

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ СОСТАВА ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТРОПОМИОЗИН

© Д. Е. Бобков,¹ А. А. Айзеништадт,¹ И. В. Кропачёва,¹ Г. П. Пинаев^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Факультет биомедицинской физики и биоинженерии С.-Петербургского государственного Политехнического университета;
электронный адрес: bobkovde@yandex.ru

При анализе структурных перестроек актинового цитоскелета клеток тропомиозин был обнаружен в цитоплазме в виде частиц или белковых комплексов, не связанных с актиновыми структурами. Для изучения состава и свойств этих белковых комплексов в настоящей работе разработан метод их выделения из клеток без разрушения структур цитоскелета. С помощью гель-фильтрации, электрофореза и Вестерн-блоттинга охарактеризован белковый состав выделенных комплексов, содержащих тропомиозин. Они представляют собой сложные мультимолекулярные комплексы с мол. массой около 700 кДа. В составе этих комплексов помимо тропомиозина и актина методом масс-спектрометрии идентифицированы белки теплового шока Hsp70 и Hsp90, а также миозин-9. Показано также, что под действием ингибитора деацетилаза трихостатина А, вызывающего в клетках перестройки актинового цитоскелета, одновременно происходят изменение количества тропомиозиновых частиц и перераспределение тропомиозина между цитозолем и цитоскелетом. Полученные результаты дают основание предполагать, что данные мультимолекулярные комплексы могут принимать участие в процессах реорганизации системы актиновых микрофиламентов.

Ключевые слова: тропомиозин, белковые комплексы, актиновый цитоскелет, миозин-9, белки теплового шока.

Тропомиозин — это эволюционно консервативный α -спиральный актинсвязывающий белок, димеризующийся с образованием палочковидных суперспиралей, которые располагаются вдоль центральной канавки актиновых микрофиламентов и участвуют в поддержании их структуры. Отдельная молекула тропомиозина слабо взаимодействует с F-актином. Стабильное связывание обеспечивается за счет полимеризации тропомиозиновой голова-к-концу в спираль на поверхности актиновой фибриллы (Johnson, Smillie, 1977). В мышечных и неммышечных клетках тропомиозин контролирует взаимодействие актиновых фибрилл с миозином, регулируя сокращение (Brown, Cohen, 2005). В клетках разных тканей млекопитающих выявлено несколько изоформ тропомиозина, различающихся по молекулярной массе. Различные изоформы способны образовывать комплексы с рядом актинсвязывающих белков, вовлеченных в работу цитоскелета, и смена разных изоформ в клетке неразрывно связана с характером организации актинового цитоскелета и определяет его динамические свойства и стабильность (Lindberg et al., 2008; O'Neill et al., 2008). Так, менее развитую организацию актинового цитоскелета, характерную для трансформированных и опухолевых клеток, связывают с заменой высокомолекулярных изоформ тропомиозина низкомолекулярными (Miyado et al., 1997; Gunning et al., 2008). При этом восстановление экспрессии высокомолекулярных тропомиозинов приводит к ингибированию онкогенных проявлений и восстановлению нормального клеточного фенотипа (Gunning et al., 1997). Так, например, тро-

помиозин-1 считается онкосупрессором: показано, что его экспрессия приводит к нормализации фенотипа *src*- и *ras*-трансформированных фибробластов, и в этом процессе принимает участие сигнальный путь Rho (Prasad et al., 1999; Shah et al., 2001).

Обычно тропомиозин находится в неммышечных клетках в связанном с актиновыми структурами виде и в основном в составе стресс-фибрилл (Lazarides, 1975). Вместе с тем при иммунофлуоресцентном анализе цитоскелета с помощью антител к тропомиозину его обнаружили не только в составе актиновых структур, но и в виде не зависящих от них крупных частиц, распределенных в цитозоле, в том числе в ламеллах и филоподиях, где обычно интенсивно полимеризуется актин (Hillberg et al., 2006; Grenklo et al., 2008).

Молекулярная организация и функциональная роль этих частиц в настоящее время неизвестны. Вполне возможно, что они вовлечены в процесс реорганизации цитоскелета под влиянием внешних стимулов и являются предшественниками будущих актиновых структур, а также могут принимать участие в проведении внутриклеточных сигналов. Для того чтобы выяснить, в какой мере тропомиозиновые частицы связаны с осуществлением этих процессов, необходимо прежде всего определить их белковый состав и проследить за динамикой тропомиозиновых комплексов в процессе перестроек актинового цитоскелета.

С этой целью в настоящей работе проведено определение количества и белкового состава тропомиозиновых

частиц в клетках с различной степенью развитости актинового цитоскелета и изменения этих параметров при реорганизации актинового цитоскелета под действием трихостатина-А, который изменяет степень ацетилирования клеточных белков. В качестве основных объектов исследования были избраны нормальные и трансформированные клетки, которые, как было показано ранее, имеют различную пространственную организацию системы актиновых микрофиламентов (Арэ и др., 1999). Для того чтобы в процессе выделения из клеток лабильных мультимолекулярных комплексов не происходило их разрушения, был разработан новый оригинальный метод, позволяющий сохранять их целостность.

Материал и методика

В работе использованы нормальные эмбриональные фибробласты крысы (клетки REF), иммортализованные ранним районом *E1A* аденовируса 5-го типа человека (клетки E1A) и затем трансформированные введением онкогена *cHa-ras* (клетки E-Ras) (Поспелова и др., 1990), а также клетки линий A431 и HeLa, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали на среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10 % сыворотки крови эмбрионов коров (Биолот, Россия) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Для стимуляции клеток среду заменяли на бессывороточную, содержащую трихостатин А (Sigma, США) в концентрации 50—500 нг/мл.

Для определения белкового состава исследуемых частиц было важно максимально сохранить их целостность. Обычно при выделении белковых комплексов клетки лизируют и затем экстрагируют соответствующими буферами. При полном разрушении клеток и последующих процедурах, включающих в себя центрифугирование и промывание осадков, нестабильные мультимолекулярные белковые комплексы могут разрушаться. Поэтому для решения поставленных задач разработали метод выделения белковых комплексов из монослойных клеточных культур, позволяющий сохранять целостность выделяемых частиц и структур цитоскелета.

Для быстрого выделения цитоплазматических белковых комплексов использовали лизирующий SF-буфер pH 7.0 (10 mM K-фосфатный буфер, содержащий 100 mM NaF, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5 M сахарозы, 1 % Тритона X-100 и 0.1 mM PMSF) с добавлением ингибитора протеаз (Sigma, США). Этот буфер сохраняет в экстрактах исходное соотношение между мономерными и полимерными формами актлина (Blikstad, Carlsson, 1982). Монослой клеток в чашке Петри промывали PBS, после чего PBS тщательно отбирали, а чашку ставили на лед и на клетки каплями равномерно наносили небольшое количество SF-буфера, таким образом чтобы буфер тонким слоем распределился по клеточному пласту (из расчета 100 мкл на 1 чашку диаметром 9 см), и выдерживали 3 мин. Затем чашку наклоняли и в течение 1 мин собирали стекающий с клеточного пласта лизат с вышедшими из клеток белками цитозоля (быстрый экстракт), который переносили в следующую промытую PBS чашку с клетками. Процедура последовательного переноса лизирующего буфера с чашки на чашку позволила накопить достаточное количество белка без его разбавления буфером. На оставшиеся после получения быстрого экстракта клетки повторно наносили SF-буфер, инкубировали 10 мин на

леду и собирали разрушенные клетки скребком, затем центрифугированием при 12 000 g в течение 10 мин осаждали не растворимую в Тритоне X-100 фракцию (цитоматрикс), а супернатант отбирали (медленный экстракт). Клетки в процессе лизирования фотографировали при помощи системы визуализации и архивирования для инвертированного микроскопа (Зенит, Россия). Для контроля сохранности структур цитоскелета 10 мкл лизирующего SF-буфера наносили на промытые PBS клетки, выращенные на покровном стекле, через 3 мин покровное стекло наклоняли и позволяли буферу стечь в течение 1 мин, после чего клетки фиксировали 3%-ным формалином на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре и выявляли тропомиозин и актиновый цитоскелет методом не прямой иммунофлуоресценции.

Для геле-фильтрации в каждом эксперименте использовали 5 чашек Петри (диаметром 9 см) с клетками на 4—12-м пассаже, достигшими состояния субконфлюэнтного монослоя. Клетки лизировали в 500 мкл SF-буфера, быстрый и медленный экстракты фильтровали через фильтр 0.45 мкм (Millipore, США) и наносили на колонку superose 6HR (GE Healthcare, США) в системе FPLC Pharmacia System (Pharmacia, Швеция). Калибровку колонки осуществляли, используя набор белков (Amersham, Швеция): рибонуклеазу А (13.7 кДа), овальбумин (48.1 кДа), альбумин (67 кДа), альдолазу (184 кДа), каталазу (232 кДа), ферритин (401.4 кДа), тиреоглобулин (669 кДа), а также декстран голубой 2000 (2000 кДа). В процессе хроматографии выяснилось, что сахароза и Тритон X-100 препятствуют хорошему разделению мультимолекулярных комплексов, поэтому элюцию проводили F-буфером (100 mM NaF, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ и 10 mM K-фосфатного буфера, pH 7.0), который не содержал этих компонентов. Скорость элюции была 0.2 мл/мин, фракции собирали на леду по 0.4 мл. Относительное количество белка в подвижной фазе на выходе из колонки регистрировали в динамическом режиме с помощью оптического детектора UV-1 (Pharmacia, Швеция) при длине волны 280 нм. Белок в собранных фракциях осаждали добавлением 0.05%-ного дезоксихолата натрия и 5%-ной трихлоруксусной кислоты с последующим центрифугированием при 15 000 g в течение 5 мин.

Осажденные белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS (Laemmli, 1970). Использовали 12.5%-ный гель. После электрофореза гель окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым или осуществляли иммуноблоттинг (Towbin et al., 1979). Перенос белков с геля на мембрану Immobilon-P (Millipore, США) проводили в Трис-глициновом буфере, pH 8.3, содержащем 10 % метанола и 0.1 % SDS. Иммуноблоттинг проводили в соответствии с протоколом ECL (Amersham, США). Мембрану промывали 20 мин буфером TBST (25 mM Трис-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl и 0.1 % Твин-20) и блокировали места неспецифического связывания 5%-ным обезжиренным сухим молоком, разведенным на TBST, в течение 1 ч. Для усиления сигнала при иммуноблоттинге использовали субстрат SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, США). Хемилуминесцентное излучение регистрировали при помощи системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). В работе использовали моноклональные антитела (TM311) мыши против высокомолекулярных изоформ тропомиозина и моноклональные антитела мыши против α -актина (Sigma, США). В качестве вторых антител использовали кроличьи антитела против иммуноглобулинов

мышь, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). При проведении иммунопреципитации для удаления неспецифически связывающихся белков в полученные в результате гель-фильтрации фракции предварительно добавляли сефарозу с пришитым белком G (Amersham, Швеция) из расчета 50 мкл на 1 мл и инкубировали, аккуратно перемешивая, 1 ч при 4 °С, затем сефарозу осаждали центрифугированием при 2000 g. К супернатанту добавляли антитела и инкубировали, аккуратно перемешивая, в течение ночи при 4 °С, после этого добавляли сефарозу с белком G и инкубировали, аккуратно перемешивая, в течение 4 ч при 4 °С. Образовавшиеся комплексы с сефарозой осаждали центрифугированием при 2000 g, промывали 4 раза PBS и разделяли методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом. При сравнительном анализе содержания белков в электрофоретических пробах нагрузки выравнивали по количеству общего белка в пробе, определенного методом Брэдфорд (Bradford, 1976).

Распределение актина и тропомиозина в препаратах распластанных клеток выявляли методом непрямой иммунофлуоресценции. Для этого 100 мкл суспензии клеток ($1.6 \cdot 10^5$ кл./мл) наносили на покровные стекла и культивировали в течение ночи при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Клетки фиксировали 3%-ным формалином на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, пермеабилizовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 на PBS 15 мин при комнатной температуре и окрашивали в течение 40 мин при комнатной температуре специфическими антителами, указанными выше. В качестве вторых антител использовали кроличьи антитела к мышинным антигенам и козы антитела к антигенам кролика, конъюгированные с FITC или TRITC (Sigma, США). Структуры актинового цитоскелета выявляли окраской родамин-фаллоидином или FITC-фаллоидином (10 мин при 37 °С). В качестве заключительной среды использовали Mounting medium (Pharmacia Biotech., Швеция). Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica (Германия). Для возбуждения флуоресценции FITC использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм и HeNe-лазер с длиной волны 543 нм для родамина и TRITC. Раздельно сканировали сигнал FITC (флуоресценция в области 500—530 нм) и TRITC (580—640 нм). Совмещение сигналов FITC и TRITC или FITC и родамина (Merge) проводили с помощью компьютерной программы Leica Confocal Software.

Для идентификации белков, входящих в состав выделенных тропомиозиновых комплексов, использовали метод масс-спектрометрии. Все реактивы для трипсинолиза и масс-спектрометрии приобретали в Sigma (США). Гидролиз белка трипсином проводили в полиакриламидном геле. Для этого из геля вырезали кусочек объемом 1—2 мм³ и для удаления красителя дважды промывали в течение 30 мин при 37 °С в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли 100 мкл ацетонитрила и помешивали на шейкере в течение 10 мин. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 50 мкл 10 мМ раствора дитиотреитола в 0.1 М NH₄HCO₃ и инкубировали в течение 45 мин при 56 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры и удалением растворителя. Затем добавляли 50 мкл 20 мМ раствора йодацетамида в 0.1 М NH₄HCO₃ и выдерживали в течение 40 мин при комнатной температуре в темноте, после чего удаляли йодацетамид, промывали 5 мин в 50 мкл 0.1 М

NH₄HCO₃, добавляли 50 мкл 100 %-ного ацетонитрила и перемешивали 5 мин. Затем раствор отбирали, а кусочек геля высушивали и добавляли к нему 5 мкл раствора модифицированного трипсина на 0.01%-ном растворе HCl в концентрации 12 мкг/мл и 20 мкл 0.05 М NH₄HCO₃. Гидролиз проводили в течение 12 ч при 37 °С, затем в пробу добавляли 25 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде и через 15 мин активного перемешивания добавляли 25 мкл 100%-ного ацетонитрила, после чего пробу интенсивно перемешивали для извлечения пептидов из геля. Далее раствор пептидов отбирали в отдельный эппендорф и высушивали. Для масс-спектрометрического исследования гидролизаты растворяли в 5 мкл 0.5%-ной ТФУ в 10%-ном растворе ацетонитрила, на мишень наносили 1 мкл раствора образца и 0.3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле с 0.5 % ТФУ) и полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на tandemном MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-модуле после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005 %. Идентификацию белков по пептидному фингерпринту осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводили в базе данных NCBI среди белков млекопитающих с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

Для оценки динамики распределения тропомиозина между цитоплазматической и цитоскелетной фракциями после обработки клеток трихостатином брали по одной культуральной чашке (3 см в диаметре) с субконфлюэнтным монослоем клеток на точку. Каждую чашку промывали бессывороточной средой и наполняли трихостатин А-содержащей средой (опыт) или бессывороточной средой DMEM (контроль). Лизирование клеток производили в контроле и через 5, 10, 30 и 60 мин действия трихостатина. Для быстрой экстракции на клетки наносили по 50 мкл SF-буфера в каждую чашку, полученный экстракт центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин. Для выравнивания нагрузок проводили измерение концентрации белка в пробах по методу Брэдфорд (Bradford, 1976) и электрофоретически разделяли равные количества белка.

Результаты

В распластанных на стекле фибробластах REF высокомолекулярные изоформы тропомиозинов выявляются моноклональными антителами (ТМ 311) как на стресс-фибриллах, так и в цитоплазме в составе отдельных частиц (рис. 1). Для выделения этих частиц нами был разработан метод быстрой экстракции, описанный выше. Прежде всего необходимо было выяснить, возможно ли с помощью разработанного метода получение белковых комплексов, не связанных с актиновыми структурами, без разрушения клеток, а также установить, остаются ли частицы в клетках после быстрой экстракции.

Наблюдения за клетками А431 в процессе лизирования SF-буфером (рис. 2) и иммунофлуоресцентные данные (рис. 3) показывают, что после быстрой экстракции

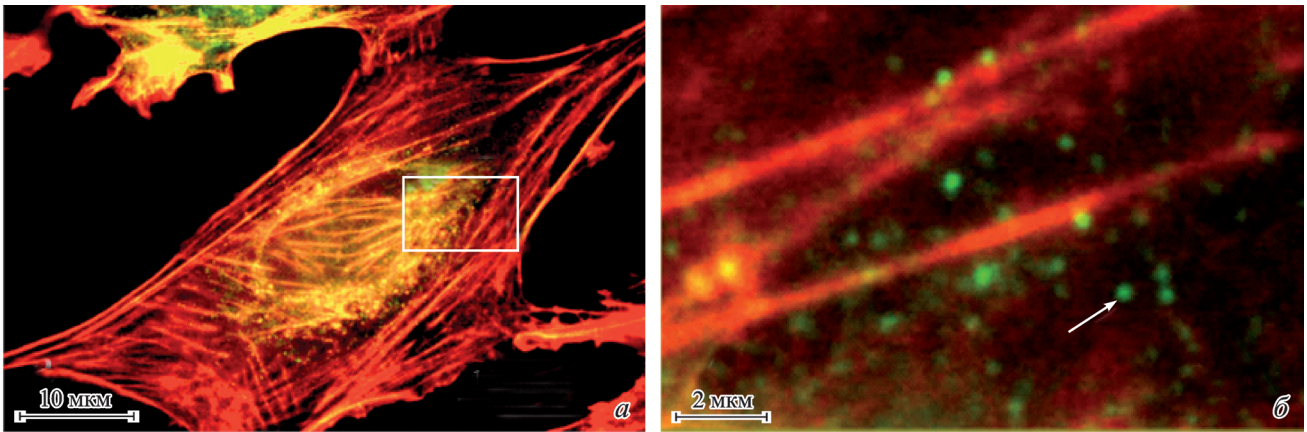


Рис. 1. Частицы тропомиозина в цитоплазме эмбрионального фибробласта крысы.

а — фибробласт, актин окрашен красным, тропомиозин — зеленым; желтый — совмещение окраски. *б* — отмеченная рамкой область на фото *а*. Стрелка указывает на выявленную антителами против тропомиозина частицу в цитоплазме.

клетки остаются распластанными и сохраняют исходную структуру цитоскелета, ядра остаются неповрежденными. При световой микроскопии заметно, что часть цитоплазмы, различимая в виде затемненной области вокруг ядра, вымывается из клеток (рис. 2, *а'*—*в'*). Тропомиозиновые частицы после быстрой экстракции перестают выявляться в области цитоплазмы моноклональными антителами против высокомолекулярных изоформ и обнаруживаются вокруг ядра (рис. 3, *а*, *б*).

Для проверки эффективности выделения мультимолекулярных белковых комплексов с помощью нового разработанного метода была проведена сравнительная оценка результатов быстрой экстракции и повторной, медленной экстракции тех же клеток с помощью гель-хроматографии на колонке Superose 6 (рис. 4).

Проведенный электрофоретический анализ с последующим Вестерн-блотом показал, что при быстрой экстракции несколько высокомолекулярных изоформ тропомиозина и актин выявляются в области 500—800 кДа. В медленных экстрактах, полученных из тех же клеток

после быстрой экстракции, комплексов, содержащих тропомиозин, в этой же высокомолекулярной области обнаружено не было, что свидетельствует о том, что они действительно находятся в цитозоле в составе высокомолекулярных комплексов. Актин после медленной экстракции выявлялся только в низкомолекулярной области, соответствующей мономерному белку (рис. 4).

Для того чтобы выяснить, какие еще белки входят в состав высокомолекулярных комплексов, содержащих тропомиозин, но не связанных с цитоскелетом, провели иммунопреципитацию моноклональными антителами против высокомолекулярных изоформ тропомиозина из объединенных фракций 13—16, полученных после гель-хроматографии быстрого экстракта из клеток REF. В этих фракциях содержались комплексы, соответствующие мол. массам в пределах 500—800 кДа. Вестерн-блот подтвердил наличие тропомиозина в выделенных комплексах (рис. 5, *в*). При электрофоретическом разделении полученного иммунопреципитата помимо трех белковых полос в области 35—40 кДа, соответствующих изофор-

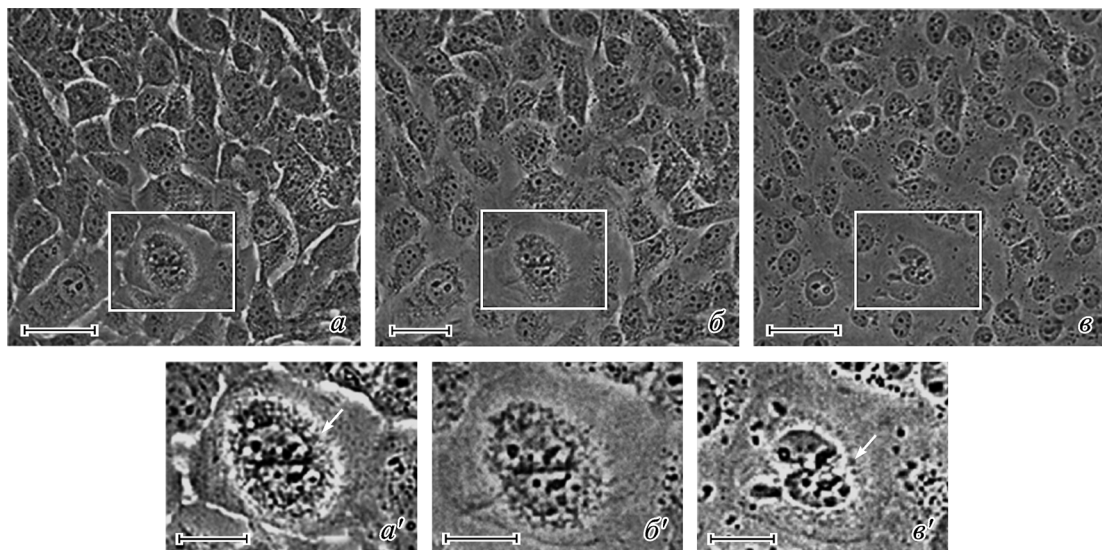


Рис. 2. Быстрая экстракция цитоплазматических белков из монослойной культуры клеток лизирующим SF-буфером.

Прижизненные фотографии клеток A431 до лизирования (*а*), во время первого нанесения лизирующего буфера (*б*) и после сбора быстрого экстракта (*в*). *а'*—*в'* — отмеченные рамками области на фото *а*—*в* соответственно. Стрелка (*а'*, *в'*) указывает на вымываемую цитоплазму. Масштабные линейки — *а*—*в* — 50 мкм; *а'*—*в'* — 25 мкм.

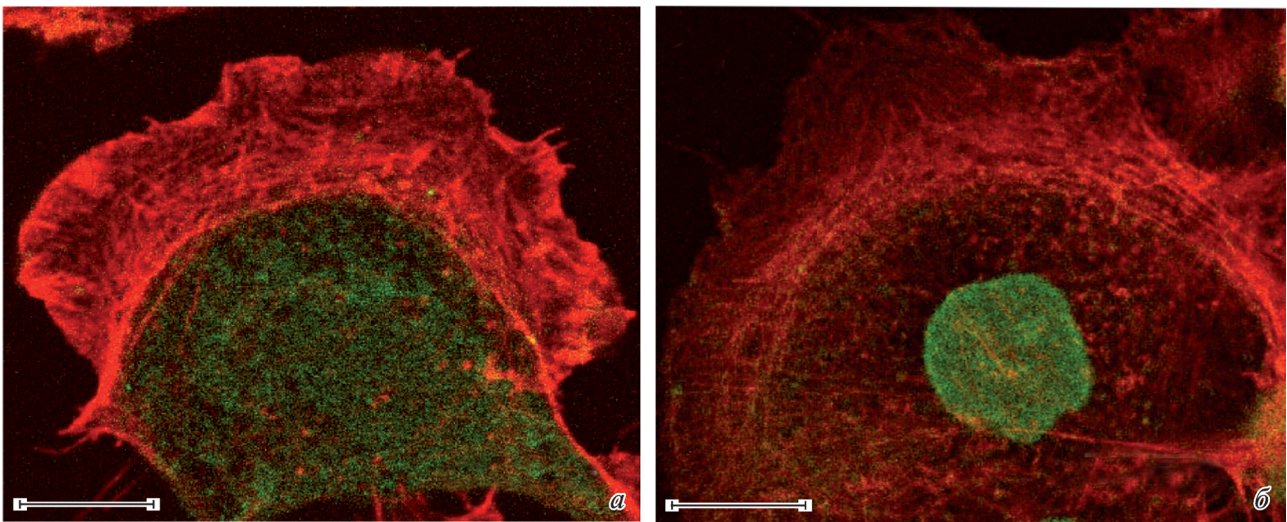


Рис. 3. Структуры актинового цитоскелета клеток A431 до (а) и после (б) быстрой экстракции цитоплазматических белков. Иммунофлуоресцентный анализ.

Красным окрашен актин, зеленым — тропомиозин. Масштабные линейки — 10 мкм.

мам тропомиозина, были дополнительно выявлены еще мажорные полосы с мол. массами 70, 90 и 200 кДа.

Соответствующие мажорным полосам участки геля были вырезаны и проведен масс-спектрометрический анализ. Выяснилось, что полоса в области 200 кДа соответствует миозину-9 (немышечная изоформа 1), а полосы 70 и 90 кДа соответствуют белкам теплового шока Hsp70 и Hsp90 (рис. 5, з).

Для того чтобы выяснить, в какой мере наличие содержащих тропомиозин мультимолекулярных комплексов может быть связано со степенью развитости актинового цитоскелета, определили содержание тропомиозина в нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластах крысы, которые, как было показано ранее (Аре и др., 1999), существенно различаются по этому параметру. Электрофоретический анализ с последующим

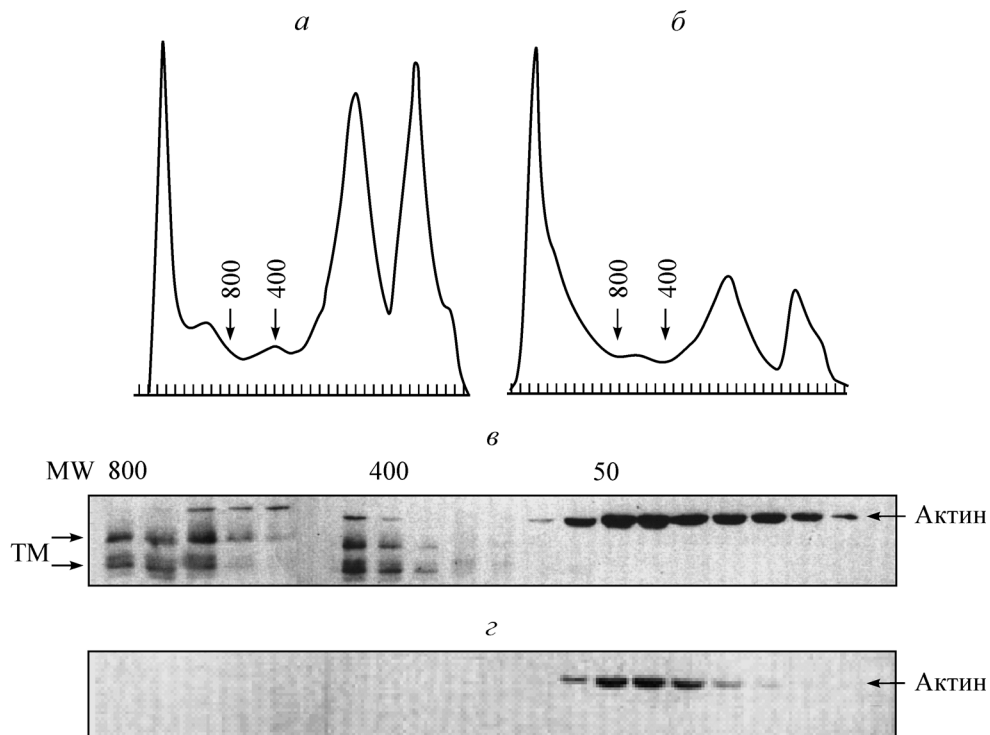


Рис. 4. Гель-хроматографическое разделение (а, б) и иммуноблоттинг (в, з) быстрого (а, в) и медленного (б, з) экстрактов из эмбриональных фибробластов крысы (REF).

Стрелками (а, б) указаны калибровочные молекулярные массы фракций. ТМ — окраска моноклональными антителами против высокомолекулярных изоформ тропомиозинов, стрелки (в) указывают на две изоформы; актин — окраска моноклональными антителами против бета-актина; в — указаны калибровочные молекулярные массы (MW) фракций, кДа.

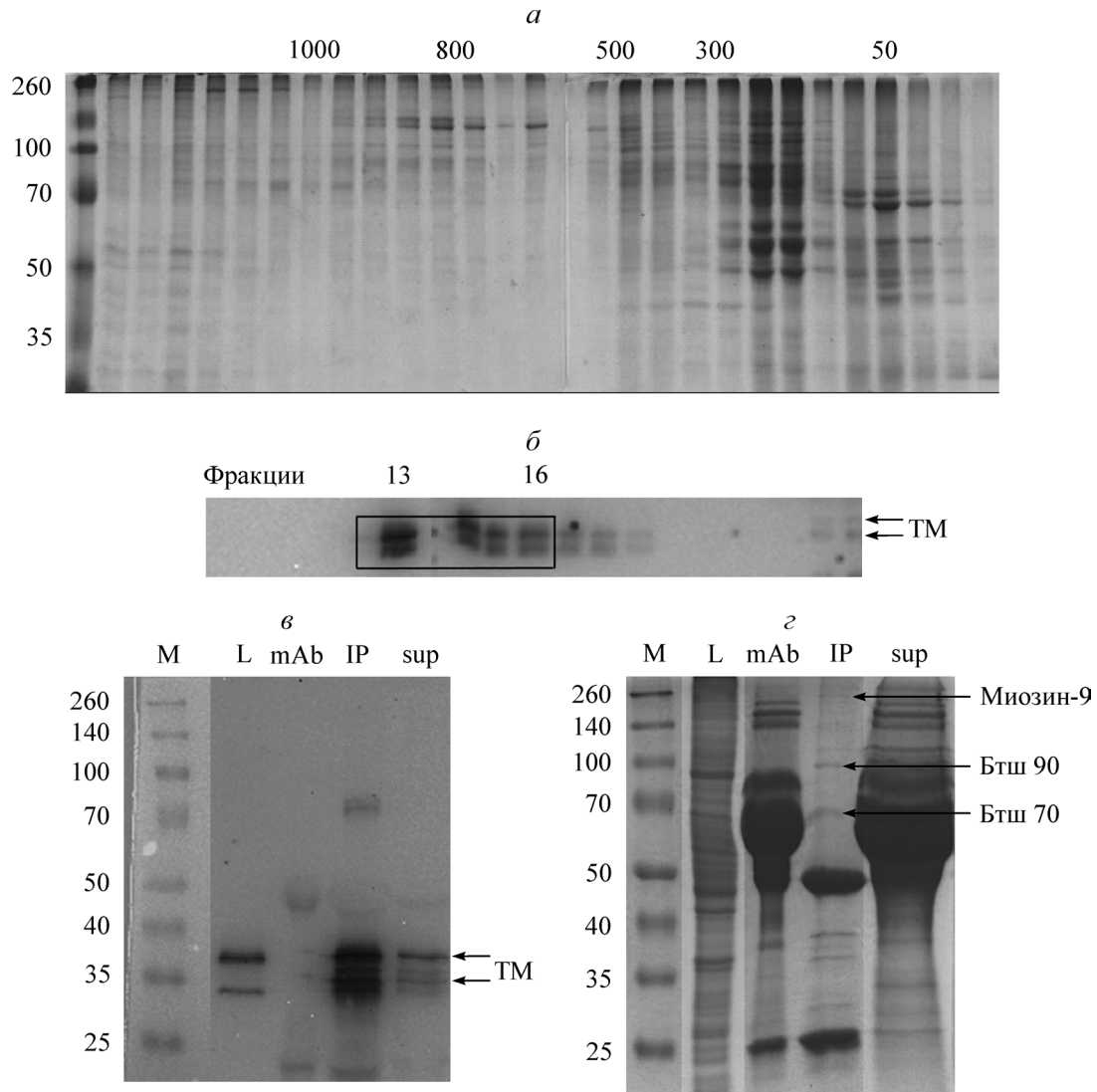


Рис. 5. Анализ белкового состава выделенных из цитозоля фибробластов тропомиозиновых частиц.

a — электрофореграмма фракций, полученных в результате гель-фильтрации быстрого экстракта из эмбриональных фибробластов крысы (REF); *по горизонтали* — калибровочные молекулярные массы фракций, кДа; *по вертикали* — молекулярные массы форезного маркера, кДа. *б* — Вестерн-блот фракций, содержащих тропомиозин (ТМ, фракции 13—16 соответствуют мол. массам около 500—800 кДа); *рамкой* выделены фракции, которые собирали для дальнейшей иммунопреципитации. *в* — Вестерн-блот после электрофоретического разделения тотального клеточного лизата (L, позитивный контроль), моноклональных антител к высокомолекулярным изоформам ТМ (mAb, негативный контроль), иммунопреципитатов, осажденных данными антителами из фракций 13—16 (IP), и непреципитированных белков фракций (sup); окраска на ТМ (две изоформы указаны *стрелками*). *Цифры слева* — маркерные молекулярные массы, кДа (дорожка М). *з* — электрофореграмма разделения тех же проб, что и на *в*; идентифицированные с помощью масс-спектрометрии белки в составе тропомиозиновых комплексов указаны *стрелками*.

Вестерн-блоттингом показал, что в быстрых экстрактах из нормальных (REF) и immortalized (E1A) фибробластов содержится большое и примерно равное количество тропомиозина, а в трансформированных клетках (E-Ras) оно значительно ниже. В то же время в осадке, содержащем структуры цитоскелета, прослеживается снижение содержания тропомиозина в immortalized клетках и практически полное отсутствие в трансформированных (рис. 6, *a*). Для того чтобы выяснить, в каких белковых комплексах сосредоточен обнаруженный в цитозоле тропомиозин, был проведен гель-хроматографический анализ, который показал, что в быстром экстракте из immortalized фибробластов тропомиозин выявляется в основном в высокомолекулярной области распределения. Кроме того, он содержится в незначительных ко-

личествах во фракциях, содержащих комплексы с меньшей молекулярной массой (рис. 6, *б*).

Ранее было показано, что при совместном действии на клетки ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-аза-2'-дезоксцитидина и ингибитора гистоновых деацетилаз трихостатина-А в клетках происходит усиление синтеза гельзолина, а также удалось увеличить экспрессию тропомиозина-1 в клетках карциномы легкого и в *ras*-трансформированных фибробластах (Mielnicki et al., 1999). Экспрессия тропомиозина-1 в клетках карциномы легкого приводит к Rho-зависимому восстановлению нормального цитоскелета и чувствительности к анокизу (Bharadwaj, Prasad, 2002; Bharadwaj et al., 2005). Поэтому для того чтобы выяснить, в какой мере наблюдаемые изменения содержания в цитозоле исследуемых клеток высокомоле-

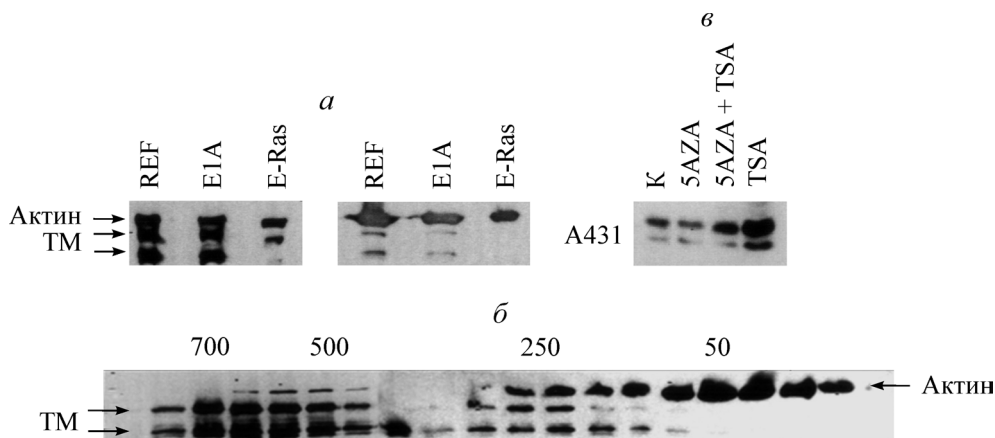


Рис. 6. Содержание тропомиозина (TM) в цитозоле клеток REF, E1A, E-Ras и A431.

Вестерн-блот-анализ с окраской на TM (две высокомолекулярные изоформы указаны стрелками) и актин. *а* — содержание TM в цитозоле (*слева*) и цитоматрикс (*справа*) в нормальных (REF), иммортализованных (E1A) и трансформированных (E-Ras) фибробластах крысы. *б* — распределение актина и TM во фракциях после гель-фильтрации фракции лизата клеток E1A, растворимой в Тритоне X-100. *в* — накопление TM в цитозоле контрольных клеток A431 (K) и после раздельного и совместного действия ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-аза-2'-дезоксифлуридина (5AZA, 0.9 мкМ) и ингибитора гистоновых деацетилаз трихостатина-A (TSA, 50 нг/мл). Время действия — 24 ч.

кулярных изоформ тропомиозинов могут быть связаны с подобным явлением, исследовали совместное и раздельное влияние этих агентов на клетки A431, обладающих слабо развитым цитоскелетом. Действие демитилирующего агента оказалось слабее, чем совместное действие агентов; самым значительным оказался ответ на применение одного трихостатина-A. Через 1 сут после его применения уровень содержания высокомолекулярных изоформ тропомиозинов значительно увеличился (рис. 6, в).

Так как трихостатин-A подавляет активность деацетилаз, в данных условиях эксперимента увеличение содержания тропомиозина в клетках могло сопровождаться и его ацетилированием, способствующим более прочному взаимодействию с фибриллярным актином.

Для того чтобы проверить, приводит ли увеличение содержания тропомиозинов в клетках к изменениям в структуре актинового цитоскелета, действию трихоста-

тина-A подвергали клетки линии HeLa, обладающие слабо развитым цитоскелетом, что в общем характерно для опухолевых клеток. Оказалось, что трихостатин-A в довольно высокой концентрации (500 нг/мл) вызывает через 1 сут появление в клетках большого количества стресс-фибрилл, а сами клетки приобретают фибробластоподобную морфологию (рис. 7).

В связи с полученными результатами важно было выяснить, может ли подобная реорганизация актиновых структур сопровождаться количественными изменениями тропомиозиновых частиц в цитозоле. Обычно при действии на клетку разнообразных внешних стимулов, индуцирующих сигнальные процессы, в ней происходят быстрые перестройки актинового цитоскелета. В данном случае в качестве действующего агента использовали трихостатин-A, который вызывает, с одной стороны, подобные перестройки, а с другой, как было показано выше, — повышает содержание тропомиозина в клетке.

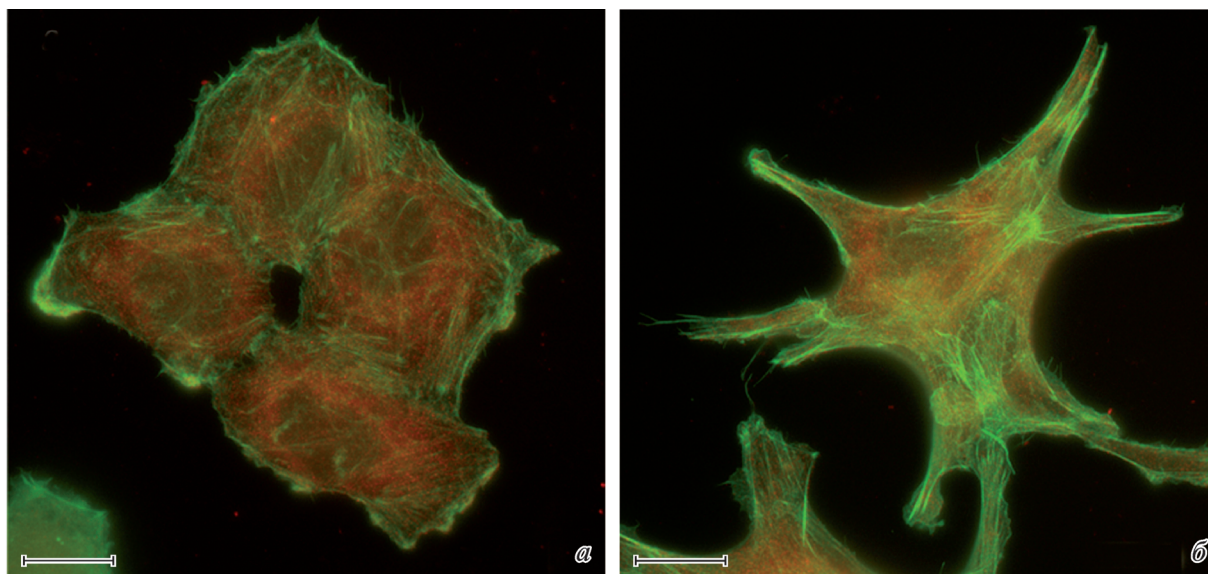


Рис. 7. Клетки HeLa в контроле (*а*) и через 1 сут после действия 500 нг/мл трихостатина (*б*).

Зеленым окрашен актин, красным — тропомиозин. Масштабные линейки — 10 мкм.

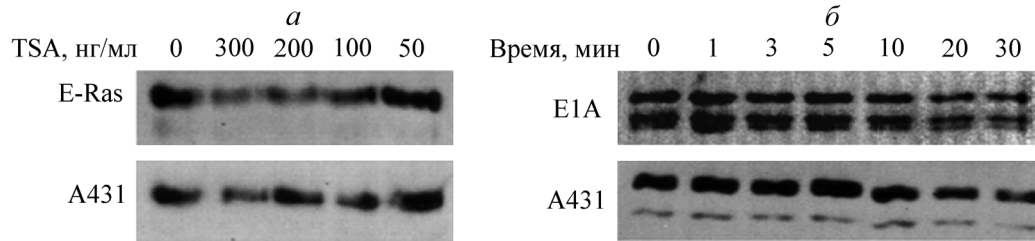


Рис. 8. Содержание тропомиозина в цитозоле клеток E-Ras, E1A и A431 через 24 ч после стимуляции трихостатином-А (TSA) в различных концентрациях (а) и через различное время после стимуляции TSA в концентрации 50 нг/мл (б). Вестерн-блот-анализ.

Следует отметить, однако, что длительное действие трихостатина в высоких концентрациях помимо перестройки цитоскелета вызывало последующее открепление от субстрата и гибель значительной части популяции клеток. Поэтому для проведения планируемых экспериментов было необходимо прежде всего выявить оптимальные концентрации трихостатина, вызывающие повышение содержания в клетках тропомиозина, но не сопровождающиеся их гибелью. На клетках A431 и E-Ras было определено влияние разных концентраций трихостатина на их жизнеспособность и уровень содержания тропомиозина. Оказалось, что максимальное увеличение содержания тропомиозина при сохранении жизнеспособности клеток происходит после действия на них 50 нг/мл трихостатина в течение 24 ч (рис. 8, а). Поэтому в дальнейших экспериментах использовали именно эту концентрацию трихостатина.

Электрофоретический анализ и последующий Вестерн-блотинг показали, что в различных клеточных лини-

ях под действием 50 нг/мл трихостатина-А в течение 30 мин, когда обычно происходят быстрые перестройки цитоскелета, наблюдается последовательное снижение содержания тропомиозина в цитоплазме (рис. 8, б).

Для сопоставления изменений количества тропомиозина в составе мультимолекулярных комплексов с этапами реорганизации актинового цитоскелета действию трихостатина-А подвергали нормальные фибробласты, содержащие большое количество таких комплексов.

Данные иммунофлуоресценции показывают, что через 10 мин после действия трихостатина происходят снижение количества свободных тропомиозиновых частиц в цитоплазме и появление более крупных агрегатов, ассоциированных со стресс-фибриллами (рис. 9, а, б). Наряду с этим анализ динамики распределения тропомиозина между цитоплазматической и цитоскелетной фракциями после обработки клеток трихостатином показывает, что в быстром экстракте, содержащем не связанные с клеточ-

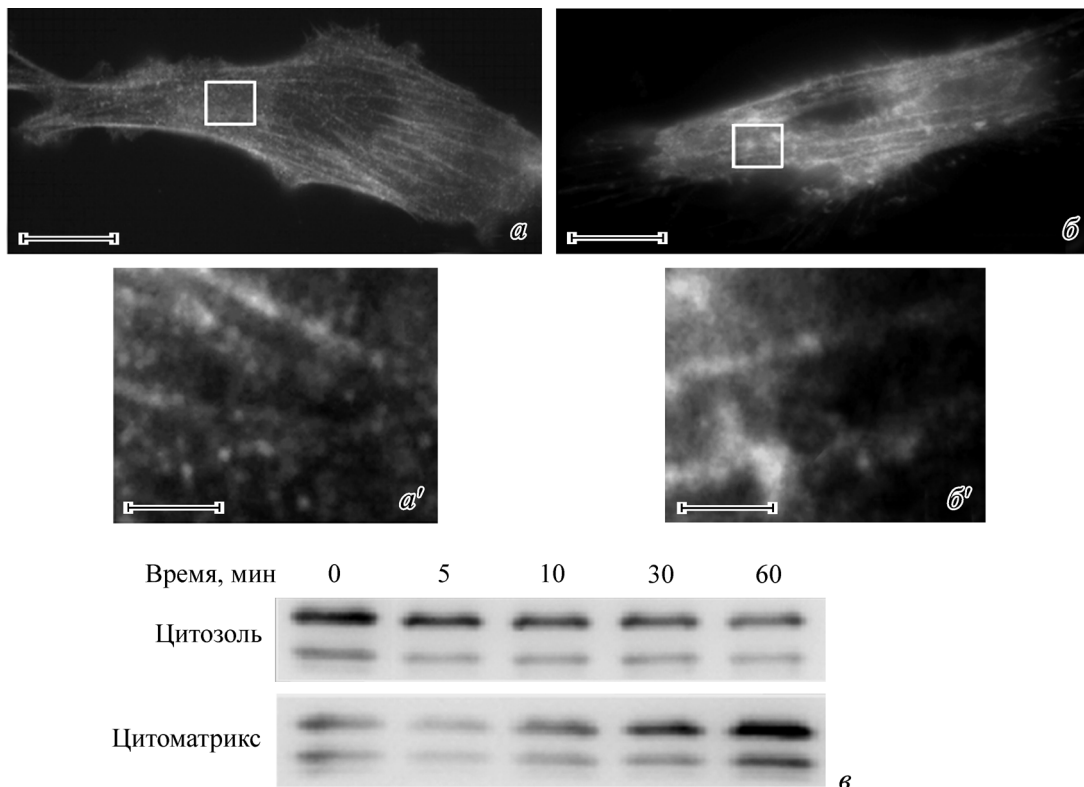


Рис. 9. Иммунофлуоресцентный анализ распределения ТМ в цитоплазме эмбриональных фибробластов крысы до (а, а') и через 10 мин (б, б') после действия трихостатина-А (50 нг/мл).

а', б' — выделенные рамкой участки на фото а, б. в — Вестерн-блот-анализ содержания высокомолекулярных изоформ ТМ в цитозоле и цитоматрикс эмбриональных фибробластов крысы (REF) через различное время после стимуляции трихостатином-А (50 нг/мл). Масштабная линейка: а, б — 10 мкм; а', б' — 1 мкм.

ными структурами цитоплазматические белки и белковые комплексы, количество тропомиозина постепенно снижается в течение 1 ч. В то же время содержание белка в последующем медленном экстракте увеличивается (рис. 9, в). Полученные результаты свидетельствуют в пользу высказанного предположения о том, что ацетилированный под действием трихостатина тропомиозин из мультимолекулярных комплексов может переходить в прочно связанную с цитоскелетом форму.

Обсуждение

Весь комплекс проведенных в данной работе исследований доказывает, что кратковременное, локальное нарушение целостности плазматической мембраны клеток позволяет быстро извлекать из них находящиеся в цитоплазме белки и мультимолекулярные белковые комплексы без повреждения структур цитоскелета. При этом клетки с сильно развитым цитоскелетом остаются прикрепленными к субстрату и даже практически не изменяют своей формы.

Цель настоящей работы, ради которой был разработан этот новый оригинальный метод быстрой экстракции цитоплазматических белковых комплексов, состояла в определении белкового состава и возможной роли обнаруженных ранее в клетках тропомиозиновых частиц, не связанных со структурами актинового цитоскелета. С помощью гель-хроматографии и Вестерн-блот-анализа нами показано, что после быстрой экстракции в клетках действительно больше не остается мультимолекулярных комплексов, содержащих тропомиозин. В процессе детальной разработки метода выделения тропомиозиновых частиц мы обратили внимание на тенденцию к снижению их содержания в цитоплазме при действии на клетки ростовых факторов, вызывающих цитоскелетные перестройки (Grenklo et al., 2008). Отсюда возникло предположение о том, что они могут принимать участие в регуляции реорганизации актиновых структур и что в состав этих же комплексов могут входить и сигнальные молекулы, вовлеченные в эти процессы.

Проведенные далее исследования показали, что тропомиозиновые частицы действительно представляют собой сложные белковые комплексы с высокой молекулярной массой, включающие в себя помимо тропомиозина и актина ряд других молекул.

В качестве первого шага на пути выяснения их полного состава были идентифицированы белки Hsp70, Hsp90 и миозин-9. Обнаруженные в составе тропомиозиновых частиц белки теплового шока могут принимать участие в формировании белковых комплексов, поддержании их стабильности или в обеспечении взаимодействия с другими комплексами. В частности, оба этих белка способны связываться с микротрубочками (Liang, MacRae, 1997).

Существенный интерес представляет выявление в комплексах миозина-9. В отличие от мышечного миозина, работающего в виде димера из двух полипептидных цепей («шагающий» механизм из двух миозиновых головок), миозин-9 перемещается вдоль актиновой фибриллы в виде одиночной полипептидной цепи. Это было доказано путем прямого микроскопического наблюдения за передвивающимся по нанесенным на стекло фибриллам миозином, меченным зеленым флуоресцирующим белком (GFP). Предполагается «гусеничный» механизм подобного перемещения (Nishikawa et al., 2006). Молекулы миози-

на, лишенные хвостового домена, двигаются по актиновым фибриллам в сторону минус-конца (Inoue et al., 2002), а полноразмерные — к плюс-концу (O'Connell, Mooseker, 2003). Миозин-9 особенно интересен тем, что в хвостовом участке содержит последовательность, гомологичную белку, активирующему ГТФазы (GAP) (Post et al., 1998; Bähler, 2000). GAP стимулирует ГТФазную активность малой ГТФазы Rho, которая в свою очередь стимулирует образование стресс-фибрилл, являющихся сократимыми актомиозиновыми филаментами (Hall, 2005), а также посредством активации Rho-киназы, которая ингибирует фосфатазу регуляторных легких цепей, регулирует активность самих миозинов (Воротников и др., 2009). Таким образом, миозин-9 является регулятором Rho и моторной сигнальной молекулой, принимающей активное участие в организации актинового цитоскелета. Это подтверждается также и экспериментами по прижизненной микроскопии, в которых было выявлено, что миозин-9 привлекается в клетке к местам активной полимеризации актина — ламеллоподиям, раффлам и филоподиям (Van den Boom et al., 2007).

Способность тропомиозина агрегировать *in vitro* была показана достаточно давно. Так, выделенный из мышц кролика тропомиозин агрегирует в растворе с низкой ионной силой, образуя частицы, мол. массы которых уменьшаются от 13.5 до 65 кДа по мере добавления солей (при pH 6.5 ионную силу изменяли от 0.1 до 1.1) (Tsaio et al., 1951). В этой связи неудивительно, что тропомиозин и в цитоплазме может образовывать агрегаты. Однако функция этих агрегатов остается неясной. Вполне возможно, что они принимают активное участие в перестройках актинового цитоскелета, являясь затравками для формирования микрофиламентов и одновременно регулируя процесс полимеризации актина.

Как показали проведенные эксперименты, тропомиозин выявляется в составе высокомолекулярных фракций как в нормальных, так и в иммортализованных фибробластах. Сравнение распределения тропомиозина во фракциях после гель-хроматографии экстрактов из нормальных и иммортализованных фибробластов (рис. 3; б) показывает, что размер тропомиозиновых частиц зависит от типа и степени развитости актинового цитоскелета. Вполне возможно, что при этом могут различаться белковый состав и свойства этих частиц. В частности, может различаться степень ацетилирования молекул тропомиозина.

В дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* экспрессируется единственная изоформа тропомиозина — Cdc8, и на протяжении всего клеточного цикла 80 % белка ацетилировано, что значительно увеличивает степень его взаимодействия с актином. Ацетилированный Cdc8 ингибирует связывание миозина с актином (Skoumpla et al., 2007).

Известно, что ацетилирование тропомиозинов приводит к повышению их способности связываться с актином, а тропомиозины без N-концевых ацетильных остатков или с удаленными концами неспособны полимеризоваться и связываться с актином (Urbancikova, Hitchcock-DeGregori, 1994). Так как характер взаимодействия тропомиозина с актином может изменяться в зависимости от степени его ацетилирования (Cho et al., 1990), от этого может зависеть и образование тропомиозиновых частиц, изменение их количества и состава. Для проверки возможности таких изменений на клетки воздействовали ингибитором деацетилаз трихостатином-А. Было показано, что трихостатин в течение короткого времени способен приводить

к ацетилированию цитоплазматических белков независимо от изменения экспрессии соответствующих генов (Blagosklonny et al., 2002). Если трихостатин может способствовать ацетилированию тропомиозина, то последний под действием трихостатина может переходить из свободных цитоплазматических частиц в прочно связанную с цитоскелетом форму. В пользу этого предположения свидетельствуют, в частности, данные иммунофлуоресцентного анализа, показывающие снижение под действием трихостатина содержания тропомиозина в цитозоле фибробластов различных линий.

Несмотря на полученные результаты, поддерживающие высказанные предположения, необходимо проведение дальнейших исследований для получения прямых доказательств изменения степени ацетилирования тропомиозина в комплексах и их непосредственного влияния на полимеризацию актина. Остается открытым также вопрос о том, в какой степени изменяется белковый состав тропомиозиновых частиц и какие еще белки в них входят.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00174) и программы РАН по молекулярной и клеточной биологии.

Список литературы

- Арз А. Ф., Поспелова Т. В., Пинаев Г. П. 1999. Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного матрикса. Цитология. 41(8) : 707—715.
- Воротников А. В., Щербакова О. В., Кудряшова Т. В., Тарасова О. С., Ширинский В. П., Пфитцер Г., Ткачук В. А. 2009. Фосфорилирование миозина как основной путь регуляции сокращения гладких мышц. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 95(10) : 1058—1073.
- Поспелова Т. В., Кислякова Т. В., Медведев А. В., Светликова С. Б., Поспелов В. А. 1990. Особенности трансформированного фенотипа и экспрессия индикаторных САТ-плазмид в эмбриональных фибробластах крысы, иммортализованных E1Aad5-онкогеном и трансформированных E1A + cHa-ras онкогенами. Цитология. 32 (1) : 148—155.
- Bähler M. 2000. Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? Biochim. biophys. acta. 1496 : 52—59.
- Bharadwaj S., Prasad G. L. 2002. Tropomyosin-1, a novel suppressor of cellular transformation is downregulated by promoter methylation in cancer cells. Cancer Lett. 183 : 205—213.
- Bharadwaj S., Thanawala R., Bon G., Falcioni R., Prasad G. L. 2005. Resensitization of breast cancer cells to anoikis by tropomyosin-1: role of Rho kinase-dependent cytoskeleton and adhesion. Oncogene. 24 : 8291—8303.
- Blagosklonny M. V., Robey R., Sackett D. L., Du L., Traganos F., Darzynkiewicz Z., Fojo T., Bates S. 2002. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity. Mol. Cancer Ther. 1 : 937—941.
- Blikstad I., Carlsson L. 1982. On the dynamics of the microfilament system in HeLa cells. J. Cell Biol. 93 : 122—128.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Brown J. H., Cohen C. 2005. Regulation of muscle contraction by tropomyosin and troponin: how structure illuminates function. Adv. In Prot. Chem. 71 : 121—159.
- Cho Y. J., Liu J., Hitchcock-DeGregori S. E. 1990. The amino terminus of muscle tropomyosin is a major determinant for function. J. Biol. Chem. 265 : 538—545.
- Grenklo S., Hillberg L., Rathje L.-S. Z., Pinaev G., Schutt C. E., Lindberg U. 2008. Tropomyosin assembly intermediates in the control of microfilament system turnover. Eur. J. Cell Biol. 87 : 905—920.
- Gunning P., O'Neill G., Hardeman E. 2008. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. Physiol. Rev. 88 : 1—35.
- Gunning P., Weinberger R., Jeffrey P. 1997. Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis. Anat. Embryol. 195 : 311—315.
- Hall A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. Biochem. Soc. Trans. 5 : 891—895.
- Hillberg L., Zhao Rathje L.S., Nyakern-Meazza M., Helfand B., Goldman R. D., Schutt C. E., Lindberg U. 2006. Tropomyosins are present in lamellipodia of motile cells. Eur. J. Cell Biol. 85 : 399—409.
- Inoue A., Saito J., Ikebe R., Ikebe M. 2002. Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor. Nat. Cell Biol. 4 : 302—306.
- Johnson P., Smillie L. B. 1977. Polymerizability of rabbit skeletal tropomyosin: effects of enzymic and chemical modifications. Biochemistry. 16 : 2264—2269.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Lazarides E. 1975. Tropomyosin antibody: the specific localization of tropomyosin in nonmuscle cells. Seminars Cancer Biol. 65 : 549—561.
- Liang P., MacRae T. H. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. J. Cell Sci. 110 : 1431—1440.
- Lindberg U., Schutt C. E., Goldman R. D., Nyakern-Meazza M., Hillberg L., Rathje L. S., Grenklo S. 2008. Tropomyosins regulate the impact of actin binding proteins on actin filaments. Adv. Exp. Med. Biol. 644 : 223—231.
- Mielnicki L. M., Ying A. M., Head K. L., Asch H. L., Asch B. B. 1999. Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cell. Exp. Cell Res. 249 : 161—167.
- Miyado K., Sato M., Taniguchi S. 1997. Transformation-related expression of a low-molecular-mass tropomyosin isoform TM5/TM30nm in transformed rat fibroblastic cell lines. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123 : 331—336.
- Nishikawa M., Nishikawa S., Inoue A., Iwane A. H., Yanagida T., Ikebe M. 2006. A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX. Biochem. Biophys. Res. Commun. 343 : 1159—1164.
- O'Connell C. B., Mooseker M. S. 2003. Native Myosin-IXb is a plus-, not a minus-end-directed motor. Nat. Cell Biol. 5 : 171—172.
- O'Neill G. M., Stehn J., Gunning P. W. 2008. Tropomyosin as interpreters of the signaling environment to regulate the local cytoskeleton. J. Cell Biol. 18 : 35—44.
- Post P. L., Bokoch G. M., Mooseker M. S. 1998. Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. J. Cell Sci. 7 : 941—950.
- Prasad G. L., Masuelli L., Raj M. H. G., Harindranath N. 1999. Suppression of src-induced transformed phenotype by expression of tropomyosin-1. Oncogene. 18 : 2027—2031.
- Shah V., Bharadwaj S., Kaibuchi K., Prasad G. L. 2001. Cytoskeletal organization in tropomyosin-mediated reversion of ras-transformation: Evidence for Rho kinase pathway. Oncogene. 20 : 2112—2121.
- Skoumpla K., Coulton A. T., Lehman W., Geeves M. A., Mulvihill D. P. 2007. Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Cell Sci. 120 : 1635—1645.
- 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.
- Tsao T.-C., Bailey K., Adair G. S. 1951. The size, shape and aggregation of tropomyosin particles. Biochem. J. 49 : 27—36.

Urbancikova M., Hitchcock-DeGregori S. E. 1994. Requirement of amino-terminal modification for striated muscle alpha-tropomyosin function. *J. Biol. Chem.* 269 : 24 310—24 315.

Van den Boom F., Dussmann H., Uhlenbrock K., Abouhamed M., Bahler M. 2007. The Myosin IXb motor activity targets the myosin IXb RhoGAP domain as cargo to sites of actin polymerization. *Mol. Biol. Cell.* 18 : 1507—1518.

Поступила 8 VII 2011

ISOLATION OF TROPOMYOSIN PARTICLES FROM THE CYTOSOL OF CULTURED CELLS
AND THEIR PROTEIN COMPOSITION ANALYSIS

D. E. Bobkov,¹ A. A. Aisenstadt,¹ I. V. Kropacheva,¹ G. P. Pinaev^{1, 2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² Faculty of Biomedical Physics and Bioengineering,
St. Petersburg State Polytechnic University;
e-mail: bobkovde@yandex.ru

The presence of actin-binding protein, tropomyosin, shaped as particles or protein complexes that have no bonds with actin structures were found while the analysis of structural rearrangements of actin cytoskeleton. However, their functioning is still unknown. To study the composition and properties of these protein complexes a novel method of their separation from the cells without destroying the structures of the cytoskeleton have been developed. The protein composition of isolated tropomyosin particles has been analysed by gel filtration, electrophoresis and Western blotting. They appeared to be a multimolecular complexes of about 700 kDa. Beside the tropomyosin and actin these complexes also contain the Hsp70, Hsp90 and myosin-9 identified by mass spectrometry analysis. Also, under inhibition of deacetylases by trichostatin A, changes in the number of particles and redistribution of tropomyosin between cytosol and cytoskeleton take place along with actin cytoskeleton rearrangements. The results obtained give a reason to assume that these multimolecular complexes may participate in the process of reorganization of the actin microfilaments.

Key words: tropomyosin, protein complexes, actin cytoskeleton, myosin-9, heat shock proteins.