

НОВАЯ СПЛАЙСИНГОВАЯ ИЗОФОРМА АКТИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АЛЬФА-АКТИНИНА 4 В КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА А431

© В. Ю. Аксенова,^{1,*} М. Г. Хотин,¹ Л. В. Туроверова,¹ Н. М. Юдинцева,¹
К.-Э. Магнуссон,² Г. П. Пинаев,¹ Д. Г. Тентлер¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и

² Отдел клинической и экспериментальной медицины Линчепингского университета, Швеция;

* электронный адрес: vasilisina@gmail.com

Альфа-актинин 4 (ACTN4) относится к актинсвязывающим белкам спектринового суперсемейства. Основными его функциями считаются формирование и стабилизация актиновых фибрилл и фокальных контактов. Кроме того, было показано, что он способен к миграции в ядро и может принимать участие в ядерных процессах. В последние годы появляются данные о присутствии в клетках различных типов, в том числе опухолевых, дополнительных изоформ ACTN4, образованных путем альтернативного сплайсинга. В настоящей работе нами описана новая, ранее не идентифицированная изоформа ACTN4 размером около 80 кДа. Изоформа обнаружена в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 и не детектируется в трансформированных клетках эмбриональной почки HEK293Т, нормальных кератиноцитах и дермальных фибробластах кожи человека. Анализ мРНК, кодирующих ACTN4 в клетках А431, показал присутствие сплайсингового варианта с делецией 2—8-го экзона. Эти экзоны кодируют два кальпонин-гомологичных домена (СН1 и СН2), отвечающих за связывание ACTN4 с F-актином. При гиперэкспрессии в клетках HEK293Т внутриклеточное распределение описанной изоформы ACTN4 (ACTN4ISO) отличалось от полноразмерного белка. В цитоплазме ACTN4ISO распределена диффузно и не солокализуется с актиновым цитоскелетом. Внутриядерное распределение ACTN4ISO также отличается от распределения полноразмерного ACTN4. Методом иммунохимического анализа показано, что выявленная изоформа находится, тем не менее, в составе белковых комплексов с полноразмерным ACTN4 и с большой вероятностью может образовывать с ним в клетках гетеродимеры. Дальнейшие исследования взаимодействий описанной изоформы с белковыми партнерами ACTN4 могут прояснить ее функциональные особенности в клетках линии А431.

Ключевые слова: ACTN4, альтернативный сплайсинг, А431.

Альфа-актинин 4 (ACTN4) является актинсвязывающим белком спектринового суперсемейства. ACTN4 принимает непосредственное участие в организации цитоскелета, пролиферации, миграции, адгезии клеток к субстрату, выполняет роль скаффолда для сборки некоторых цитоплазматических комплексов (Djinovic-Sarugo et al., 2002; Broderick, Winder, 2005). Основной его цитоплазматической функцией является связывание молекул фибриллярного актина (Broderick, Winder, 2005). Кроме того, обнаружены ядерная локализация ACTN4 и его способность к взаимодействию с нецитоскелетными белками как в ядре, так и в цитоплазме (Chakraborty et al., 2006; Hara et al., 2007; Babakov et al., 2008; Khotin et al., 2010). Ранее в работах нашей лаборатории было показано, что ACTN4 солокализуется с транскрипционным фактором NF-κB в ядре и цитоплазме клеток эпидермоидной карциномы человека А431 (Bolshakova et al., 2007; Babakov et al., 2008). Кроме того, масс-спектрометрический анализ белковых партнеров ACTN4 выявил его связь с белками рибонуклеопротеинового семейства hnRNP, участвующими в сплайсинге, процессинге и транспорте мРНК (Khotin et al., 2010). На основании полученных данных можно предположить, что ACTN4 принимает учас-

тие в передаче сигнала от поверхности клетки в ядро и регуляции таких клеточных процессов, как транскрипция и сплайсинг.

Доменная структура ACTN4 хорошо изучена (Revenu et al., 2004; Viré, Backman, 2004). Известно, что ACTN4 находится в клетке в виде гомодимера. N-конец белка содержит два высококонсервативных кальпонин-гомологичных домена (СН1 и СН2), которые необходимы для связывания с F-актином. В центральной части молекулы расположены четыре спектриновых домена (SR1—SR4), выполняющие структурную роль и обеспечивающие димеризацию белка. На С-конце белка находятся два кальцийсвязывающих домена EF-hand. Ген, кодирующий ACTN4, состоит из 21 экзона и кодирует мРНК размером 3966 нуклеотидов. Альтернативный сплайсинг мРНК ACTN4 был описан для ряда клеточных линий и определенных типов опухолей, а сплайсинговые изоформы ACTN4 при этом характеризовались отличной от полноразмерного белка внутриклеточной локализацией (Honda et al., 1998, 2004; Chakraborty et al., 2006). Так, выявленная в клетках линии MCF-7 изоформа с делецией, затрагивающей актинсвязывающий домен, имела преимущественно ядерную локализацию (Chakraborty et al., 2006). Другая

описанная изоформа ACTN4 с тремя аминокислотными заменами имеет большое значение при диагностике мелкоклеточного рака легкого (Honda et al., 2004).

В настоящей работе приведено описание новой изоформы ACTN4, специфичной для клеток эпидермоидной карциномы человека A431, образованной путем альтернативного сплайсинга с выпадением 2—8-го экзона и содержащей внутреннюю делецию двух кальпонин-гомологичных доменов. Изоформа, вероятно, сохраняет способность к димеризации с полноразмерным ACTN4. При гиперэкспрессии распределение изоформы в ядре и цитоплазме отличается от полноразмерного белка.

Материал и методика

Клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431 и культура эмбриональных клеток почки человека (НЕК293Т) 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 °С.

Первичную культуру кератиноцитов получали из кусочков кожи лица здоровых взрослых доноров по методу Рейнвальда с модификациями (Блинова и др., 2002). Выделение фибробластов проводили методом миграции клеток из фрагментов нормальной кожи взрослых доноров (Юдинцева и др., 2008). В качестве источника фибробластов использовали кожу лица и век, полученную в процессе косметологических операций.

Реакция обратной транскрипции. Тотальную РНК получали из клеток A431, НЕК293Т, кератиноцитов и фибробластов кожи человека с помощью TRIzol Reagent (Sigma, США) согласно методике фирмы-производителя. Анализ качества и количества полученной РНК проводили с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (ThermoScientific, США). В реакцию обратной транскрипции брали образцы РНК с отношением длин волн 260/280 и 260/230 нм больше 1.9. Реакцию обратной транскрипции проводили с набором Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) в объеме 20 мкл.

Полимеразная цепная реакция. Амплификацию полноразмерной кДНК гена ACTN4 проводили методом обычной ПЦР на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США). Реакцию проводили в буфере для Taq-полимеразы (Fermentas, Литва), содержащем dNTP в конечной концентрации каждого из них 200 мкМ, 1 мМ каждого праймера, 2—2.5 мМ MgCl₂ и 0.5 ед. акт. Taq-полимеразы в объеме 20 мкл. В качестве праймеров для амплификации кДНК ACTN4 были использованы пары праймеров 5' GCGGCGGAATGGTGGACTA 3' (прямой праймер, F1) и 5' CAGGTCGTCTCGCCATACA 3' (обратный праймер, R1). Анализ ПЦР-продуктов проводили после 35 циклов амплификации, при следующих программных условиях: общая денатурация при 95 °С в течение 5 мин, далее основной цикл: 95 °С, 90 с; 66 °С, 90 с; 72 °С, 3 мин и общий конечный синтез при 72 °С 5 мин. Разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Визуализацию гелей проводили на приборе Chemidoc (Bio-Rad, США) в проходящем УФ-свете.

Получение экспрессионных конструкций. Фрагменты, кодирующие полноразмерный вариант ACTN4, получены методом ПЦР с праймерами F1 и R1.

Стандартную ПЦР с кДНК проводили с помощью Pfu-полимеразы (Fermentas, Литва) в соответствии с описанными выше условиями ПЦР. Для увеличения выхода продукта на 16-м цикле в реакцию добавляли Taq-полимеразу. В качестве матрицы использовали кДНК, полученную с помощью олиго(dT)праймеров с тотальной РНК, выделенной из клеток A431 согласно вышеописанной методике. Соответствующие амплифицированные фрагменты вырезали из геля. Очистку и выделение амплифицированных фрагментов ДНК осуществляли на колонках с помощью набора для выделения ДНК из геля HiYield(TM) Gel/PCR DNA Extraction Kit (Real-Biotech, Тайвань).

ПЦР-продукты, соответствующие кДНК полноразмерного ACTN4 (2736 п. о.) и его укороченного варианта (2079 п. о.), были встроены в вектор pJET1/blunt с помощью набора GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва) согласно протоколу изготовителя. Полученные генетические конструкции использовали для клонирования гена ACTN4 в вектор pCS2MT под CMV-промотор в одной рамке считывания с последовательностью, кодирующей маркерный пептид MYC. Последовательности кДНК гена ACTN4 амплифицировали с помощью Pfu-полимеразы и пар праймеров 5' GGAATTCTATGGTGGACTAC-CACGCGGCG 3' и 5' GCTCTAGATCACAGGTCGCTCTCGCCATACAAG 3', включающих в себя сайты рестрикции для EcoRI и XbaI (Fermentas, Литва) соответственно, согласно описанной выше методике стандартной ПЦР. По сайтам EcoRI и XbaI в дальнейшем проводили клонирование амплифицированных последовательностей в вектор pCS2MT. Полученными экспрессионными плазмидами со вставками полноразмерного ACTN4 и дополнительных вариантов кДНК трансформировали клетки *Escherichia coli* (Маниатис и др., 1984) с последующим выделением плазмидной ДНК из ночной культуры с помощью набора для выделения плазмидной ДНК HiYield™ Plasmid Mini Kit (Real-Biotech, Тайвань). Наличие и точность вставки в векторе проверяли с помощью рестрикции плазмид рестриктазой BamHI (Fermentas, Литва), а также методом секвенирования при помощи набора для секвенирования DY-Enamic ET Terminator Cycle Sequencer Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) на приборе GE Amersham MegaBACE Sequence Analyser (Швеция).

Трансфекцию клеточных культур проводили методом кальций-фосфатной преципитации в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Количество ДНК на чашку Петри диаметром 3.5 см составило 2.5 мкг. Для синхронизации клеточного деления и повышения эффективности трансфекции клетки предварительно (за 16—17 ч до проведения трансфекции) рассеивали на культуральные чашки и за 2 ч до проведения трансфекции проводили смену культуральной среды. Формирование ДНК-кальциевых комплексов проводили в 2-кратном фосфатно-солевом буфере HBS pH 7.05 (280 мМ NaCl, 100 мМ Hepes, 1.5 мМ Na₂HPO₄) в присутствии 1 М CaCl₂. Через 16—17 ч после постановки трансфекции проводили смену трансфекционной среды на свежую. Снятие клеток для иммунофлуоресценции осуществляли на 2-е (через 48 ч) и 4-е (через 96 ч) сут после проведения трансфекции. Увеличение времени пролиферации после проведения трансфекции не приводило к изменению внутриклеточной локализации экзогенных вариантов ACTN4, в связи с чем в настоящей работе представлены данные только для клеток после 48 ч культивирования.

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки линии НЕК293Т в концентрации $1.6 \cdot 10^5$ кл./мл наносили на предварительно силиконизированные покровные стекла, покрытые фибронектином, и культивировали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Далее клетки фиксировали в 10%-ном растворе формалина на PBS в течение 15 мин и пермеабилizировали в 0.1%-ном растворе тритона X-100 на PBS в течение 6 мин. Перед инкубацией препаратов со специфическими антителами стекла обрабатывали 2%-ным раствором BSA в течение 30 мин для уменьшения неспецифического связывания. Выявление локализации экзогенных и эндогенных вариантов АСТН4 проводили с помощью мышиных моноклональных антител против маркерного пептида MYC (Sigma, США), поликлональных кроличьих антител против АСТН4 (Immunoglobulin, Германия) и вторых антител, конъюгированных с зеленым флуоресцентным красителем FITC, против иммуноглобулинов мыши и кролика (Invitrogen, США). Все инкубации с антителами проводили в течение 40 мин, клетки после каждой инкубации трижды промывали раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween-20. Цитоскелет окрашивали 20%-ным раствором родамин-фаллоидина, ядра — раствором DAPI, 1 мкг/мл. Фиксацию препаратов осуществляли в заключающей среде Mounting Medium (Vector Laboratories, США). Препараты исследовали с помощью лазерного конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Германия). Применяли раздельное сканирование сигналов для FITC (488 нм), родамин-фаллоидина (543 нм) и DAPI (405 нм) с последующим совмещением сигналов на программном обеспечении Leica TCS. Изображения получали, используя масляный инвертированный объектив 100×.

Выделение ядерных белков. Перед снятием с культуральных чашек клетки промывали раствором PBS. Далее клетки снимали при помощи резинового скребка, отмывали в буфере, содержащем 0.32 М сахарозы, 10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 20 мМ MgCl₂, 0.1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ, 0.05 мМ PMSF и ингибитор протеаз (Khotin et al., 2010). После центрифугирования при 2500 g 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 при 4 °С. Далее с целью дополнительной очистки ядра ресуспендировали в 0.32 М сахарозном буфере и дважды наслаивали на 0.5 М сахарозу с последующим центрифугированием при 2500 g. Сохранность, чистоту и число ядер контролировали под микроскопом, используя камеру Горяева. Выделение ядерной белковой фракции, содержащей транскрипционные факторы, проводили в течение 45 мин при 4 °С в буфере, содержащем 400 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, рН 7.9, 25 % глицерина, 1.5 мМ MgCl₂, 0.4 мМ ЭДТА, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ и ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария). Остатки ядер осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин), а супернатант использовали для иммунопреципитации.

Иммунопреципитация. Ядерные лизаты разбавляли двумя объемами PBS для уменьшения концентрации соли и инкубировали с протеин-G-сефарозой (GE Healthcare, США) при постоянном перемешивании в течение 1 ч при 4 °С для удаления из пробы белков, неспецифически связывающихся с сефарозой. Затем сефарозу последовательно центрифугируют при 2000 и 10 000 g по 5 мин при 4 °С, супернатант переносят в новые пробирки и инкубировали с соответствующими антителами в течение

ночи. Через 16—17 ч в пробы добавляли свежую порцию протеин-G-сефарозы и инкубировали в течение 4 ч на ротаторе при 4 °С. Иммунопреципитаты отмывали 3 раза в 500 мкл раствора PBS с ингибиторами протеаз на льду.

SDS-электрофорез и Вестерн-блоттинг. Полученные иммунопреципитаты растворяли в буфере Laemmli для проб и инкубировали 7 мин при 98 °С. Затем белковые пробы разделяли в концентрированном градиенте (7—17 %) полиакриламидного геля с SDS при силе тока 100 мА/см² в течение 1—2 ч в трис-глициновом буфере, содержащем 0.1 % SDS. Гель после проведения электрофореза инкубировали в течение 1 ч в трис-глициновом буфере, содержащем 10 % метанола и 0.1 % SDS. Перенос белков с геля на мембрану PVDF (Millipore, США) проводили в течение ночи в трис-глициновом буфере при напряжении 20 В/см². Мембрану фиксировали в метаноле в течение 1 мин и высушивали при комнатной температуре. Перед гибридизацией с антителами мембрану предварительно инкубировали в течение 1 ч в 5%-ном молоке на PBST (PBS, содержащем 0.1 % Tween-20). После этого мембрану отмывали буфером PBST и инкубировали ночь с первичными антителами в буфере PBST при 4 °С. Далее мембрану трижды отмывали буфером PBST, инкубировали 1 ч со вторыми антителами (Sigma, США) в 0.05%-ном молоке, конъюгированными с пероксидазой хрена, проводили 6-кратную отмывку буфером PBST и визуализировали с помощью люминофора ECL (1.25 мМ люминола, 0.2 мМ паракумаровой кислоты и 0.01 % H₂O₂ в 150 мМ Трис-НСl, рН 8.8). Хемилюминесцентное излучение регистрировали на приборе Chemidoc (Bio-Rad, США).

В работе использовали генетические конструкции: плазмиду pJET1/blunt (3128 п. о.), содержащую ген β-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину (Fermentas, Литва), и экспрессионный вектор pCS2MT (4352 п. о.), любезно предоставлен д-ром А. Н. Томилиным (Институт цитологии РАН), содержащий CMV-промотор, ген устойчивости к ампициллину и 6 последовательностей Myc-Tag, а также праймеры, подбор которых проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI и Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и которые были синтезированы в ООО НПФ Синтол (Россия). В работе использованы реактивы: PageRuler Prestained Protein Ladder; GeneRuler 100bp DNA Ladder; O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas, Литва); CaCl₂ (Carl Roth, Германия).

Результаты

Ранее при исследовании ядерных белковых комплексов, включающих в себя АСТН4, методами иммунопреципитации и Вестерн-блот-анализа нами было показано, что в ядрах клеток эпидермоидной карциномы А431 присутствует дополнительная изоформа АСТН4, имеющая мол. массу в области 75—80 кДа (Khotin et al., 2010). В настоящей работе выявили механизм образования данного варианта белка, определили внутриклеточную локализацию и специфичность для культуры клеток А431. Методом субклеточного фракционирования были получены ядерные лизаты клеток А431. Согласно результатам Вестерн-блоттинга (рис. 1, а), во фракции ядерных белковых комплексов, обогащенных слабо связанными с хроматином белками, выявлены две изоформы актинсвязывающего белка АСТН4. Одна из об-

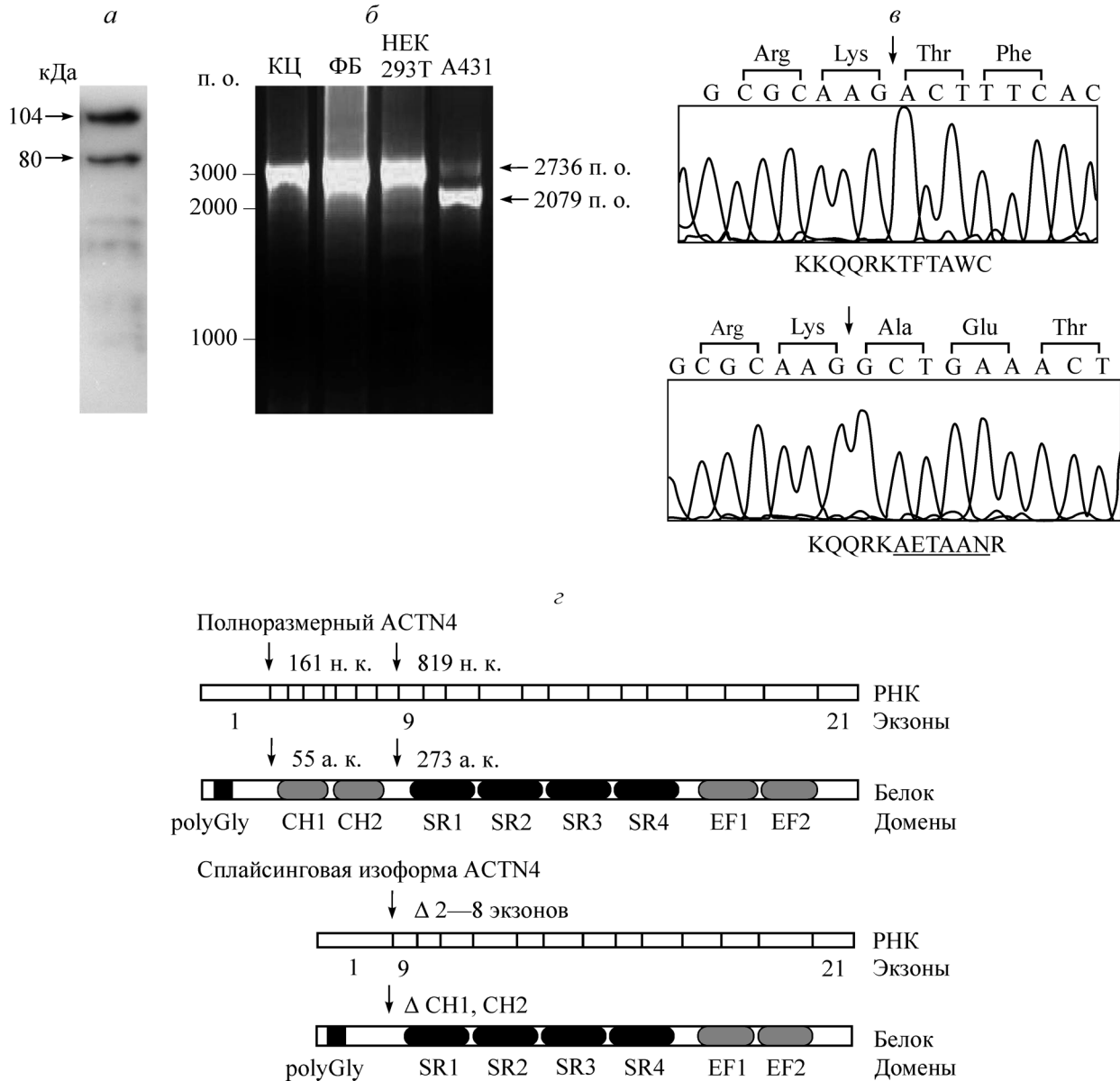


Рис. 1. Выявление и анализ структуры укороченной изоформы ACTN4.

a — иммуноблоттинг ядерного лизата клеток A431 с использованием антител против ACTN4; стрелками указаны полноразмерная (104 кДа) и укороченная (80 кДа) изоформы ACTN4 в клетках A431. *б* — ОТ-ПЦР кДНК ACTN4 в базальных кератиноцитах человека (КЦ), дермальных фибробластах человека (ФБ) и трансформированных клетках линий HEK293Т и A431; стрелками указаны полосы на дорожках, соответствующие кДНК полноразмерного ACTN4 (2736 п. о.) и укороченной изоформы (2079 п. о.); *в* — секвенирование кДНК ACTN4 из клеток A431; верхний спектр — участок последовательности полноразмерного ACTN4; нижний спектр — участок последовательности изоформы ACTN4; квадратными скобками отмечены кодоны, кодирующие аминокислотные остатки; подчеркнуты аминокислотные остатки, соответствующие началу района делеции. *з* — схема последовательностей полноразмерной мРНК гена ACTN4 и ее укороченной изоформы; вертикальными стрелками указан район делеции 161—819-го нуклеотидов (н.) от иницирующего кодона, затрагивающий полноразмерную мРНК ACTN4; делетированные экзоны 2—8 кодируют домены CH1 и CH2 (55—273-й аминокислотные остатки), отсутствующие в сплайсинговой изоформе; polyGly — полиглициновый тракт ACTN4; CH1, CH2 — кальциевые домены ACTN4; SR1—SR4 — спектриновые домены ACTN4; EF1, EF2 — домены EF-hand ACTN4.

наруженных изоформ соответствует по мол. массе полноразмерному ACTN4 (104 кДа), другая выявленная изоформа имеет мол. массу около 80 кДа.

На следующем этапе проанализировали мРНК гена ACTN4 из клеток линии A431, нормальных кератиноцитов человека, фибробластов кожи человека и эмбриональных клеток почки человека линии HEK293Т. Было показано, что все проанализированные клеточные культуры содержали мРНК ACTN4, кодирующую полноразмерный вариант белка, которая соответствовала на гель-электрофорезе ПЦР-фрагменту размером 2736 п. о.

(рис. 1, б). Согласно результатам секвенирования (рис. 1, в, верхний спектр) и выравнивания нуклеотидных последовательностей (представлены только участки последовательности, которые соответствуют району делеции) с помощью программного обеспечения Blast Align было также подтверждено, что фрагмент кДНК размером 2736 нуклеотидов содержит последовательность открытой рамки считывания мРНК гена ACTN4 (NM_004924). В клетках линии A431 выявили дополнительную кДНК меньшего размера — 2079 нуклеотидов (рис. 1, б). Анализ нуклеотидной последовательности показал, что этот ва-

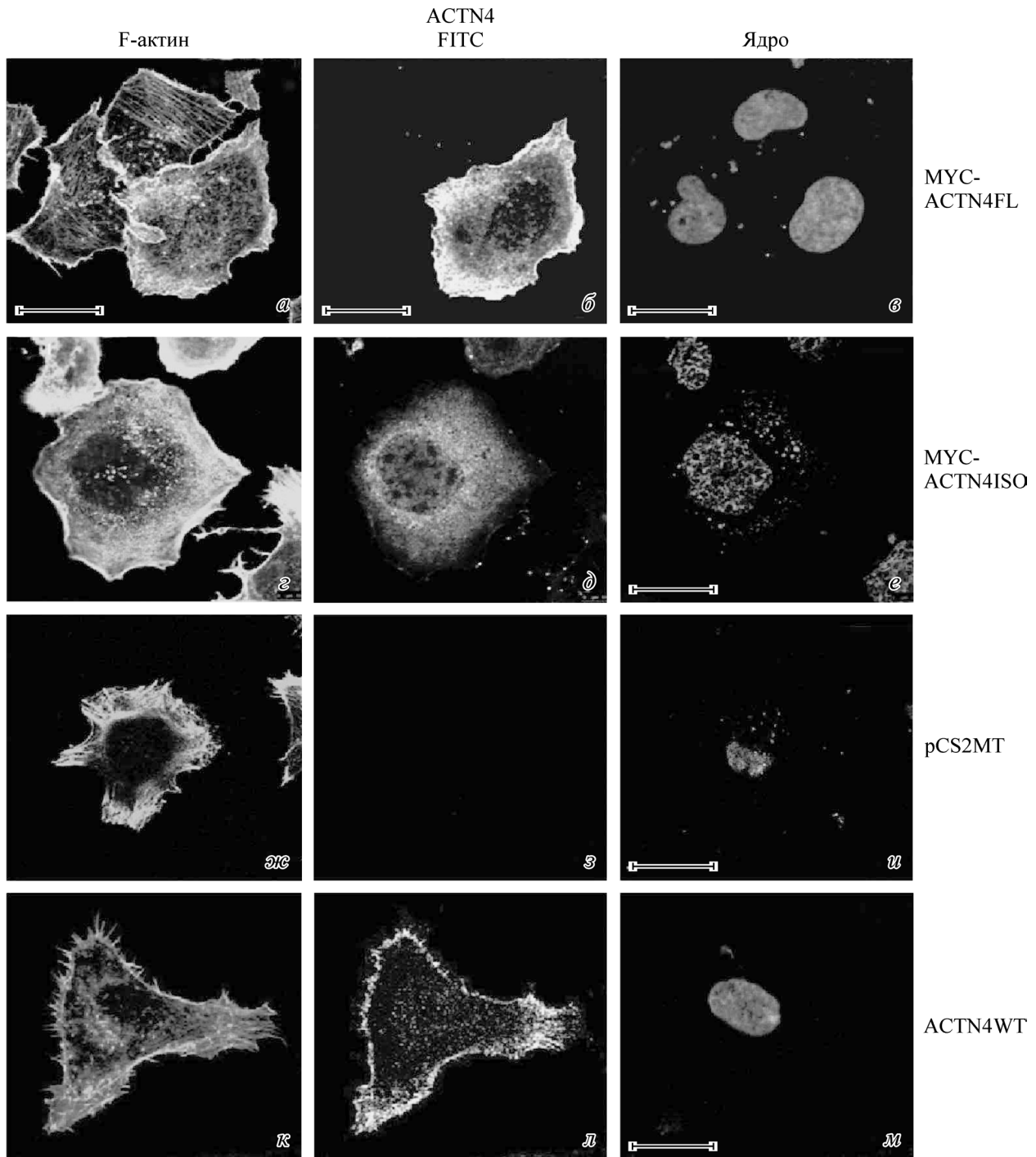


Рис. 2. Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной локализации сплайсинговой изоформы ACTN4 в клетках HEK293T. *a–в* — клетки, трансфицированные плазмидой pCS2MT (ACTN4FL); *г–е* — клетки, трансфицированные плазмидой pCS2MT (ACTN4ISO); *ж–и* — клетки, трансфицированные пустым вектором pCS2MT; *к–м* — нетрансфицированные клетки (ACTN4WT). Микрофотографии актинового цитоскелета (*a, г, ж, к*) окрашены родамином-фаллоидином; ACTN4 визуализирован антителами против MYC-Tag (*б, д, з*) и ACTN4 (*л*), ядра окрашены DAPI (*в, е, и, м*). Масштабные отрезки — 25 мкм.

риант мРНК является продуктом альтернативного сплайсинга мРНК гена *ACTN4*. В данной укороченной изоформе мРНК, как видно на рис. 1, *г*, отсутствовал участок между 161-м и 819-м нуклеотидами (от СТАРТ-кодона), затрагивающий район со 2-го по 8-й экзон включительно (рис. 1, *в*, нижний спектр).

Сопоставление данного района мРНК с последовательностью белка показало, что район делеции приходится строго на два кальпонин-гомо-

гичных домена, принимающих участие в связывании ACTN4 с F-актином. Теоретическое значение мол. массы идентифицированной изоформы составило 79.9 кДа и соответствовало мол. массе идентифицированной нами ранее изоформы ACTN4 в ядрах клеток A431. Данные о структуре выявленной новой изоформы ACTN4ISO были внесены в единый реестр базы данных NCBI, которому был присвоен персональный идентификационный номер GeneBank GU 987085. Таким образом, нами показано, что

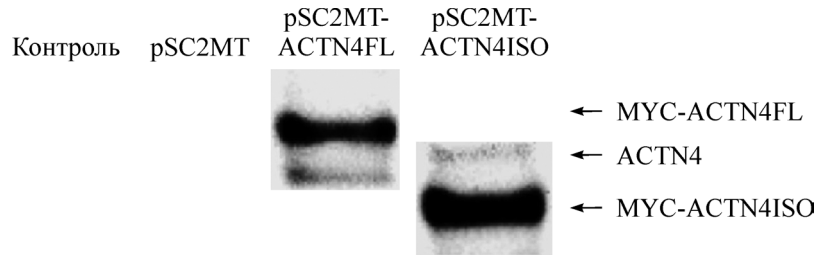


Рис. 3. Иммунопреципитация белковых лизатов клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами pCS2MT-*ACTN4FL* и pCS2MT-*ACTN4ISO* с антителами против MYC-Tag, и последующий иммуноблотинг с антителами против ACTN4.

Контроль — нетрансфицированные клетки HEK293T; pSC2MT — клетки HEK293T, трансфицированные пустым экспрессионным вектором; MYC-ACTN4FL — полноразмерный экзогенный вариант ACTN4; MYC-ACTN4ISO — сплайсинговый экзогенный вариант ACTN4.

фрагмент с мол. массой около 80 кДа, обнаруженный с помощью Вестерн-блот-анализа против антител к ACTN4, является результатом альтернативного сплайсинга гена *ACTN4*.

Для анализа внутриклеточного распределения полноразмерного ACTN4 (ACTN4FL) и ACTN4ISO были сконструированы экспрессионные плазмиды на основе вектора pCS2MT (pCS2MT-*ACTN4FL* и pCS2MT-*ACTN4ISO* соответственно). Последовательности кДНК, кодирующие ACTN4FL и ACTN4ISO, клонировали в вектор экспрессии в одной рамке считывания с сигнальным пептидом MYC. Культуру клеток линии HEK293T, содержащую только полноразмерный вариант ACTN4, трансфицировали экспрессионными плазмидами pCS2MT-*ACTN4FL* и pCS2MT-*ACTN4ISO*, а также экспрессионным вектором без вставки. Иммунофлуоресцентный анализ выявил, что внутриклеточная локализация новой идентифицированной нами изоформы отличается от локализации полноразмерного ACTN4. Согласно полученным результатам, гиперэкспрессия экзогенного полноразмерного ACTN4 (*MYC-ACTN4FL*, рис. 2, б) соответствовала нормальному внутриклеточному распределению эндогенного ACTN4 (*ACTN4WT*, рис. 2, л), при котором основная часть ACTN4 находится в цитоплазме в связанном с F-актином состоянии. Делеция двух кальпонин-гомологичных доменов в новой идентифицированной изоформе (*MYC-ACTN4ISO*) приводила к нарушению взаимодействия белка со структурами актинового цитоскелета и дисперсному распределению его в цитоплазме (рис. 2, д). Внутриядерное распределение ACTN4ISO также отличалось от ACTN4FL. Полученные результаты позволяют предположить, что полноразмерный ACTN4 и выявленная укороченная изоформа могут иметь различные клеточные функции.

Известно, что полноразмерный ACTN4 находится в клетке в виде гомодимера, структура которого поддерживается через взаимодействие спектриновых доменов белка. В связи с этим мы проверили возможность образования гетеродимеров между полноразмерным ACTN4 и его укороченной изоформой. Для этого клетки линии HEK293T, содержащие только полноразмерный вариант ACTN4, трансфицировали экспрессионными конструкциями pCS2MT-*ACTN4FL* и pCS2MT-*ACTN4ISO*. Из трансфицированных клеток получали ядерную фракцию белков, слабо связанных с хроматином, и иммунопреципитировали ядерные белковые комплексы, содержащие экзогенные варианты ACTN4, с антителами против маркерного пептида MYC. Результаты исследования показали, что эндогенный ACTN4 детектируется в комплексах, содержащих экзогенные варианты как полноразмерного

ACTN4 (ACTN4FL), так и ACTN4ISO (рис. 3). Поскольку наличие спектриновых доменов в ACTN4 может опосредовать образование не только гомодимеров, но и гетеродимеров белка, присутствие в клетках A431 дополнительного укороченного варианта ACTN4 может приводить к формированию комплексов между двумя вариантами белка и, возможно, влиять на клеточные функции полноразмерного.

Обсуждение

В настоящей работе мы идентифицировали новую изоформу актинсвязывающего белка ACTN4. Ее структура отлична от структуры полноразмерного ACTN4, выявленного ранее (Honda et al., 1998), за счет внутренней делеции 7 экзона. Сплайсинг данной изоформы идет путем альтернативного соединения 1-го и 9-го экзона по экзон-интронным границам без нарушения рамки считывания. Среди проанализированных нами клеточных линий только клетки эпидермоидной карциномы человека A431 обладали этой изоформой, что дает возможность сделать предположение о ее специфичности для данного вида клеток.

Согласно данным литературы, для гена *ACTN4* существует несколько тканеспецифичных изоформ (Honda et al., 2004; Chakraborty et al., 2006). Один из тканеспецифичных вариантов ACTN4 был идентифицирован в злокачественных клетках мелкоклеточного рака легкого (Honda et al., 2004). При детальном исследовании структуры гена *ACTN4* было выявлено, что внутри 8-го интрона присутствует дополнительная копия 8-го экзона, встраивание которой в последовательность мРНК приводит к синтезу белка с тремя аминокислотными заменами в 248-м (Asn->Gly), 250-м (Ala->Leu) и 263-м (Ser->Cys) положениях. Однако следует отметить, что данную изоформу белка выявили также в нормальных тканях семенников и в небольшом количестве в клетках мозга (Honda et al., 2004). Заметим, что данный вид альтернативного сплайсинга является эволюционно консервативным и встречается во многих группах позвоночных и некоторых видов беспозвоночных (Lek et al., 2010).

Позднее была выявлена еще одна сплайсинговая изоформа ACTN4 в культурах клеток MCF-7 и HeLa (Chakraborty et al., 2006). Сравнение нуклеотидной последовательности полноразмерного *ACTN4* и настоящей изоформы показало, что эта укороченная изоформа содержит внутреннюю делецию нуклеотидов 263—1433, что соответствует району 89—478 аминокислотных остатков, включающему в себя часть первого кальпонин-гомо-

гичного домена (CH1), второй кальпониин-гомологичный домен (CH2) и с 1-го по 2-й спектринный домен. Обнаруженный укороченный вариант ACTN4 в отличие от полноразмерного варианта имеет в основном ядерную локализацию, однако специфических функций данной изоформы выявлено не было (Chakraborty et al., 2006).

В связи с отсутствием в выявленной изоформе ACTN4 актинсвязывающих доменов мы предположили, что ее внутриклеточная локализация может отличаться от полноразмерной изоформы белка. Это предположение было подтверждено методом иммунофлуоресценции. Так, мы выявили, что в отличие от полноразмерного ACTN4 укороченная изоформа не связана со структурами актинового цитоскелета и локализована преимущественно в цитоплазматической и околядерной областях клеток HEK293T. Мы предполагаем, что во многом такое распределение в клетке обусловлено отсутствием в структуре ACTN4 кальпониновых доменов, которые опосредуют его взаимодействие с F-актином. Кроме того, новая изоформа белка нами выявлена в комплексах с эндогенным ACTN4 и, следовательно, может влиять на его клеточные функции. Поскольку в сплайсинговой изоформе ACTN4 отсутствуют домены, обеспечивающие ее взаимодействие с фибриллярным актином, возможно, она влияет на те функции ACTN4, которые связаны с его участием в организации цитоскелета. Однако трансфекция клеток HEK293T вектором, кодирующим экзогенный вариант ACTN4ISO, не привела к видимому изменению организации цитоскелета. Тот факт, что как полноразмерная так и укороченная изоформы были найдены в ядерных экстрактах A431, дает возможность предположить, что сплайсинговая изоформа меньшей молекулярной массы может влиять на ядерные функции белка, однако это еще предстоит исследовать.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009—2013 гг., в рамках реализации мероприятия 1.3.2 («Проведение научных исследований целевыми аспирантами» № П174), программы Visby Шведского института и Росийского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00174-а).

Список литературы

Блинова М. И., Юдинцева Н. М., Калмыкова Н. В., Кузьминых Е. В., Юрлова Н. А., Овчинникова О. А. 2002. Действие меланинов из черных дрожжевых грибов на культивируемые

клетки человека. I. Пролiferация кератиноцитов и фибробластов. Цитология. 44 (8) : 780—787.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Методы геной инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.

Юдинцева Н. М., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2008. Особенности организации цитоскелета у фибробластов нормальной, рубцовой и эмбриональной кожи человека, распластанных на белках внеклеточного матрикса. Цитология. 50 (10) : 861—867.

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 α -actinin-4. Exp. Cell Res. 314 : 1030—1038.

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

Broderick M. J. F., Winder S. J. 2005. Spectrin, α -actinin, and dystrophin. Adv. Prot. Chem. 70 : 203—233.

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.

Djinovic-Carugo K., Gautel M., Ylanne J., Young P. 2002. The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. FEBS Lett. 513 : 119—123.

Hara T., Honda K., Shitashige M., Ono M., Matsuyama H., Naito K., Hirohashi S., Yamada T. 2007. Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. Mol. Cell. Prot. 6 : 479—491.

Honda K., Yamada T., Endo R., Ino Y., Gotoh M., Tsuda H., Yamada Y., Chiba H., Hirohashi S. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. J. Cell Biol. 140 : 1383—1393.

Honda K., Yamada T., Seike M., Hayashida Y., Idogawa M., Kondo T., Ino Y., Hirohashi S. 2004. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. Oncogene. 23 : 5257—5262.

Khotin M., Turoverova L., Aksenova V., Barlev N., Borutinskite V. V., Vener A., Bajenova O., Magnusson K. E., Pinaev G. P., Tentler D. 2010. Proteomic analysis of ACTN4-interacting proteins reveals it's a putative involvement in mRNA metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 397 : 192—196.

Lek M., MacArthur D. G., Yang N., North K. 2010. Phylogenetic analysis of gene structure and alternative splicing in alpha-actinins. Mol. Biol. Evol. 27 : 773—780.

Revenu C., Athman R., Robine S., Louvard D. 2004. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 : 635—646.

Virel A., Backman L. 2004. Molecular evolution and structure of alpha-actinin. Mol. Biol. Evol. 21 : 1024—1031.

Поступила 21 VII 2011

NOVEL SPLICING ISOFORM OF ACTIN-BINDING PROTEIN ALPHA-ACTININ 4 IN EPIDERMAL CARCINOMA CELLS A431

V. Yu. Aksenova,¹ * M. G. Khotin,¹ L. V. Turoverova,¹ N. M. Yuditseva,¹ K.-E. Magnusson,² G. P. Pinaev,¹ D. G. Tentler¹

¹ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia, and ² Linkoping University, Sweden;

* электронный адрес: vasilisina@gmail.com

Alpha-actinin 4 (ACTN4) belongs to actin binding proteins of the spectrin superfamily. Structural organisation of actin fibres and focal contacts is considered to be its primary function in a cell. Besides that, nucleocytoplasmic shuffling of ACTN4 and its involvement in nuclear processes were demonstrated. Lately, additional isoforms of ACTN4 resulted from an alternative splicing has been described in various cell types and malignant

tumours. In this study, we present investigation of a novel ACTN4 isoform of 80 kDa. The isoform was found in human epidermoid carcinoma cells A431, and it was not detected in human skin fibroblasts, normal human keratinocytes and transformed human embryonic cells HEK293T. Analysis of ACTN4 mRNA in A431 cells showed the presence of a splice variant that lacked the exons 2—8. The deleted exons code two calponin homology domains responsible for ACTN4 binding to F-actin. Intracellular distribution of the described ACTN4 isoform (ACTN4ISO) overexpressed in HEK293T cells differed from that of the full size protein. In the cytoplasm, ACTN4ISO was allocated diffusively with no colocalisation with actin cytoskeleton structures. Intranuclear distribution of ACTN4ISO also differed from that of the full size ACTN4. Nevertheless, immunochemical analysis demonstrated possibility of ACTN4ISO to form heterodimers with the full size protein. Additional investigations of novel isoform interactions with ACTN4 protein partners might clarify its functional features in A431 cells.

Key words: ACTN4, alternative splicing, A431.
