерной белковой фракции, содержащей транскрипционные факторы, проводили в течение 30 мин при 4 °C в буфере, содержащем 400 mM NaCl, 20 mM NERES, pH 7.9, 25 % глицерина, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM ЭДТА, 0.4 mM PMSF, 1 mM ДТТ и ингибиторы протеаз (Бабаков и др., 2004). Остатки ядер осаждали (3000 g, 10 мин), а супернатант использовали для иммунопреципитации.

Иммунопреципитация. К полученным ядерным лизатам добавляли два объема PBS для уменьшения концентрации соли и инкубировали с протеин G сефарозой при постоянном перемешивании в течение 1 ч при 4 °C для удаления из пробы белков, неспецифически связывающихся с сефарозой. Затем сефарозу осаждали (14 000 g, 3 мин, 4 °C), а супернатант переносили в новые пробирки и инкубировали с соответствующими антителами в течение 1 ч. После этого в пробы добавляли свежую порцию протеин G сефарозы и инкубировали их в течение ночи на ротаторе при 4 °C. Иммунопреципитаты отмывали 4 раза раствором PBS с ингибиторами протеаз.

Двумерный электрофорез белков проводили на оборудовании фирмы GE Healthcare Bio-Sciences (Швеция) в соответствии с рекомендациями производителя, но с небольшими изменениями. Белковые комплексы снимали с сефарозы в течение 2 ч на ротаторе следующим буфером: 8 M мочевины, 2 % CHAPS, 20 mM ДТТ и 0.5 % Тритона X-100. Регидратацию гель-стрипов (pH 3–10) проводили в течение ночи для максимальной абсорбции пробы. Затем проводили изофокусирование — разделение белков при 20 °C в гель-стрипе согласно их изоэлектрической точке по программе: 200 В 30 мин; возрастание напряжения от 200 до 3500 В за 90 мин; 3500 В 4 ч. После этого последовательно по 10 мин стрип инкубировали в эквilibрирующем буфере (6 M мочевины, 30 % глицерина, 2 % SDS и 0.05 M Трис-НСl pH 6.8) с добавлением 2 % ДТТ и в эквilibрирующем буфере, содержащем 2.5 % иодоцетамида. Разделение белков во втором направлении проводили при 15 °C в градиенте концентрации полиакриламидного геля (8–16 %) по программе: 200 В, 20 мА 20 мин; 200 В, 50 мА 70 мин.

После электрофореза гели инкубировали в течение ночи в фиксирующем буфере (10%-я уксусная кислота и

20 % метанола) и окрашивали Кумасси (PageBlue Protein Stain, Fermentas, Литва) или серебром (Silver Stain, Fermentas, Литва).

Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа. Пятна, окрашенные Кумасси, вырезали и собирали в отдельные микропробирки. Трипсинолиз белков в геле проводили по описанному ранее методу (Shevchenko et al., 2006) с некоторыми изменениями. Кусочки геля промывали раствором А (50 % ацетонитрила и 25 mM NH₄HCO₃) дважды по 15 мин. Затем к образцам добавляли ацетонитрил и инкубировали 5 мин для удаления из геля избытков воды. После удаления ацетонитрила пробы сушили в вакуумной центрифуге в течение 15 мин. Карбамидометилирование белков в геле проводили по следующей схеме: инкубация в 10 mM ДТТ, 50 mM NH₄HCO₃ 45 мин при 56 °C; сушка проб раствором ацетонитрила в течение 3 мин с его последующим удалением; инкубация в смеси 55 mM раствора иодоцетамида и 50 mM NH₄HCO₃ в течение 45 мин в темноте. Далее пробы последовательно промывали по 10 мин раствором А и ацетонитрилом и сушили в вакуумной центрифуге в течение 15 мин. Затем к образцам добавляли раствор, содержащий 0.005 мкг/мкл трипсина (Trypsin Gold, Promega, США) в 50 mM NH₄HCO₃ и 10%-ном ацетонитриле и оставляли на льду до полного выпитывания раствора в гель, после чего смесь термостатировали в течение 3 ч при 37 °C. По прошествии указанного времени к образцам добавляли еще одну порцию раствора трипсина в равном объеме и оставляли еще на 3 ч при той же температуре. По окончании трипсинолиза проводили экстракцию пептидов из гелей. Для этого в каждую пробирку добавляли буфер для экстракции (5 % трифторуксусной кислоты (TFA) и 50 % ацетонитрила), перемешивали при помощи вортекса в течение 10 мин и переносили жидкую фазу в чистые микропробирки. Процедуру повторяли трижды. Полученные экстракты сушили в вакуумной центрифуге до полного испарения жидкой фазы и затем растворяли в 10 мкл 0.1%-ной TFA. Полученные пробы очищали от избытка солей при помощи колонок ZipTips по протоколу фирмы-производителя. С колонок пептиды элюировали 1.5 мкл 70%-ного раствора ацетонитрила в 5%-ной TFA, содержащего матрицу СНСА (α -циано-гидрокси-коричную кислоту) в концентрации 9 мг/мл, непосредственно на мишень масс-спектрометра.

Масс-спектрометрический анализ. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF (матричной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии) проводили с помощью прибора Voyager фирмы Applied Biosystems (США). Ионы детектировали в диапазоне отношения молекулярной массы к заряду (m/z) от 700 до 3500. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения Data Explorer фирмы-производителя, идентификацию белков проводили при помощи программы Mascot с использованием белковой базы данных SwissProt, методом PMF (peptide mass fingerprint).

Пептиды, принадлежащие идентифицированным белкам и соответствующие сильным сигналам спектра, дополнительно анализировали методом tandemной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-TOF) с помощью времяпролетного масс-спектрометра Ultraflex-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Германия) с источником ионизации MALDI, оснащенным УФ-лазером (337 нм). Ионы детектировали в диапазоне m/z от 700 до 3000. Полученные спектры обрабатывали при помощи программного обеспечения Flex

Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию также проводили при помощи программы Mascot с использованием базы данных SwissProt.

SDS-электрофорез и Вестерн-блотинг. Иммунопреципитаты растворяли в буфере Laemmli для проб и инкубировали 5 мин при 96 °С. Затем их разделяли в градиенте (8—16 %) SDS ПААГ и переносили на мембрану PVDF, которую затем инкубировали 1 ч в 5%-ном молоке, растворенном в буфере PBST (PBS, содержащий 0.1 % Tween-20). После этого мембрану отмывали буфером PBST и инкубировали ночь с первичными антителами при 4 °С. Далее мембрану трижды отмывали буфером PBST, инкубировали 1 ч со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, проводили шестикратную отмывку буфером PBST и визуализировали с помощью люминофора ECL.

В работе использовали: среду DMEM и бычью эмбриональную сыворотку (Gibco, США); мышинные моноклональные антитела к α -тубулину T6199, антитела против иммуноглобулинов мыши и кролика, конъюгиро-

ванные с пероксидазой хрена, протеин G сефарозу, SDS и NH_4HCO_3 (Sigma, США); ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария); ZipTip и PVDF (Millipore, США); кроличьи поликлональные антитела к α -актину-4 (Immunoglobulin, Германия); гель-стрипы и гели градиентные 8—16 % для электрофореза (GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция); Trypsin Gold (Promega, США); краситель Кумасси PageBlue protein stain и набор для серебрения Silver Stain (Fermentas, Литва).

Результаты

Методом иммунопреципитации были получены ядерные белковые комплексы, содержащие α -актинин-4. Для предотвращения разрушения комплексов при выделении ядер и экстрактов ядерных белков применяли наиболее щадящие методы без использования детергентов (см. раздел «Материал и методика»). Белки, ассоциированные с α -актинином-4 в ядре, разделяли методом двумерного

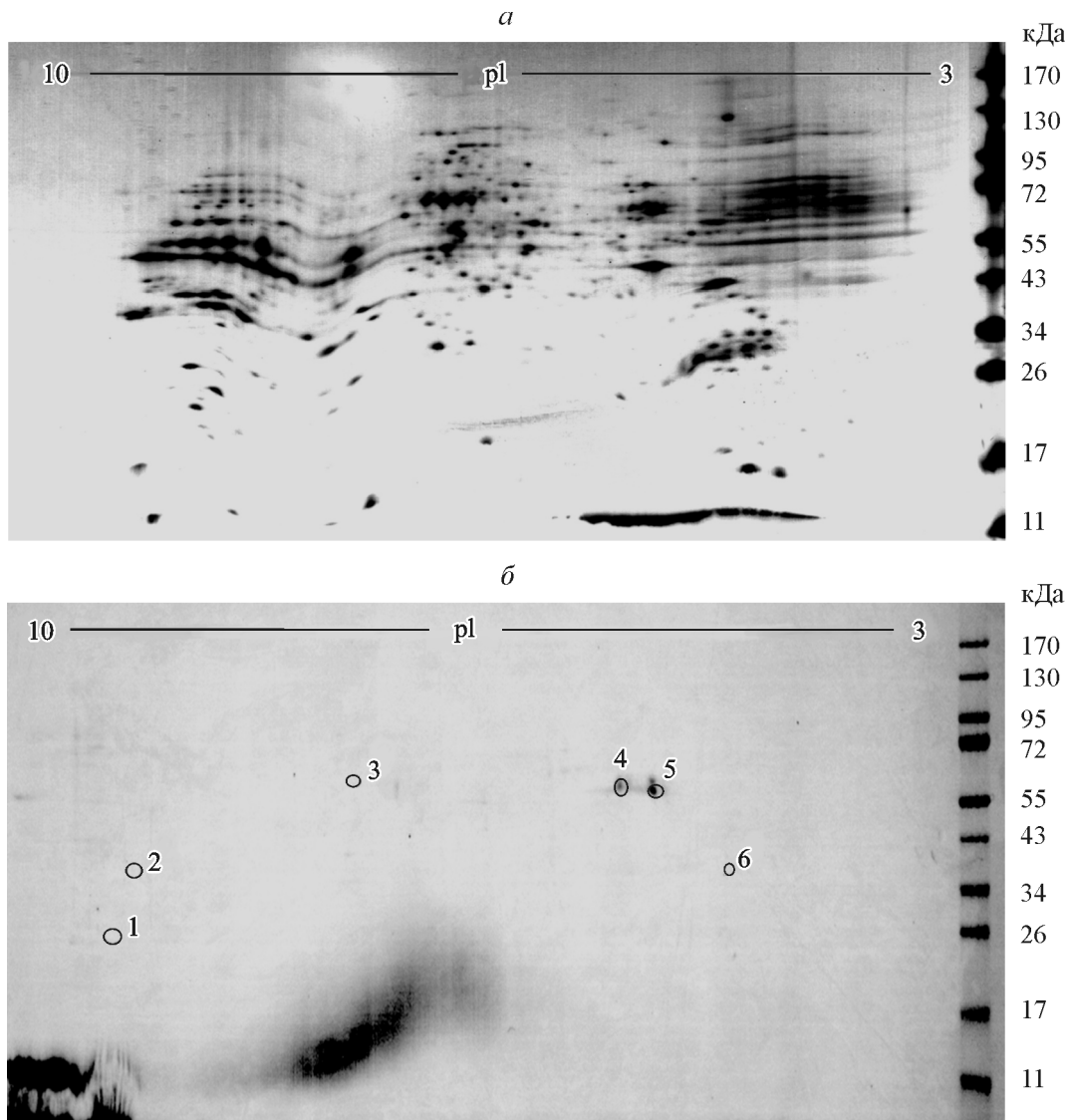


Рис. 1. Двумерный электрофорез ядерных белковых комплексов, содержащих α -актинин-4.

Представлены окраски методами серебрения (а) и Кумасси (б). На рис. 1, б отмечены пятна (пробы), которые вырезали для анализа масс-спектрометрией (1—6).

Белки, идентифицированные в одном ядерном комплексе с α -актинином-4 методом PMF

Номер пробы	Молекулярная масса, соответствующая вырезанному пятну, кДа	Молекулярная масса идентифицированного белка, кДа	Название белка, его идентификационный номер в базе Swiss Prot	Достоверность идентификации	Отношение общего количества пиков в спектре к количеству пептидов идентифицированного белка
1	20	22	Пероксиредоксин-1 (peroxiredoxin-1), P60709	$P < 0.005$	3/5
2	38	37	Рибонуклеопротеин A2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1), P22626	$P < 0.0001$	11/15
3	55	57	D-3-фосфоглицериндегидрогеназа (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase), O43175	$P < 0.0001$	9/25
4	54	51	α -Тубулины-1A, -1B, -1C (tubulin alpha-1A, tubulin alpha-1B, tubulin alpha-1C chains), Q71U36, P68363, Q9VQE3	$P < 0.05$	3/6
5	54	50	β -Тубулин (tubulin beta chain), P07437	$P < 0.0001$	22/27
6	40	42	β -Актин, γ -актин (actin cytoplasmic 1; actin cytoplasmic 2), P60709, P63261	$P < 0.0001$	5/11

Примечание. В пробах № 4 и 6 с одинаковой вероятностью идентифицированы три и два белка соответственно. Это объясняется высокой степенью гомологии этих белков.

электрофореза. Для их визуализации гели окрашивали серебром (рис. 1, а) или Кумасси (рис. 1, б). Метод серебрения является более чувствительным и дает возможность оценить полный белковый состав исследуемых комплексов. Анализ рис. 1, а позволяет сказать, что с ядерным α -актинином-4 ассоциировано примерно 50 различных белков.

Следующим этапом данного исследования была идентификация мажорных белков исследуемых комплексов. Для анализа использовали гели, окрашенные Кумасси (рис. 1, б). Данный способ окраски наиболее совместим с последующим масс-спектрометрическим анализом, но менее чувствителен, чем метод серебрения. Окрашенные пятна вырезали, а белки, содержащиеся в них, анали-

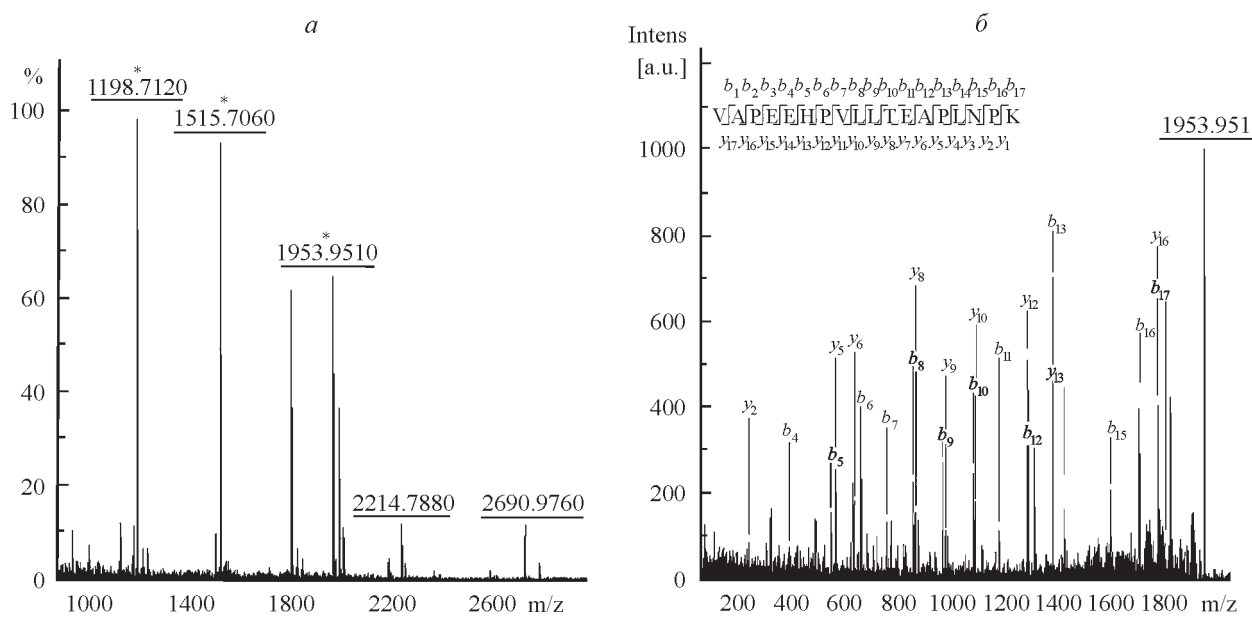


Рис. 2. Масс-спектр пробы № 6 (по рис. 1, б).

а — MALDI-TOF-спектр пробы № 6; звездочками отмечены значения масса/заряд (m/z) тех пептидов, которые анализировали тандемной масс-спектрометрией (MS-MS); по оси ординат отмечены значения интенсивности спектра относительно максимального пика. б — MS-MS-спектр пептида с мол. массой 1953.951 (родительский ион); в верхней части представлена полученная аминокислотная последовательность; буквой y обозначены те пептиды, которые соответствуют родительскому иону с С-конца, но без определенного количества аминокислот на N-конце; цифрой обозначено количество аминокислот в пептиде; буквой b отмечены пептиды, которые соответствуют родительскому иону, но без нескольких аминокислот на С-конце; по оси ординат отмечены относительные значения интенсивности спектра.

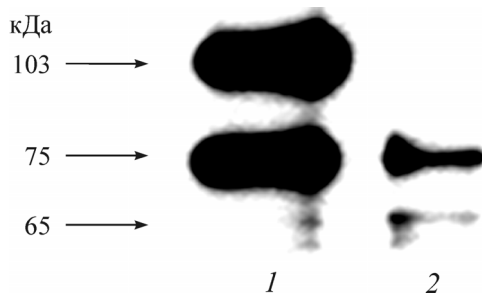


Рис. 3. Вестерн-блот ядерных белков клеток А431 с антителами к α -актину-4.

Дорожки 1 и 2 — соответственно иммунопреципитаты с α -актинином-4 и α -тубулином.

зировали посредством масс-спектрометрии. Результаты анализа методом PMF представлены в таблице. Обнаружено, что в состав ядерных белковых комплексов, содержащих α -актинин-4, входят β -актин, α - и β -тубулины, рибонуклеопротеин A2/B1 (член группы рибонуклеопротеинов, регулирующих сплайсинг), пероксиредоксин-1 (антиоксидантный белок) и D-3-фосфоглицериндегидрогеназа (гликолитический фермент, катализирующий превращение 3-фосфоглицерина в 3-фосфоглицеринат).

Для дополнительного подтверждения полученных результатов нами был проведен анализ методом MALDI-TOF-TOF. Достоверный результат был получен только для пробы № 6 (см. таблицу). В ней идентифицированы 3 пептида с соответствующими мол. массами родительского иона 1198.712, 1515.706 и 1953.951 (рис. 2). Их анализ показал, что они соответствуют β -актину ($P < 0.001$), что подтверждает результаты, полученные методом PMF.

Для проверки результатов MALDI-TOF проведена иммунопреципитация ядерных белков антителами к α -тубулину (рис. 3). В качестве контроля использовали иммунопреципитат ядерных белков антителами к α -актину-4 (дорожка 1). На рис. 3 видно, что антитела к α -актину-4 дают положительный ответ при Вестерн-блоттинге с иммунопреципитатом к α -тубулину, что подтверждает присутствие α -актина-4 в комплексе с α -тубулином. Эксперимент также показал, что в ядре присутствуют не только полноразмерная (100 кДа), но и две укороченные (75 и 65 кДа) изоформы α -актина-4 (рис. 3, дорожка 1). В то же время в ядерном иммунопреципитате α -тубулина обнаруживаются только укороченные варианты α -актина-4 (рис. 3, дорожка 2). Это свидетельствует о том, что α -актинин-4 содержится в различных ядерных белковых комплексах, которые, вероятно, выполняют отличные друг от друга функции.

Обсуждение

Несмотря на то что с момента обнаружения α -актина-4 в ядре прошло уже 10 лет (Honda et al., 1998), его ядерные функции до сих пор неясны. Основной задачей данного исследования было определение тех белков, с которыми α -актинин-4 взаимодействует в ядре. При подобных исследованиях, когда необходимо определить состав молекулярного белкового комплекса, одним из наиболее информативных подходов является сочетание двумерного электрофореза и масс-спектрометрии.

С использованием этого метода мы определили 6 различных белков, которые ассоциированы с α -актинином-4 в ядре. Среди них есть β -актин, который в цитоплазме является главным партнером α -актина-4 как актинсвязывающего белка. Вместе с тем известно, что актин принимает участие в регуляции транскрипции — он присутствует в регуляторном комплексе всех трех РНК-полимераз (Fomproix, Percipalle, 2004; Hofmann et al., 2004; Hu et al., 2004; Philimonenko et al., 2004; Zhu et al., 2004; Kukalev et al., 2005), обнаруживается в белковых структурах, участвующих в АТФ-зависимом ремоделировании хроматина (Olave et al., 2002; Bettinger et al., 2004; Farrants, 2008), и является компонентом рибонуклеопротеинового комплекса (Галкин и др., 1998; Percipalle et al., 2001, 2002).

Как было показано в последние годы, белки гетерогенного рибонуклеопротеинового комплекса не только являются основным регулятором сплайсинга, но и совместно с актином активируют РНК-полимеразу II (Kukalev et al., 2005). Продемонстрировано, что гистонацетилтрансфераза PSAF вместе с актином и рибонуклеопротеином U присутствует в комплексе, который регулирует элонгацию транскрипции РНК-полимеразы II (Obrdlík et al., 2008). Помимо β -актина в исследуемом комплексе нами обнаружен рибонуклеопротеин A2/B1, являющийся частью группы гетерогенных рибонуклеопротеинов (hnRNP). Обнаружение этих двух белков вместе с α -актинином-4 позволяет предположить, что он входит в состав ансамбля белков, регулирующих транскрипцию и сплайсинг.

В исследуемых комплексах нами идентифицирован также пероксиредоксин 1 — фермент с пероксидазной активностью, защищающий клетку от окислительного стресса. Известно о цитоплазматической и ядерной локализации этого белка. Показано, что при воздействии на клетку H_2O_2 пероксиредоксин 1 в цитоплазме регулирует перераспределение NF- κ B в ядро, где участвует в регуляции образования комплекса ДНК-NF- κ B (Hansen et al., 2007). Ранее в нашей лаборатории было показано, что α -актинин-4 и р65-субъединица NF- κ B солокализуются в ядре и цитоплазме (Бабаков и др., 2004; Bolshakova et al., 2007), и высказывалось предположение об участии α -актина-4 в регуляции активности NF- κ B. Обнаружение пероксиредоксина-1 в комплексе с α -актинином-4 подтверждает эту гипотезу.

D-3-фосфоглицериндегидрогеназа, α -тубулин и β -тубулин — еще три белка, которые мы идентифицировали в ядерных комплексах, содержащих α -актинин-4. Первые два были обнаружены в ядре методом масс-спектрометрии в 2001 г. (Bergquist et al., 2001). Ранее в экспериментах *in vitro* было показано, что тубулин способен образовывать стабильные связи с гистонами H1—H4 (Mithieux et al., 1984), а гликолитические ферменты могут взаимодействовать с ДНК (Ronai, 1993) и с тубулином в цитоплазме (Walsh et al., 1989). Ядерные функции обоих белков неясны. Обнаружение α -актина-4 в одном ядерном комплексе с этими белками может свидетельствовать об участии α -актина-4, D-3-фосфоглицериндегидрогеназы, α - и β -тубулина в организации структуры ДНК.

В комплексе с ядерным α -тубулином находятся только укороченные (65 и 75 кДа) изоформы α -актина-4, в то время как в ядре присутствует также и полноразмерный белок (рис. 2). Это свидетельствует о том, что α -актинин-4 входит в состав нескольких ядерных комплексов, которые, возможно, участвуют в разных сигнальных пу-

тях и регулируют различные процессы. Данное предположение также подтверждается тем, что в ядерном комплексе, включающем в себя α -актинин-4, присутствует более 50 различных белков. Кроме того, стоит заметить, что нами впервые показана ядерная локализация укороченной изоформы α -актинина-4 с мол. массой 75 кДа. Ранее мы сообщали о ее присутствии в цитоплазме и о наличии изоформы с мол. массой 65 кДа в цитоплазме и ядре (Bolshakova et al., 2007).

Результаты данного исследования позволяют нам предполагать, что ядерный α -актинин-4 принимает участие в процессах транскрипции и сплайсинга. Для проверки этой гипотезы необходимо идентифицировать максимальное количество белков, входящих в комплексы с α -актинином-4 в ядре, и провести функциональный анализ методами геной инженерии и иммунохимии.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программы Visby Шведского института и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01190).

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- κ B солокализуются и совместно мигрируют в ядро в клетках A431 под действием ЭФР. Цитология. 46 (12) : 1064—1072.
- Галкин В. Э., Туроверова Л. В., Константинова И. М., Пинаев Г. П. 1998. 26S-рибонуклеопротеиновый комплекс (26S-протеасома) непосредственно взаимодействует с фибриллярным актином. Цитология. 40 (7) : 618—626.
- 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.
- Bergquist J., Gobon J., Blomberg A., Roepstorff P., Ekman R. 2001. Identification of nuclei associated proteins by 2D-gel electrophoresis and mass spectrometry. Neurosci. Methods. 109 : 3—11.
- Bettinger B. T., Gilbert D. M., Amberg D. C. 2004. Actin up in the nucleus. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 : 410—415.
- Bolshakova A., Petukhova O., Turoverova L., Tentler D., Babakov V., Magnusson K. E., Pinaev G. 2007. Extra-cellular matrix proteins induce re-distribution of alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4 in A431 cells. Cell Biol. Int. 3 : 360—365.
- Egly J. M., Miyamoto N. G., Moncollin V., Chambon P. 1984. Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? EMBO J. 3 : 2363—2371.
- Farrants A.-K. 2008. Chromatin remodelling and actin organization. FEBS L. 582 : 2041—2050.
- Fomproix N., Percipalle P. 2004. An actin-myosin complex on actively transcribing genes. Exp. Cell Res. 294 : 140—148.
- Gettemans J., Van Impe K., Delanote V., Hubert T., Vandekerckhove J., De Corte V. 2005. Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription. Traffic. 6 : 847—857.
- Goffart S., Franko A., Clemen C. S., Wiesner R. J. 2006. Alpha-Actinin 4 and BAT1 interaction with the Cytochrome c promoter upon skeletal muscle differentiation. Curr. Genet. 49 : 125—135.
- Hansen J. M., Moriarty-Craige S., Jones D. P. 2007. Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulate NF- κ B activities. Free Rad. Biol. Med. 43 : 282—288.
- Hofmann W. A., Stojiljkovic L., Fuchsova B., Vargas G. M., Mavrommatis E., Philimonenko V., Kysela K., Goodrich J. A., Les-sard J. L., Hope T. J., Hozak P., De Lanerolle P. 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. Nat. Cell Biol. 6 : 1094—1101.
- Honda K., Yamada T., Endo R., Ino Y., Gotoh M., Tsuda H., Yamada Y., Chiba H., Hirohashi S. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. J. Cell Biol. 140 : 1383—1393.
- Hu P., Wu S., Hernandez N. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. Genes Develop. 18 : 3010—3015.
- Kukalev A., Nord Y., Palmberg C., Bergman T., Percipalle P. 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. Nat. Struct. Mol. Biol. 12 : 238—244.
- Mithieux G., Alquier C., Roux B., Rousset B. 1984. Interaction of tubulin with chromatin proteins H1 and core histones. J. Biol. Chem. 259 : 15 523—15 531.
- Obrdlik A., Kukalev A., Louvet E. Ö., Farrants A.-K., Caputo L., Percipalle P. 2008. The histone acetyl transferase PCAF associates with actin and hnRNP U for RNA polymerase II transcription. Mol. Cell Biol. 28 : 6342—6357.
- Olave I. A., Reck-Peterson S. L., Crabtree G. R. 2002. Nuclear actin and actin related proteins in chromatin remodeling. Annu. Rev. Biochem. 71 : 755—781.
- Pederson T., Aebi U. 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? J. Struct. Biol. 40 : 3—9.
- Percipalle P., Jonsson A., Nashchekin D., Karlsson C., Bergman T., Guialis A., Daneholt B. 2002. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. Nucl. Acids Res. 30 : 1725—1734.
- Percipalle P., Visa N. 2006. Molecular functions of nuclear actin in transcription. J. Cell Biol. 172 : 967—971.
- Percipalle P., Zhao J., Pope B., Weeds A., Lindberg U., Daneholt B. 2001. Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. J. Cell Biol. 153 : 229—236.
- Philimonenko V. V., Zhao J., Iben S., Dingova H., Kysela K., Kahle M., Zentgraf H., Hofmann W. A., de Lanerolle P., Hozak P., Grummt I. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. Nat. Cell Biol. 6 : 1165—1172.
- 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. Appl. Pharmacol. 199 : 239—250.
- Ronai Z. 1993. Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. Int. J. Biochem. 25 : 1073—1076.
- Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat. Protoc. 1 : 2856—2860.
- Vartiainen M. K. 2008. Nuclear actin dynamics — from form to function. FEBS Lett. 582 : 2033—2040.
- Walsh J. L., Keith T. J., Knoll H. R. 1989. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. Biochim. biophys. acta. 999 : 64—70.
- Wang Y., Gilmore T. D. 2003. Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. Biochim. biophys. acta. 1593 : 115—120.
- Zhu X., Zeng X., Huang B., Hao S. 2004. Actin is closely associated with RNA polymerase II and involved in activation of gene transcription. Biochem. Biophys. Res. Commun. 321 : 623—630.

ANALYSIS OF NUCLEAR PROTEIN COMPLEXES COMPRISING α -ACTININ-4
BY 2D-ELECTROPHORESIS AND MASS-SPECTROMETRY

M. G. Khotin,^{1,} L. V. Turoverova,¹ E. P. Podolskaya,² I. A. Krasnov,² A. V. Solovieva,¹ V. Y. Aksenova,¹
K.-E. Magnusson,³ G. P. Pinaev,¹ D. G. Tentler¹*

¹ Institute of Cytology RAS, ² Institute for Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg,
and ³ Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine, Sweden;
* e-mail: h_mg@mail.ru

Actin-binding protein α -actinin-4 is a member of spectrin super family. It is located in the cytoplasm and in the nucleus. However, nuclear functions of α -actinin-4 are still not clear. In this study, we analyzed composition of nuclear protein complexes associated with α -actinin-4 in A431 cells. Using 2D electrophoresis, we have determined that about 50 different proteins may be associated with nuclear α -actinin-4. Using mass-spectrometry, we analyzed major proteins of these complexes. β -Actin, α - and β -tubulins, ribonucleoprotein A2/B1, which regulates splicing and is associated with β -actin, peroxiredoxin-1, which is involved in oxidative stress, and glycolytic enzyme D-3-phosphoglycerate dehydrogenase were identified by MALDI-TOF. Detection of these proteins in nuclear complexes with α -actinin-4 may suggest that α -actinin-4 is involved in transcription and splicing. Presence of β -actin in the investigated complexes was confirmed by tandem mass-spectrometry (MALDI-TOF-TOF). Immunoprecipitation of nuclear proteins with antibodies against α -tubulin confirmed association of α -actinin-4 with α -tubulin in the protein complex. Nuclear α -actinin-4 constitutes of 105 kDa fullsize isoform and two truncated isoforms of 65 and 75 kDa, whereas only the truncated isoform have been found in nuclear complexes with α -tubulin. These data suggest that α -actinin-4 is associated with a number of different nuclear protein complexes which may carry out different functions in the cell nucleus.

Key words: α -actinin-4, mass-spectrometry.