

ВЛИЯНИЕ ЛИЗОФОСФАТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТАВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ МИОЗИН-9 И ТРОПОМИОЗИН

© Д. Е. Бобков,¹ И. В. Кропачева

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹электронный адрес: bobkov@incras.ru

В настоящей работе иммунофлуоресцентными методами исследовано распределение актинсвязывающего белка миозина-9 в цитоплазме эмбриональных фибробластов легкого человека. С помощью электрофореза и Вестерн-блот-анализа установлено, что миозин-9, актин и высокомолекулярные изоформы тропомиозина входят в состав цитоплазматических белковых комплексов, не связанных с цитоскелетными структурами. Методом перекрестной иммунопреципитации показано, что при воздействии лизофосфатидиловой кислоты (ЛФК) происходит быстрая разборка этих комплексов. Кроме того, ЛФК вызывает протеолитическую деградацию миозина-9, ассоциированного со структурами актинового цитоскелета. Полученные результаты свидетельствуют о том, что мультимолекулярные цитоплазматические белковые комплексы, содержащие миозин-9 и тропомиозин, принимают участие в регуляции клеточного ответа на стимуляцию ЛФК.

Ключевые слова: белковые комплексы, миозин-9, тропомиозин, актин, цитоскелет, фибробласты, лизофосфатидиловая кислота

Принятые сокращения: ЛФК — лизофосфатидиловая кислота.

Изучение внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих взаимоотношения компонентов актинового цитоскелета, важно для понимания регуляции таких клеточных процессов, как распластывание, миграция и онкогенная трансформация. Сигнальные каскады, опосредованные малыми ГТФазами суперсемейства Ras, такими как RhoA, Rac1 и Cdc42, вовлечены в регуляцию организации стресс-фибрилл, ламеллоподий, филоподий и прочих структур актинового цитоскелета. Несмотря на большое число данных, подтверждающих участие малых ГТФаз семейства Rho и Rho-киназ в регуляции актинового цитоскелета и их роль онкогенной трансформации, конкретные молекулярные механизмы, вовлеченные в эти процессы, остаются во многом неясными (Schmidt, Hall, 1998; Etienne-Manneville, Hall, 2002; Thumkeo et al., 2013). Настоящее исследование посвящено изучению изменений, происходящих в составе мультимолекулярных цитоплазматических комплексов, или интерактосом, содержащих белки актинового цитоскелета, в ходе активации сигнального пути, ассоциированного с онкотрансформацией.

В качестве активатора RhoA-зависимого сигнального пути мы использовали лизофосфатидиловую кислоту (ЛФК), влияние которой на реорганизацию актинового цитоскелета описано на различных клеточных моделях (Sayas et al., 2002; Hilal-Dandan et al., 2004). ЛФК представляет собой фосфолипидный медиатор, присутствие которого в очагах воспаления стимулирует фибробласты к выполнению функций, связанных с заживлением ран и ангиогенезом (Stortelers et al., 2008). Особую роль ЛФК

играет в канцерогенезе, стимулируя развитие опухоли, инвазию и миграцию злокачественных клеток (Jeong et al., 2012; Lee et al., 2015). Молекулы ЛФК взаимодействуют на поверхности клеток со специфическими рецепторами, связанными с большими G-белками, в результате чего активируется сигнальный путь RhoA/ROCK. Однако роль белков актинового цитоскелета в этом процессе до сих пор недостаточно изучена. В частности, до сих пор не описаны события, которые происходят сразу после активации рецепторов ЛФК и впоследствии приводят к передаче сигнала в ядро, изменению экспрессии генов и реорганизации структур актинового цитоскелета.

Одним из основных актинсвязывающих белков, регулирующих структуру и динамику актинового цитоскелета, является тропомиозин. В мышечных клетках он обычно выявляется в связанном с актиновыми структурами виде, в основном в составе стресс-фибрилл (Lazarides, 1975). Однако при иммунофлуоресцентном анализе цитоскелета тропомиозин обнаруживается не только в составе актиновых структур, но и в не связанных с ними частицах различного размера, которые распределены в цитозоле как вокруг стресс-фибрилл, так и в зонах активной полимеризации актина, например в ламеллах и филоподиях (Hillberg et al., 2006; Grenklo et al., 2008).

Ранее мы разработали методику малоразрушающего выделения компонентов цитоплазмы из культивируемых клеток, при котором сохраняются цитоскелетные структуры и органеллы. С помощью этой методики мы охарактеризовали частицы, содержащие тропомиозин выделенные из цитоплазмы эмбриональных фибробластов крысы,

как мультимолекулярные белковые комплексы. В составе этих комплексов были выявлены помимо тропомиозина немышечный миозин класса IIА (миозин-9), а также белки теплового шока 70 и 90 (Бобков и др., 2012). Молекулярная организация и функциональная роль этих белковых комплексов в настоящее время неизвестны. Мы предполагаем, что они вовлечены в процессы реорганизации цитоскелета под влиянием внешних стимулов и могут являться предшественниками других актиновых структур. С целью проверки данного предположения в настоящей работе была предпринята попытка исследования изменений состава белковых комплексов, содержащих миозин-9, актин и высокомолекулярные изоформы тропомиозина, на ранних сроках после воздействия ЛФК.

Материал и методика

Клеточные культуры. Фибробласты, выделенные из легкого эмбриона человека, были любезно предоставлены Н. М. Юдинцевой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % сыворотки крови эмбрионов коров (HyClone, США), при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Иммунофлуоресценция. Стеклянные клетки фиксировали в 3%-ном растворе параформальдегида 10 мин при комнатной температуре и пермеабелизовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 5 мин при комнатной температуре. В качестве первых антител использовали поликлональные антитела кролика, выработанные против N-концевого пептида тяжелой цепи немышечного миозина IIА, и моноклональные антитела мыши, выработанные против высокомолекулярных изоформ тропомиозина (Sigma, США), а в качестве вторых антител использовали кроличьи антитела к мышечным антигенам и козы антитела к антигенам кролика, конъюгированные с FITC или TRITC (Sigma, США). Для визуализации актинового цитоскелета клетки окрашивали родамин-фаллоидином 10 мин при 37 °С. Препараты заключали в среду Mounting medium (Pharmacia, Швеция) и анализировали на конфокальном микроскопе DMi8 (Leica, Германия).

Фракционирование и иммунопреципитация. Клеточные экстракты получали при помощи метода кратковременной экстракции компонентов цитоплазмы из монослойной культуры клеток (подробнее см.: Бобков и др., 2012). В эксперименте использовали клетки в состоянии субконфлюэнтного монослоя на чашках Петри диаметром 9 см, по одной чашке на каждую временную точку. Перед экспериментом клетки переводили на 1 ч на бессывороточную среду. Для стимуляции клеток среду заменяли на новую порцию бессывороточной среды, содержащую ЛФК (Sigma, США) в концентрации 20 нг/мл; время инкубации составляло от 30 с до 3 ч. Затем жидкость из чашек Петри тщательно удаляли и в каждую чашку вносили по 500 мкл лизирующего буфера следующего состава: 10 мМ К-фосфатного буфера, рН 7.0, 100 мМ NaF, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0.5 М сахарозы, 1 % Тритона X-100, 0.1 мМ PMSF и ингибиторы протеаз (Sigma, США). Лизис проводили 5 мин на льду, после чего отбирали экстракт 1 для дальнейшей иммунопреципитации. Для получения экстракта 2 и цитоматрикса в чашки повторно вносили по 500 мкл лизирующего буфера, лизировали на льду 10 мин и собирали

остатки клеток скребком. Полученные лизаты центрифугировали 10 мин при 12 000 g, супернатант обозначали как экстракт 2, а осадок — как цитоматрикс. При проведении иммунопреципитации в полученные экстракты 1 предварительно добавляли сефарозу с пришитым белком G (Amersham, Швеция) из расчета 50 мкл на 1 мл и инкубировали, плавно перемешивая, 1 ч при 4 °С. Затем сефарозу осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2000 g, к супернатанту добавляли антитела и инкубировали, плавно перемешивая, в течение 4 ч при 4 °С, после этого добавляли G-сефарозу и инкубировали так же, плавно перемешивая, в течение 4 ч при 4 °С. Образовавшиеся комплексы антител с сефарозой осаждали центрифугированием при 2000 g, промывали 4 раза PBS и разделяли методом электрофореза с последующим Вестерн-блотингом.

Электрофорез и Вестерн-блот-анализ. Белки разделяли методом электрофореза в 12.5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS (Laemmli, 1970). После электрофореза гель окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым или осуществляли Вестерн-блотинг (Towbin et al., 1979). Перенос белков с геля на мембрану Immobilon-P (Millipore, США) проводили в Трис-глициновом буфере, рН 8.3, содержащем 10 % этанола и 0.1 % SDS. Вестерн-блотинг проводили в соответствии с ECL-протоколом (Amersham, США). Мембрану после переноса промывали 20 мин PBS, содержащим 0.1 % твина-20, и блокировали места неспецифического связывания 5%-ным обезжиренным сухим молоком, разведенным в PBS, в течение 1 ч. Мембрану инкубировали с первыми антителами в течение 1 ч при комнатной температуре, трижды отмывали в PBS и окрашивали вторыми антителами 1 ч при комнатной температуре. В качестве первых антител использовали поликлональные антитела кролика, выработанные против N-концевого пептида миозина-9, моноклональные антитела мыши, выработанные против высокомолекулярных изоформ тропомиозина, бета-актина, альфа-тубулина или ацетилированного альфа-тубулина. В качестве вторых антител использовали кроличьи антитела к мышечным антигенам и козы антитела к антигенам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Для усиления сигнала в Вестерн-блотинге использовали субстрат SuperSignal (Thermo Scientific, США). Хемилюминесцентное излучение регистрировали при помощи системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). Денситометрию блотов проводили в программе ImageJ (Schindelin et al., 2015), статистическую обработку данных денситометрии выполняли в программе Microsoft Excel.

Результаты

Методом иммунофлуоресцентного окрашивания было показано, что миозин-9 с разной интенсивностью выявляется практически во всех клетках монослоя (рис. 1). Одновременное окрашивание родамин-фаллоидином и связывание антител к миозину-9 показало, что миозин-9 солокализуется практически со всеми F-актиновыми структурами. Кроме того, миозин-9 выявляется в цитоплазме в форме отдельных частиц, не связанных со структурами актинового цитоскелета (рис. 1, *а—д*). Размер этих частиц варьирует от 0.1 до 0.3 мкм. Через 1 ч воздействия ЛФК миозин-9 также выявляется как в виде отдельных частиц, так и вместе с F-актиновыми структу-

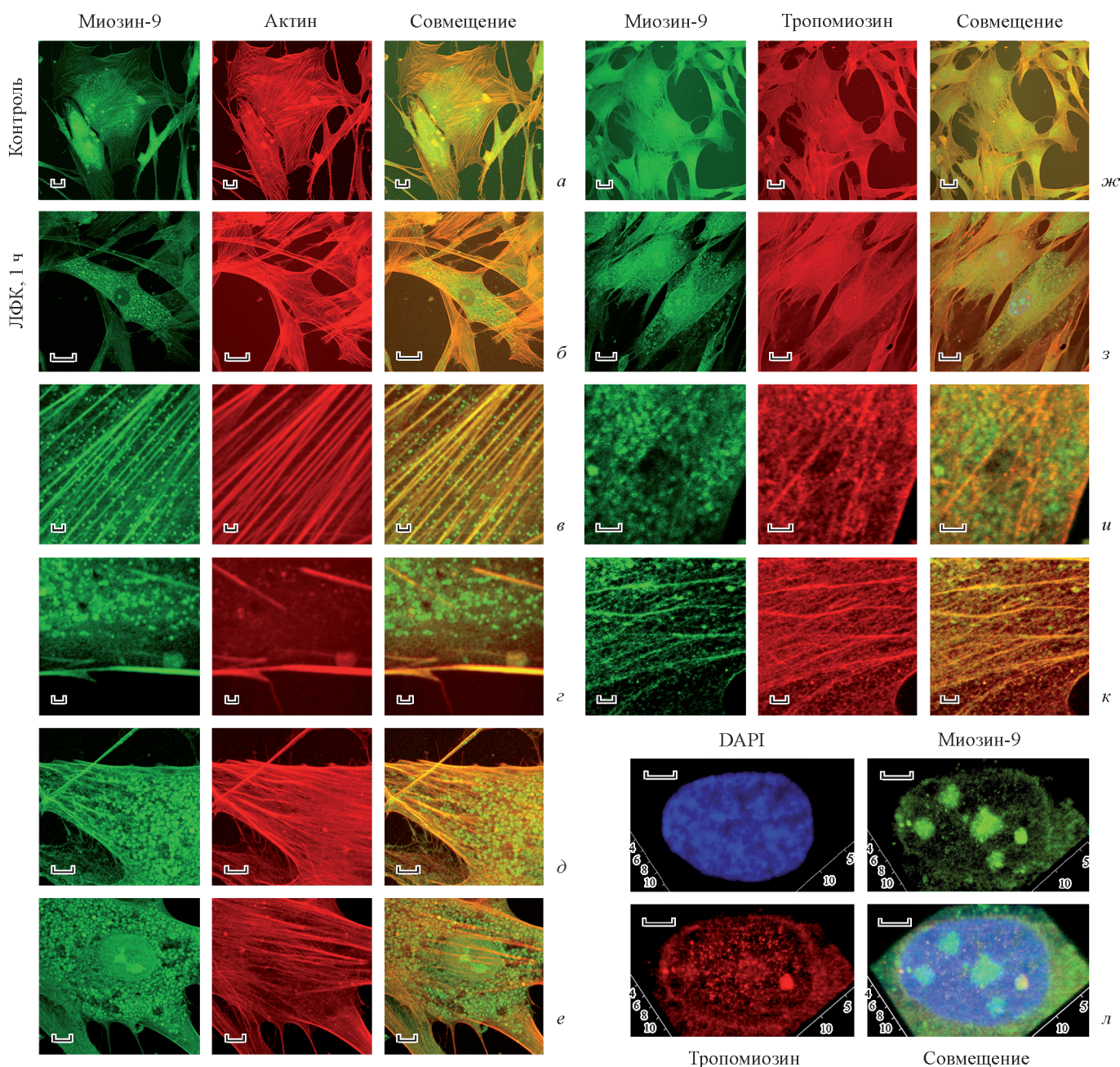


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбриональных фибробластов легкого мыши с помощью поликлональных антител к миозину-9 (а—л, зеленый), моноклональных антител к тропомиозину (ж—л, красный) и визуализация актинового цитоскелета с помощью родамин-фаллоидина (а—е, красный).

а, в—ж, и, к — клетки в контроле; б, з, л — клетки через 1 ч действия лизофосфатидиловой кислоты (ЛФК). Показаны конфокальные срезы в области стресс-фибрилл (в, и), края клетки (з, к, д) и ядра (е, л). Ядра окрашены DAPI (л). Масштабные отрезки: 20 (а, б, ж, з), 2 (в, з, и, к) и 5 (д, е, л) мкм.

рами (рис. 1, б). Кроме того, миозин-9 обнаруживается в области ядра как в контроле, так и в клетках, подвергшихся обработке ЛФК (рис. 1, е, л). Тропомиозин выявляется в контрольных клетках только в цитоплазме и околоядерной области (рис. 1, ж). Одновременное окрашивание антителами к высокомолекулярным изоформам тропомиозина и к миозину-9 показало, что тропомиозин и миозин-9 солокализуются в клетках в составе стресс-фибрилл и в виде отдельных частиц в цитоплазме (рис. 1, и, к), а после 1-часового действия ЛФК они солокализуются еще и в области ядра (рис. 1, л).

Ранее было показано, что подобные частицы, содержащие тропомиозин, могут быть выделены из цитоплазмы клеток без разрушения ядер и структур цитоскелета (Бобков и др., 2012). Там же было показано, что тропомиозин и миозин-9 соосаждаются из экстракта 1 эмбриональных фибробластов крысы. Для того чтобы узнать, изменяет ли влияние ЛФК (20 нг/мл) состав мультимолекулярных белковых комплексов, содержащих миозин-9 и тропомиозин, но не связанных с цитоскелетом, мы провели серию иммунопреципитаций из экстрактов 1 эмбриональных легочных фибробластов человека. Клетки инку-

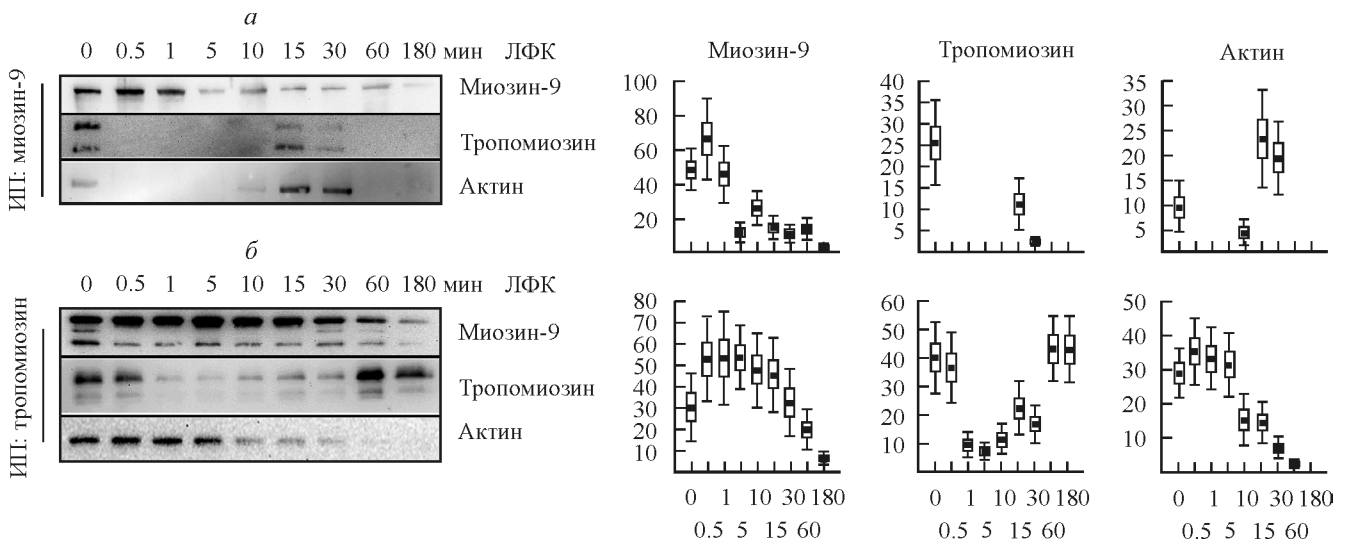


Рис. 2. Динамика состава белковых комплексов, осажденных антителами против миозина-9 (а) и тропомиозина (б) из цитоплазмы (экстракт 1) эмбриональных фибробластов легкого человека на разных сроках действия 20 нг/мл ЛФК. ИП — иммунопреципитация. Вестерн-блот-анализ.

Использовали антитела против миозина-9, актина и высокомолекулярных изоформ тропомиозина. Диаграммы показывают результаты денситометрии полос Вестерн-блотов, представлены средние значения (точки), стандартное отклонение (прямоугольники) и 95%-ные доверительные интервалы (вертикальные отрезки), n = 6. По горизонтали — время действия ЛФК, мин; по вертикали — интенсивность хемиллюминесцентного сигнала, отн. ед.

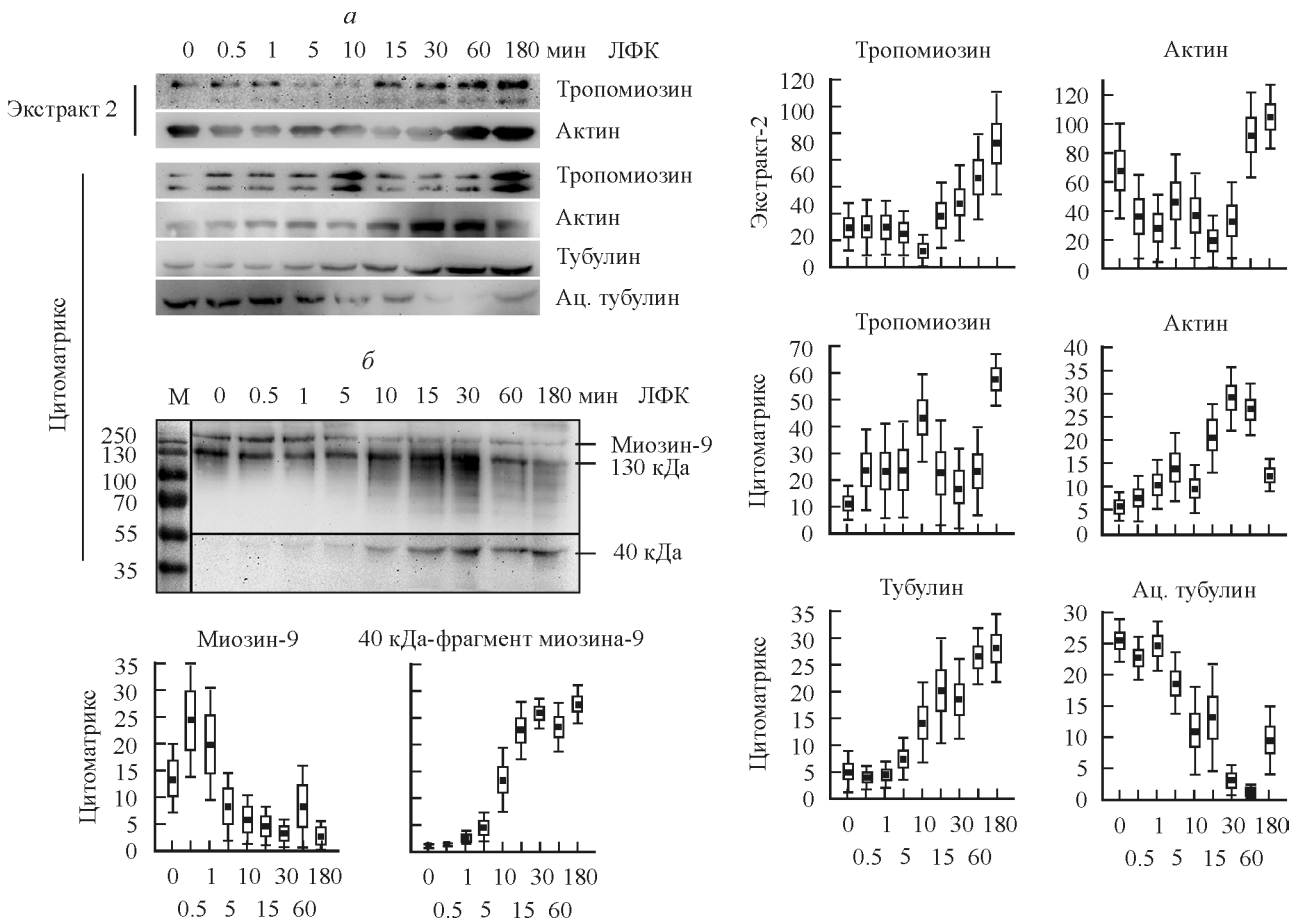


Рис. 3. Содержание белков цитоскелета в экстракте 2 и цитоматриксе, полученных из лизата эмбриональных фибробластов легкого человека на разных сроках после начала действия 20 нг/мл ЛФК. Вестерн-блот-анализ.

Использованы антитела против актина, высокомолекулярных изоформ тропомиозина, тубулина, ацетилированного (ац.) тубулина (а) и миозина-9 (б). Диаграммы: объяснения те же, что и к рис. 2.

бирова́ли в присутствии ЛФК в течение 30 с, 1, 5, 10, 15 и 30 мин, 1 и 3 ч, затем получали растворимые в Тритоне X-100 экстракты 1, из которых осаждали белковые комплексы, используя антитела к миозину-9 и высокомолекулярным изоформам тропомиозина. Полученные преципитаты анализировали методом электрофореза с последующим Вестерн-блот-анализом.

При осаждении белковых комплексов с помощью антител против миозина-9 на разных сроках действия ЛФК было обнаружено, что количество миозина-9 в преципитатах сохраняется на высоком уровне в течение 1 мин, а затем начинает снижаться. Тропомиозин и актин выявляются в комплексе с миозином-9 в контрольных клетках, их количество снижается через 30 с действия на клетки ЛФК и затем повышается через 15 мин. Через 30 мин количество актина и тропомиозина в комплексе с миозином-9 снова снижается до полного исчезновения. Через 1 и 3 ч после начала действия ЛФК актин и тропомиозин в преципитатах не выявляются (рис. 2, а).

При осаждении белков антителами против тропомиозина было обнаружено, что в контрольных клетках совместно с тропомиозином осаждаются миозин-9 и актин (рис. 2, б). Количество миозина-9 в составе преципитатов постепенно снижается в течение 3 ч, при этом помимо полноразмерного белка выявляется его фрагмент с мол. массой примерно 130 кДа. Количество тропомиозина в преципитатах достигает своего минимума уже через 5 мин после начала действия ЛФК, затем постепенно увеличивается и через 3 ч возвращается к первоначальному уровню. Количество актина в преципитатах после воздействия ЛФК начинает снижаться через 10 мин, а через 3 ч актин не обнаруживается на Вестерн-блоте.

Помимо анализа сосаждения миозина-9, тропомиозина и актина мы исследовали содержание основных белков цитоскелета в экстракте 2 и цитоматрикс клеток методами электрофореза и Вестерн-блота (рис. 3). Было обнаружено, что содержание тропомиозина в экстракте 2 снижается через 5 мин и начинает увеличиваться через 15 мин после воздействия на клетки ЛФК. При этом содержание актина в экстракте 2 увеличивается и достигает своего максимума через 30 мин, после чего постепенно снижается.

В цитоматрикс содержание тропомиозина в общем стабильно, однако через 10 и 180 мин от начала воздействия ЛФК наблюдается увеличение его количества. Содержание актина в цитоматрикс снижается через 30 с действия ЛФК, и далее его количество флуктуирует, достигая своего максимума через 60 и 180 мин. Количество тубулина в цитоматрикс начинает увеличиваться через 30 мин после начала действия ЛФК и становится максимальным через 3 ч. При этом содержание ацетилированной формы тубулина в цитоматрикс начинает снижаться уже через 10 мин воздействия на клетки ЛФК (рис. 3, а). Через 1 ч ацетилированный тубулин уже практически не выявляется, а через 3 ч появляется снова в небольшом количестве. Содержание полноразмерного миозина-9 в цитоматрикс постепенно снижается в течение 3 ч действия ЛФК, при этом параллельно идет увеличение количества его фрагментов с мол. массами 130 и 40 кДа (рис. 3, б).

Обсуждение

Актиновый цитоскелет является высокодинамичной структурой и обеспечивает выполнение широкого спектра клеточных функций за счет способности к быстрым

изменениям пространственной организации в ответ на различные внешние стимулы. Пространственная организация актинового цитоскелета определяется набором актинсвязывающих белков, взаимодействующих друг с другом и с цитоскелетными структурами. Ряд исследований позволяет предположить, что актинсвязывающие белки не только принимают непосредственное участие в организации структур актинового цитоскелета, но и опосредуют обработку и проведение внутриклеточных сигналов (Andra et al., 1998; Bolshakova et al., 2007; Grenklo et al., 2008; Uribe, Jay, 2009; Бобков и др., 2010).

Ранее при анализе структурных перестроек актинового цитоскелета в цитоплазме крысиных фибробластов мы обнаружили не связанные с другими актиновыми структурами частицы. Мы охарактеризовали эти частицы как сложные мультимолекулярные комплексы, содержащие высокомолекулярные изоформы тропомиозина, актин, миозин-9 и белки теплового шока Hsp70 и Hsp90 (Бобков и др., 2012). Также мы показали, что при перестройках актинового цитоскелета состав этих комплексов изменяется, и предположили, что данные мультимолекулярные комплексы могут принимать участие в процессах реорганизации системы актиновых микрофиламентов. Для того чтобы подтвердить это предположение в другой клеточной системе, мы исследовали влияние активатора сигнального пути Rho на состав таких комплексов в культуре эмбриональных фибробластов легкого человека.

В качестве активатора сигнального пути Rho нами была выбрана ЛФК. Связываясь со специфическими рецепторами на поверхности клеток, ЛФК индуцирует процессы адгезии, миграции и пролиферации. Действие ЛФК на клетки опосредуется через изменения в актиновом цитоскелете, в том числе через формирование стресс-фибрилл и стимуляцию актомиозинового сокращения (Воротников, 2011). Известно, например, что сигнал от рецепторов ЛФК передается на немшечные миозины II типа (Watterson et al., 2007). В культуре клеток рака молочной железы было показано, что ЛФК вызывает сборку стресс-фибрилл и сократимость актомиозина посредством фосфорилирования и активации миозина II с участием малых ГТФаз Rho-семейства (Kim, Adelstein, 2011).

В настоящей работе мы исследовали влияние ЛФК на состав цитоплазматических белковых комплексов, содержащих актин, миозин-9 и высокомолекулярные изоформы тропомиозина. Оказалось, что добавление к нормальным фибробластам человека ЛФК в концентрации 20 нг/мл приводит к быстрому уменьшению количества тропомиозина, сосажденного с миозином-9, что может быть связано с дефосфорилированием миозина-9. Ранее уже было показано, что миозины могут существовать в двух конформациях в зависимости от степени фосфорилирования. В нефосфорилированном состоянии молекулы немшечных миозинов II класса приобретают компактную 10S-конформацию, в которой у них отсутствует АТФазная, актинсвязывающая и полимеризационная активность. Фосфорилирование по Ser19 приводит к разворачиванию молекулы в вытянутую 6S-конформацию (Ikebe et al., 1986; Matsumura, 2005; Clark et al., 2008). Подтверждение этого предположения потребует дальнейшего исследования.

Ранее было показано, что в клетках A431 Rho транслоцируется из цитоплазмы к растущим микроворсинкам апикальной мембраны в течение 30 с после стимуляции

ЭФР (Yonemura et al., 2004), а RhoG активируется через 30 с после воздействия 20 нг/мл ЭФР в клетках линий A431, HeLa и NIH-3T3 (Samson et al., 2010). Полученные нами результаты также свидетельствуют о быстрых изменениях после воздействия ЛФК: уже через 30 с наблюдается разборка комплекса тропомиозин/миозин-9.

Миозин и тропомиозин относятся к ключевым актинсвязывающим белкам, регулирующим динамические свойства актинового цитоскелета. Они входят в состав микрофиламентов и, помимо этого, могут принимать участие в формировании различных белковых комплексов. Например, было показано, что более 90 % тропомиозина в цитозоле фибробластов крысы существует в форме мультимеров (Grenklo et al., 2008). В клетках обнаруживается несколько различных изоформ тропомиозина, различающихся по молекулярной массе и характеристикам связывания с актином и актинсвязывающими белками. Различная степень стабилизации актиновых филаментов разными изоформами тропомиозина обеспечивает актиновому цитоскелету многообразие динамических свойств (Lin et al., 2008; Невзоров, Левицкий, 2011; Gunning et al., 2015). Несмотря на большое число работ, посвященных роли изоформ тропомиозина в организации системы микрофиламентов, молекулярные механизмы, за счет которых тропомиозин регулирует структурные и динамические свойства актинового цитоскелета, до сих пор не вполне ясны (Khaitlina, 2015). Высокомолекулярные изоформы тропомиозина были выбраны нами как основные изоформы, обеспечивающие нормальный клеточный фенотип (Leavitt et al., 1986; Miyado et al., 1997; Gunning et al., 2015).

Постепенное снижение количества бета-актина, связанного с высокомолекулярными изоформами тропомиозина на все более поздних сроках после воздействия ЛФК (до 3 ч), может свидетельствовать об изменении степени аффинности тропомиозина, возможно вследствие изменения уровня его ацетилирования. Косвенным свидетельством такой возможности является постепенное снижение количества выявляемого в цитоматрикс ацетилированного тубулина. Снижение ацетилирования тубулина связывают с увеличением клеточной подвижности (Palazzo et al., 2003), что согласуется с известной ролью ЛФК в обеспечении клеточной миграции.

Первые быстрые изменения, наблюдаемые нами в составе исследованных белковых комплексов, могут иметь отношение к неспецифическому универсальному ответу, в ходе которого быстрые перестройки актинового цитоскелета происходят в клетках в ответ на самые разные стимулы и могут опосредоваться такими вторичными мессенджерами, как активные формы кислорода или ионы кальция. Изменения, происходящие в составе белковых комплексов через 15—30 мин воздействия ЛФК, могут быть обусловлены как изменением белок-белковых взаимодействий, так и изменениями в экспрессии генов. При анализе экспрессии генов в эмбриональных фибробластах мышцы было обнаружено, что ЛФК индуцирует гены, вовлеченные в стимуляцию роста и реорганизацию цитоскелета, и гены, кодирующие металлопротеиназы (Stortelers et al., 2008). Через 30 мин воздействия ЛФК активируются гены раннего ответа, включающие в себя *Nfkb1a*, кодирующий ингибирующую субъединицу транскрипционного фактора NF-κappaB (Stortelers et al., 2008). В связи с этим стоит упомянуть, что ранее в нашей лаборатории было показано, что субъединица p65 транскрипционного фактора NF-κappaB ас-

социирована с актинсвязывающим белком альфа-актинином-4 (Babakov et al., 2008), что может говорить об участии актинового цитоскелета и комплексов, содержащих актинсвязывающие белки, в регуляции активности этого транскрипционного фактора. На более поздних сроках активируется набор ЛФК-специфичных генов, ассоциированных с цитоскелетом, в том числе кодирующих различные изоформы актина, ГТФазу Rho, Rho-киназу, субъединицы интегринов (Stortelers et al., 2008). Мы наблюдаем увеличение количества тропомиозина и снижение содержания миозина-9 в экстракте 2 и цитоматрикс фибробластов через 3 ч после воздействия ЛФК, что также может быть связано с изменением экспрессии соответствующих генов.

Помимо изменения состава комплексов ЛФК вызывает деградацию ассоциированного с цитоматрикс миозина-9. Протеолиз миозина-9 является регулирующим механизмом и показан в разных клеточных системах. Так, на остеокластах было показано, что в ходе остеокластогенеза уровень миозина-9 временно снижается путем регулируемого протеолиза, и это событие стимулирует слияние клеток-предшественниц остеокластов (McMichael et al., 2009). В другой работе было продемонстрировано, что миозин-9 взаимодействует с рецептором TLR4 в тромбоцитах и что это взаимодействие регулируется протеолизом миозина-9. Миозин-9 является субстратом кальпаина, а разрезание миозина-9 увеличивает экспрессию TLR4 в тромбоцитах, обработанных тромбином (Tsai et al., 2014). Возможно, тропомиозин может регулировать активность миозина-9, связываясь с сайтами разрезания протеазами. Это предположение требует дополнительно подтверждения.

Мы предполагаем, что исследованные белковые комплексы участвуют в процессах, происходящих при быстрых перестройках актинового цитоскелета, связанных с разборкой и последующей сборкой актиновых микрофиламентов. Быстрая реорганизация системы микрофиламентов обуславливает изменения в поведении клеток при изменении условий микроокружения, как например при миграции фибробластов в зону повреждения ткани. Так как эти цитоскелетные перестройки происходят в течение нескольких минут, для быстрого образования актиновых микрофиламентов необходимо наличие уже готовых олигомеров актина. Согласно ранее полученным данным, тропомиозин действительно может стабилизировать актиновые филаменты (Wen et al., 2000). С другой стороны, ингибирование немышечных миозинов II класса приводит к разборке актинового цитоскелета (Shutova et al., 2012).

Таким образом, в настоящей работе охарактеризованы изменения, происходящие под влиянием ЛФК в составе выделенных из цитоплазмы белковых комплексов, содержащих актин и актинсвязывающие белки. Наши результаты демонстрируют, что под действием воспалительного медиатора ЛФК, вызывающего в клетках активацию сигнального пути Rho и перестройки актинового цитоскелета, одновременно происходят как изменения в составе комплексов, содержащих миозин-9 и связанные с деградацией миозина-9, так и перераспределение высокомолекулярных изоформ тропомиозина между экстрактом 2 и цитоматриксом. Полученные результаты позволяют предполагать, что мультимолекулярные цитоплазматические белковые комплексы, содержащие миозин-9 и тропомиозин, принимают участие в регуляции клеточного ответа на стимуляцию ЛФК.

Авторы выражают глубокую благодарность Г. П. Пинаеву, который был инициатором и вдохновителем данной работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

Список литературы

- Бобков Д. Е., Айзенштадт А. А., Крощева И. В., Пинаев Г. П. 2012. Выделение и анализ состава цитозольных белковых комплексов, содержащих тропомиозин. Цитология. 54 (1) : 33—43. (Bobkov D. E., Aizenshtadt A. A., Kropacheva I. V., Pinaev G. P. 2012. Isolation of tropomyosin particles from the cytosol of cultured cells and their protein composition analysis. Tsitologiya. 54 (1) : 33—43.)
- Бобков Д. Е., Крощева И. В., Пинаев Г. П. 2010. Мульти-молекулярные комплексы, содержащие р65 субъединицу фактора NF-κB и белки цитоскелета в клетках A431. Биол. мембраны. 27 (1) : 133—137. (Bobkov D. E., Kropacheva I. V., Pinaev G. P. 2010. Multimolecular complexes containing p65 subunit of NF-κB and cytoskeletal proteins in A431 cells. Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biol. 4 (1) : 115—119.)
- Воротников А. В. 2011. Хемотаксис: движение, направление, управление. Успехи биол. химии. 51 : 335—400. (Vorotnikov A. V. 2011. Chemotaxis: movement, direction, control. Biochemistry (Moscow). 76 (13) : 1528—1555.)
- Невзоров И. А., Левицкий Д. И. 2011. Тропомиозин: двойная спираль из мира белков. Успехи биол. химии. 51 : 283—334. (Nevzorov I. A., Levitsky D. I. 2011. Tropomyosin: double helix from the protein world. Biochemistry (Moscow). 76 (13) : 1507—1527.)
- Andra K., Nikolic B., Stocher M., Drenckhahn D., Wiche G. 1998. Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. Genes Develop. 12 : 3442—3451.
- Babakov V. N., Petukhova O. A., Turoverova L. V., Kropacheva I. V., Tentler D. G., Bolshakova A. V., Pinaev G. P. 2008. RelA/NF-κB transcription factor associates with alpha-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 alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4 in A431 cells. Cell Biol. Int. 31 : 360—365.
- Clark K., Middelbeek J., Dorovkov M. V., Figdor C. G., Ryzanov A. G., Lasonder E., van Leeuwen F. N. 2008. The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC. FEBS Lett. 582 : 2993—2997.
- Etienne-Manneville S., Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. Nature. 420 : 629—635.
- 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. W., Hardeman E. C., Lappalainen P., Mulvihill D. P. 2015. Tropomyosin — master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. J. Cell Sci. 128 : 1—10.
- Hilal-Dandan R., Means C. K., Gustafsson Å. B., Morissette M. R., Adams J. W., Brunton L. L., Brown J. H. 2004. Lysophosphatidic acid induces hypertrophy of neonatal cardiac myocytes via activation of Gi and Rho. J. Mol. Cell. Cardiol. 36 : 481—493.
- Hillberg L., Zhao Rathje L. S., Nyäkern-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.
- Ikebe M., Hartshorne D. J., Elzinga M. 1986. Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20 000-dalton light chain of smooth muscle myosin. J. Biol. Chem. 261 : 36—39.
- Jeong K. J., Park S. Y., Cho K. H., Sohn J. S., Lee J., Kim Y. K., Kang J., Park C. G., Han J. W., Lee H. Y. 2012. The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion. Oncogene. 31 : 4279—4289.
- Khaitlina S. Y. 2015. Tropomyosin as a regulator of actin dynamics. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 318 : 255—291.
- Kim J. H., Adelstein R. S. 2011. LPA(1) -induced migration requires nonmuscle myosin II light chain phosphorylation in breast cancer cells. J. Cell. Physiol. 226 : 2881—2893.
- 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.
- Leavitt J., Latter G., Lutomski L., Goldstein D., Burbeck S. 1986. Tropomyosin isoform switching in tumorigenic human fibroblasts. Mol. Cell. Biol. 6 : 2721—2726.
- Lee S., Fujiwara Y., Tigyi G. J. 2015. Uncovering unique roles of LPA receptors in the tumor microenvironment. J. Recept. Signal. Transduct. Cell. Mol. Biol. 2 : 1—7.
- Lin J. J., Eppinga R. D., Warren K. S., McCrae K. R. 2008. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. Adv. Exp. Med. Biol. 644 : 201—222.
- Matsumura F. 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. Trends Cell Biol. 15 : 371—377.
- McMichael B. K., Wysolmerski R. B., Lee B. S. 2009. Regulated proteolysis of nonmuscle myosin IIA stimulates osteoclast fusion. J. Biol. Chem. 284 : 12 266—12 275.
- 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.
- Palazzo A., Ackerman B., Gunderson G. G. 2003. Tubulin acetylation and cell motility. Nature. 421 : 230.
- Samson T., Welch C., Monaghan-Benson E., Hahn K. M., Burridge K. 2010. Endogenous RhoG is rapidly activated after epidermal growth factor stimulation through multiple guanine-nucleotide exchange factors. Mol. Biol. Cell. 21 : 1629—1642.
- Sayas C. L., Avila J., Wandosell F. 2002. Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. Biochim. biophys. acta. 1582 : 144—153.
- Schindelin J., Rueden C. T., Hiner M. C., Eliceiri K. W. 2015. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. Mol. Reprod. Develop. 82 : 518—529.
- Schmidt A., Hall M. N. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 14 : 305—338.
- Shutova M., Yang C., Vasiliev J. M., Svitkina T. 2012. Functions of nonmuscle myosin II in assembly of the cellular contractile system. PLoS ONE. 7 : e40814.
- Stortelers C., Kerkhoven R., Moolenaar W. H. 2008. Multiple actions of lysophosphatidic acid on fibroblasts revealed by transcriptional profiling. BMC Genomics. 9 : 387.
- Thumkeo D., Watanabe S., Narumiya S. 2013. Physiological roles of rho and rho effectors in mammals. Eur. J. Cell Biol. 92 : 303—315.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76 : 4350—4354.
- Tsai J. C., Lin Y. W., Huang C. Y., Lin C. Y., Tsai Y. T., Shih C. M., Lee C. Y., Chen Y. H., Li C. Y., Chang N. C., Lin F. Y., Tsai C. S. 2014. The role of calpain-myosin 9-Rab7b pathway in mediating the expression of toll-like receptor 4 in platelets: a novel mechanism involved in α-granules trafficking. PLoS ONE. 9 : e85833.
- Uribe R., Jay D. 2009. A review of actin binding proteins: new perspectives. Mol. Biol. Rep. 36 : 121—125.
- Watterson K. R., Lanning D. A., Diegelmann R. F., Spiegel S. 2007. Regulation of fibroblast functions by lysophospholipid mediators: potential roles in wound healing. Wound Rep. Reg. 15 : 607—616.

Wen K. K., Kuang B., Rubenstein P. A. 2000. Tropomyosin-dependent filament formation by a polymerization-defective mutant yeast actin (V₂₆₆G, L₂₆₇G). *J. Biol. Chem.* 275 : 40 594—40 600.

Yonemura S., Hirao-Minakuchi K., Nishimura Y. 2004. Rho localization in cells and tissues. *Exp. Cell Res.* 295 : 300—314.

Поступила 22 VIII 2016

THE EFFECT OF LYSOPHOSPHATIDIC ACID ON THE COMPOSITION OF MYOSIN-9
AND TROPOMYOSIN CONTAINING CYTOPLASMIC PROTEIN COMPLEXES

D. E. Bobkov,¹ I. V. Kropacheva

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064

¹ e-mail: bobkov@incras.ru

In this paper we investigate the distribution of myosin-9 in the cytoplasm of human embryonic lung fibroblasts. Using immunofluorescence, immunoprecipitation and western blotting, we demonstrated that myosin-9 forms multimolecular complexes with high molecular weight tropomyosin isoforms and actin in cytoplasm of cultured cells. We explored the levels of myosin-9, tropomyosin and actin in cytosol and cytomatrix extracts at different time points after LPA addition (20 ng/ml) to culture medium. Cytosole extracts from human embryonic lung fibroblasts were subjected to co-immunoprecipitation assay with polyclonal antibodies specific to C-terminal peptide of human myosin-9, or with monoclonal antibodies recognizing high molecular weight tropomyosin isoforms. The cross-immunoprecipitation method revealed changes in the composition of myosin-9/tropomyosin complexes under the action of LPA. We have observed the significant decrease in myosin-9 co-immunoprecipitated tropomyosin level immediately (1 min) after LPA addition. Additionally, we have found that LPA treatment during 1 h induces proteolytic degradation of myosin-9 with accumulation of 130 kDa and 40 kDa fragments in cytomatrix fraction. These results suggest that cytoplasmic multimolecular protein complexes containing myosin-9 and tropomyosin are involved in the regulation of cellular response to LPA.

Key words: protein complexes, myosin-9, tropomyosin, actin, cytoskeleton, fibroblasts, lysophosphatidic acid