

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биолого-почвенный факультет

Кафедра Генетики и Биотехнологии

Маликова Дарья Владимировна

**Изучение ядерной локализации тубулина и его участия в белковых
комплексах транскрипционного фактора NF- κ B**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена в лаборатории

«Биологии клетки в культуре»

Отдела клеточных культур Института Цитологии РАН.

Зав. Лаб. - д.б.н, профессор Пинаев Г.П.

Научный руководитель:

Науч. сотр., к.б.н. Хотин М.Г.

Куратор:

Ст. преп., к.б.н, доц. Голубкова Е. В.

Санкт-Петербург

2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Цитоскелет

2.1.1. Актиновый цитоскелет

2.1.2 Микротрубочковый цитоскелет

2.1.2.1. Компоненты, формирующие систему микротрубочек

2.1.2.2. Структура и функции тубулина

2.1.2.2.1. Изотипы тубулина

2.1.2.2.2. Посттрансляционные модификации тубулина

2.1.2.3. Белки, ассоциированные с микротрубочками

2.1.2.4. Влияние различных веществ на структуру микротрубочек

2.2. Цитоскелетные белки в ядре

2.2.1. Тубулин в ядре

2.3. Ядерно-цитоплазматический транспорт белков

2.4. Субклеточное фракционирование

2.4.1. Дифференциальное центрифугирование

2.4.2. Дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности

2.4.3. Дифференциальное центрифугирование с применением детергентов

2.4.4. Изолирование ядер их клеток животных

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Культивирование клеток

3.2. Выделение ядер

3.3. Определение состава ядерных белков фракции транскрипционных факторов методами SDS-электрофореза и иммуноблотинга

3.4. Иммунофлуоресценция

3.5. Подсчёт клеток и выделенных ядер в камере Горяева и статистическая обработка данных

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Проверка общепринятого метода очистки выделенных ядер

4.2. Разработка новых условий очистки ядер от остатков структур актинового и тубулинового цитоскелета

4.3. Анализ ядерной локализации тубулина в клеточной линии A431

4.4. Анализ солокализации р65 субъединицы транскрипционного фактора NF-κB и тубулина в клетках линии A431

4.5. Анализ ядерных белковых комплексов фракции транскрипционных факторов

5. ОБСУЖДЕНИЕ

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЦИТОРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВВЕДЕНИЕ

Цитоскелет — это клеточный каркас или скелет, находящийся в цитоплазме живой клетки. Он присутствует во всех клетках эукариот, так же некоторые элементы представлены и у прокариот. Он образует мобильную сеть в цитоплазме клетки, организует внутриклеточное пространство, определяя ее форму, участвует в клеточной адгезии и миграции.

В течение последних нескольких десятилетий неустанно накапливаются данные свидетельствующие о необычной для цитоскелета роли в механизмах передачи сигнала в клетке и в регуляции экспрессии генов. Однако наибольший интерес вызывает, тот факт, что белки цитоскелета помимо своей цитоплазматической локализации обнаруживают и ядерную. Это ставит перед исследователями множество вопросов: «что стимулирует перемещение их в ядро», «каким образом происходит транслокация», «в каких ядерных процессах они задействованны» и множество других. На данный момент достаточно много выяснено о роли системы микрофиламентов в процессах внутриклеточной сигнализации. Актин-связывающие белки обеспечивают связь между актиновыми структурами и мембранными рецепторами при взаимодействии последних с белками внеклеточного матрикса, ростовыми факторами и другими биологически активными веществами (Комалетдинова Ф.М. и Пинаев Г.П., 2006.)..

Поскольку в ядре реализуется генетическая информация, можно предположить, что функцией белков цитоскелета в ядре является контроль экспрессии генов и, возможно, координация ядерных и цитоплазматических процессов. Ядерный актин вовлечен в работу белковых комплексов, регулирующих процессы транскрипции, процессинга, сплайсинга и транспорте мРНК, ремоделирование хроматина и его перемещение. С другой стороны, известно о присутствии актина на внутренней стороне ядерной оболочки. Предполагают, что этот актин-содержащий комплекс белков стабилизирует ядерную оболочку. А также пул G-актина вовлечен в экспрессию большого количества цитоскелетных белков через регуляцию активности транскрипционного фактора SRF (Хотин М.Г., 2010.).

Считается, что тубулин играет ключевую роль в организации генетического материала во время деления клетки, находясь при этом в составе микротрубочек, и, как предполагается, лишь этим и ограничиваются его ядерные функции. Несмотря на то, что пул молекул димера α/β тубулина считается резервуаром субъединиц необходимых для полимеризации микротрубочек в цитоплазме, существуют несколько сообщений, поддерживающие наличие тубулина в ядре культивируемых клеток животных и даже в клетках растений.

Ранее в нашей лаборатории при исследовании ядерных белковых комплексов, содержащих альфа-актинин-4, при помощи методов тандемной масс-спектрометрии и иммунупреципитации было показано, что с ним ассоциировано, по крайней мере, около 50 различных белков, среди которых альфа- и бета- тубулины. Можно предположить, что тубулин и альфа-актинин, белки, которые являются важнейшими компонентами двух различных систем цитоскелета, таких как микротрубочки и актиновая сеть, вовлечены в одни процессы и, как следствие, выполняют сходные функции: главным образом, участвуют в организации структуры ДНК (Хотин М.Г., 2010.).

Транскрипционный фактор NF-κB регулирует активность большого числа генов, вовлеченных в различные клеточные процессы, такие как пролиферация, апоптоз, клеточный цикл и др. (Pahl., 1999). В неактивном состоянии NF-κB находится в цитоплазме. Известно, что в ответ на различные сигналы, в том числе и перестройки цитоскелета, происходит его перераспределение в ядро и активация NF-κB – зависимых генов.

По результатам немногочисленных исследований известно, что бета2-тубулин участвует в модуляции Notch-сигналинга (Yeh T. et al., 2004.). Также существуют данные, свидетельствующие о взаимодействии тубулина с транскрипционными факторами (Höög G., 2011.), что позволяет делать предположение о его вовлечении в регуляцию экспрессии генов.

К сожалению, все эти исследования не многочисленны. Их результаты подвергаются множеству сомнений, что не позволяет с уверенностью говорить о ядерной локализации молекул тубулина, а соответственно и об участии тубулинового цитоскелета в процессах, протекающих в клеточном ядре. Дальнейшее изучение ядерной локализации молекул тубулина в клетке является ключевым этапом в исследовании возможных механизмов участия цитоскелета в экспрессии генов. Выявление белковых партнёров тубулина, содержащегося в ядерных белковых комплексах, позволит продвинуться в понимании основных этапов передачи сигнала от поверхности клетки в ядро и реализации сигналов в виде изменения уровня экспрессии определенных генов.

Цель выпускной квалификационной работы: выявить тубулин в составе ядра клеток линии A431 и проверить его участие в составе белковых комплексов транскрипционного фактора NF-κB.

Достижение поставленной цели предполагает решение следующих задач:

1. Подобрать наиболее эффективный метод очистки клеточных ядер от фракции цитоплазматического тубулина.

2. Исследовать ядерную локализацию альфа- и бета- тубулина в клетках линии A431.
3. Проверить солокализацию молекул тубулина и транскрипционного фактора NF-kB.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Цитоскелет

Цитоскелет выполняет три основные функции: организует в пространстве содержимое клетки, определяет физическую и биохимическую связь клетки с внешней средой, и порождает согласованные силы, которые позволяют клетке двигаться и изменять форму. Для выполнения всех этих функций он объединяет активность множества молекул и органелл. Несмотря на смысл скрытый в слове «скелет», цитоскелет не является неизменной структурой, функции которой могут быть изучены и поняты по отдельности. Напротив, он динамичен, он состоит из полимерных молекул и регуляторных белков, которые находятся в постоянном движении (Fletcher and Mullins, 2010). Цитоскелет состоит из актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов.

Микротрубочки являются наиболее жёсткими структурами из всех трёх полимеров и характеризуются сложной динамикой сборки и разборки. Они представляют собой полые цилиндры диаметром 25 нм, состоящие из молекул тубулина собранные в длинные протофиламенты. Актиновые филаменты имеют менее жёсткую структуру, чем микротрубочки. Они формируются в результате полимеризации молекул G-актина, и за счёт их взаимодействия с различными актин-связывающими белками образуются различные структуры, таких как пучки параллельных филаментов, трехмерные и двумерные сети, выполняющие разные функции. Промежуточные филаменты являются наименее жёсткими по сравнению с остальными полимерами цитоскелета, и представлены фибриллами 8-12 нм в диаметре. Белки, образующие промежуточные филаменты, строго тканеспецифичны – это десмин, виментин, глиальный кислый белок, кератин, белки нейрофиламентов и ламин (Alberts et al., 2008.).

2.1.1. Актиновый цитоскелет

Молекулы G-актина, из которых образованы микрофиламенты, представлены глобулярной полипептидной цепью. Благодаря тому, что каждый мономер способен связываться с молекулами аденозинтрифосфата (АТФ) или аденозиндифосфата (АДФ), осуществляется процесс полимеризации-деполимеризации, в результате которого образуются фибриллярная форма актина – F-актин. Именно фибриллярный актин формирует обширную сеть микрофиламентов в клетке, а так же в связи с другими структурными и регуляторными актин–связывающими белками образует стабильные структуры, такие как стресс - фибриллы, кортикальный слой, ламеллоподии, филоподии, микрофорсинки и другие (Small J.V., 1988). Актиновые филаменты имеют форму двойной спирали 10 нм. Актиновые филаменты поддерживают плазматическую мембрану, обеспечивая её прочность и форму. Сеть сильно разветвлённых филаментов лежит в основании лидирующего края мигрирующих клеток и создаёт силу, необходимую для изменения формы клетки, как это происходит во время фагоцитоза. Благодаря тому, что микрофиламенты являются поляризованными полимерами, они служат в качестве трека для моторных белков, при взаимодействии с миозином, система актиновых микрофиламентов определяет сокращение в клетке. За счёт того, что актиновые филаменты способны к формированию псевдоподий клетка способна обследовать окружение вокруг себя, двигаться по направлению градиента химических веществ и осуществлять коммуникацию с другими клетками (Alberts et al., 2008; Fletcher and Mullins, 2010). Всё вышеописанное многообразие вторичных структур клетки обеспечивает прикрепление клеток к субстрату и обеспечивает возможность участия актинового цитоскелета в проведении сигнала от поверхности клетки в ядро.

2.1.2. Микротрубочковый цитоскелет

Микротрубочки присутствуют практически во всех эукариотических клетках в качестве основного компонента цитоскелета, они представляют собой длинные, цилиндрические белковые полимеры, полые внутри и состоящие, как правило, из 13 протофиламентов, сформированных в результате объединения молекул гетеродимера тубулина, благодаря чему микротрубочки могут достигать в длину до несколько десятков микрометров (Hyams J.S. and Lloyd C.W., 1994). Диаметр микротрубочек может варьировать от 22 нм до 25 нм. Они играют решающую роль в развитии и поддержании клеточной формы, при делении клеток, в внутриклеточном транспорте везикул, митохондрий и других компонентов клеток, а также принимают участие в клеточной

сигнализации. Микротрубочки представляют собой очень динамичные структуры, динамика их полимеризации жёстко регулируется как в пространстве, так и во времени. Функциональное разнообразие микротрубочек достигается несколькими способами: во-первых, за счёт связывания различных регуляторных молекул, включая микротрубочко-ассоциированные белки (MAPs, microtubule-associated proteins), со свободным, не полимеризованным, тубулином, а так же с внешней стороны микротрубочки вдоль её длины, или же с её концами, а во-вторых, в результате экспрессии разнообразных изотипов тубулина, которые, как предполагается, характеризуются различными функциями; и наконец, при помощи некоторых посттрансляционных модификаций, которым подвергаются молекулы тубулина (Jordan M.A. and Wilson L., 2004).

2.1.2.1. Компоненты, формирующие систему микротрубочек

Микротрубочки были обнаружены при помощи электронной микроскопии в 1963 году благодаря использованию улучшенного метода фиксации материала (Ledbetter M.C. and K.R Porter., 1963; Slautterback D.B., 1963), в стандартный протокол которого был добавлен этап обработки глутаральдегидом (Sabatini et al., 1963). Было дано первое полное их описание, и признан тот факт, что микротрубочки присутствуют во всех эукариотических клетках. Уже год спустя Borisy приступил к работе по изолированию ключевого компонента этих структур. В итоге в 1967 году удалось обнаружить белок, специфично связывающий колхицин. Наиболее высокая активность связывания была характерна для делящихся клеток изолированного митотического аппарата (Borisy G.G. and Taylor E.W., 1967), ресничек, хвоста сперматозоидов (Shelanski M.L. and Taylor E.W., 1967) и экстрактов, полученных из мозга свиньи. В 1968 году Mohri присвоил общепринятое имя этому белку – тубулин (Mohri H., 1968). Молекулы тубулина присоединяются друг к другу «голова к хвосту», образуя длинные протофибрилы, которые формируют полые цилиндрические структуры – микротрубочки, простирающиеся на несколько микрометров и более (Teicher V.A., Ch.3., 2008). Этот процесс называется полимеризацией и начинается в центросоме, особой органелле клетки, которая служит главным центром организации микротрубочек (ЦОМТ). Центросома состоит из пары центриолей, окруженных сложным набором белков - перичентриольного материала (ПЦМ). ПЦМ представлен фиброзным каркасом, который декорирован сотнями кольцевых структур, содержащими γ – тубулин (Moritz M. et al., 1995; Vogel J.M., 1997). Эти структуры получили название: γ – тубулинового кольцевого комплекса. По всей видимости, γ – тубулин является ключевым

фактором, необходимым для процесса нуклеации микротрубочек (Wiese C. and Zheng Y., 1999; Zheng Y et al., 1995). Для объяснения механизма нуклеации микротрубочек была предложена «модель матрицы». Согласно которой, γ – тубулиновый кольцевой комплекс находится на одном уровне с минус - концом микротрубочки и служит в качестве матрицы. Каждый такой комплекс содержит 13 молекул γ – тубулина, которые латерально взаимодействуют между собой и лежат в основе каждого протофиламента микротрубочки (Moritz M. et al., 2000). Во время клеточного деления микротрубочки образуют довольно сложную структуру, называемую митотическим веретеном, в которой их плюс-концы связаны с центромерными участками хромосом, а минус-концы закреплены в полюсах, содержащих центриоли. Процесс полимеризации микротрубочек сопровождается гидролизом гуанозинтрифосфата (ГТФ) до гуанозиндифосфата (ГДФ) и неорганического фосфата (P_i). Таким образом, сочетание особой ориентации структурных субъединиц микротрубочек с гидролизом ГТФ придаёт особые свойства, различающие противоположные концы микротрубочек. В связи с тем, что микротрубочки являются динамичными структурами, для них свойственны такие явления как динамическая нестабильность и тредмиллинг - движение микротрубочек в результате одновременного наращивания одного их конца и диссоциации другого. Динамическую нестабильность можно охарактеризовать как переключение между относительно небольшим темпом роста и быстрым укорочением двух концов микротрубочек. Во время тредмиллинга происходит сборка на «плюс» - конце микротрубочки и разборка на «минус», что приводит к формированию внутреннего потока тубулиновых субъединиц от «плюс» к «минус» концу. В обоих случаях необходим гидролиз ГТФ, иначе процесс присоединения молекул тубулина к микротрубочке будет невозможен (Teicher B.A., Ch. 3., 2008). Динамические свойства микротрубочек позволяют им быстро перестраиваться в ответ на внешние сигналы. За их регуляцию ответственна особая группа белков, которые имеют общее название – белки, ассоциированные с микротрубочками.

2.1.2.2. Структура и функции тубулина

Тубулин это мультисубъединичный белок микротрубочек. Он представляет из себя димер молекулярной массой около 110 kDa. При помощи гель-электрофореза высокого разрешения было установлено, что в состав димера входит 2 полипептидные цепи, молекулярной массой 56 kDa и 53 kDa, α - и β - тубулин, соответственно. Дальнейший анализ показал, что они не являются идентичными, но имеют сходную структуру (Feit and

Howard et al., 1971). Гетеродимер тубулина образован за счёт не ковалентного взаимодействия этих полипептидов. α - и β -тубулин характеризуются схожей компактной структурой. Вторичная и третичные структуры этих белков также значительно идентичны друг другу более чем на 40% относительно всей аминокислотной последовательности (Sander C. et al., 1991). Они представляют собой гибкие, глобулярные белки, содержащие около 25% α -спиральных структур и 40% β -слоёв. Поддержание третичной структуры осуществляется не за счёт дисульфидных связей, однако некоторые изоформы β - тубулина содержат в составе полипептидной цепи остатки цистеина, которые могут опосредовать взаимодействие с определёнными химическими веществами (Donald E.F. and Morejohn L.C., 1992.)

Молекула тубулина содержит три домена. N - концевой домен (1-206 аминокислотный остаток) формирует GTP - связывающий домен, при этом связывание GTP в α — субъединице необратимо (N-сайт) в отличие от β -субъединицы, где GTP связывается обратимо (E-сайт). В случае если в E-сайте располагается GDP, то микротрубочки находятся в метастабильном состоянии, для того чтобы предотвратить их разборку, с концом каждой микротрубочки связывается кэпирующий белок, который удерживает GTP в связанном состоянии с β -субъединицей. В формирование контакта между субъединицами в микротрубочках вовлечены как внутри - так и междимерные поверхности нуклеотида в белковой молекуле. Также в составе димера тубулина выделяют сайт связывания таксола, агента стабилизирующего микротрубочки. И последний домен образует гребень на внешней стороне микротрубочкового протофиламента. Не менее важную роль играет M-петля в формировании латеральных контактов между молекулами тубулина. (Nogales E. et al., 1998). Именно в этих доменах представлены наиболее выраженные различия между изо типами α и β — тубулина. В связи с этими данными, предполагают, что структура доменов определяет функциональную специфичность каждого изо типа (McKean P.G., et al 2001).

Совсем недавно, α - и β — тубулина, были открыты и другие формы тубулина, которые получили следующие названия: γ , δ , ϵ , ζ , η , θ и κ . δ — и ϵ — были найдены у хламидомона, мышей, человека и трипаносом. ζ — был обнаружен пока только лишь у кинетопластид. δ — тубулин имеет важнейшую роль в сборке жгутика у хламидомонад, но его роль в других организмах всё ещё предстоит выяснить, также как и функции других типов тубулина (Oakley B., 2000). Все эти варианты тубулина объединены в одну группу, тубулиновое суперсемейство. Возможно, в ближайшее время следует ожидать обнаружения и других представителей (Teicher, B.A., Ch.6., 2008.)

2.1.2.2.1. Изотипы тубулина

В эукариотических организмах экспрессируется множество изотипов α — и β — тубулина, при этом в определённых тканях животных наблюдается их консервативная экспрессия. (McKean P.G et al., 2001) Эти изотипы, кодируются различными генами и характеризуются отличиями в аминокислотных последовательностях. Отличия, как правило, высоко консервативны в эволюции, подтверждая, тем самым, что они функционально значимы. Существование различных изотипов тубулина, было предсказано, ещё задолго до определения аминокислотной последовательности молекул α — и β — тубулина (Ponstingl H et al., 1981.; Krauhs E, et al., 1981). В 1967 году Behnke и Forer предположили, что из-за различной стабильности микротрубочек, выполняющие различные функции, должны существовать и разные формы молекул тубулина. В дальнейшем это предположение вылилось в «мультитубулиновую гипотезу», которая постулировала, что существуют формы тубулина, которые характеризуются своей собственной специфичной функцией (Fulton C. and Simpson P.A., 1976). Фундаментально «мультитубулиновая гипотеза» верна, хотя не все свойства изотипов тубулина могут быть объяснены с этой точки зрения, но всё-таки в тех случаях, когда она применима, функциональные различия оказываются часто более тонкими и более сложными, чем предполагалось изначально (Teicher, B.A., Ch.6., 2008). Для некоторых систем были представлены экспериментальные данные, не подтверждающие того, что изотипы могут иметь специфическую локализацию или функции. Например, в тех случаях, когда некоторые изотипы экспрессировались в гетерологичной среде, то их локализация и функции соответствовали новому контексту той системы микротрубочек, в которую они включались. А также, эксперименты по переносу генов определили, что изотипы могут быть взаимозаменяемы (Ludueno R.F., 1998; Wilson P.G. and Borisy G.G., 1997).

Изотипы тубулина были найдены во многих организмах. Очевидно, что для организмов каждой филы эукариот характерно наличие нескольких изотипов α — и β — тубулина. Исключением является морской еж рода *Lytechinus*, где был обнаружен лишь один ген α — тубулина, однако, возможно, в скором времени будут открыты и другие гены, так как у других представителей данного класса, таких как *Paracentrotus* и *Strongylocentrotus*, были выявлены их несколько (Alexandraki D. and Ruderman J. 1983; Gianguzza F. et al 1989; Edvardsen R.B. et al 2002). Подобная ситуация наблюдается и у растений. (Teicher, B.A., Ch.6., 2008). С протистами и грибами дело обстоит сложнее. Такие организмы, как *Candida* и *Histoplasma* экспрессируют лишь по одной форме α — и β — тубулина (Ludueno, R.F. 1998). Другие представители имеют единственную форму β — тубулина и

несколько форм α — тубулина. Интересно, что обратного паттерна, когда присутствовала бы единственная форма α — тубулина и несколько изоформ β — тубулина, обнаружено не было. При анализе паттерна экспрессии изоформ тубулина у растений и животных напрашивается вывод о том, что многоклеточность определяет существование множества форм того или иного белка. Также различные паттерны экспрессии тубулина были исследованы и среди протистов. Оказалось, что среди представителей этой группы широко распространены различные варианты изоформ, что, возможно, отражает их сложную клеточную архитектуру. Возникает вопрос, какими же специфическими функциями обладают изоформы и почему же их различия столь консервативны особенно среди позвоночных? Очевидно, что эта разница имеет значение, которое остаётся пока не доказанным. Была сформирована модель, согласно которой все изоформы являются взаимозаменяемыми, их специфичная функция определяется некой областью аминокислотной последовательности, которая в процессе эволюции заполняется случайным образом. При этом один изоформ не может мутировать в другой, т.к. промежуточные формы не жизнеспособны. Это помогает объяснить сохранность различий между изоформами в эволюции. Также изоформы тубулина характеризуются специфичной тканевой локализацией. В связи с этим можно предположить, что при дифференцировке ткани экспрессия определённой кассеты генов осуществляется таким образом, что происходит включение только определённого гена, что обеспечивается специфичными факторами. Что приводит к отличному спектру молекул в разных тканях. Каждый изоформ будет принимать участие как в общих процессах, таких как митоз, так и в тканеспецифичных, например, секреция в печени или движение жгутика клеток трахеального эпителия. Конечно же, идеальным путем для решения проблемы определения функциональной значимости отдельных изоформ является демонстрация того, что они не могут заменять друг друга при выполнении тех или иных функций. Таким образом, присутствие того или иного изоформа в ткани не является окончательным доказательством того, что их различия функционально значимы. Тем не менее, во многих случаях, распределение изоформ в тканях и даже в разных типах клеток той же ткани более сложное, чем это представляется в начале. Удивительно, что соседние клетки могут различаться по составу изоформ, даже те которые выполняют схожие хоть и не идентичные функции, например, во внутренних и внешних волосковых клетках улитки уха. К тому же, паттерн распределения изоформ может варьировать в течение тканевой дифференцировки (Teicher, B.A., Ch.6., 2008).

2.1.2.2. Посттрансляционные модификации тубулина

Молекулы тубулина подвергаются множеству посттрансляционных модификаций. Среди всего набора модификаций можно выделить как общие, характерные для многих белков, это ацетилирование, фосфорилирование, пальмитилирование, так и специфичные, которым, по-видимому, подвергаются лишь молекулы тубулина, к этой группе относятся полиглутаминирование, тирозинирование/детирозинирование и полиглицилирование. Несмотря на то, что эти модификации встречаются крайне редко, они широко распространены среди мира эукариотического тубулина, поддерживая их древнее происхождение (Teicher B.A., Ch.5., 2008). Благодаря тому, что большинство изменений обратимы, это позволяет создавать высоко динамичные субгруппы внутри популяции тубулина. Несмотря на то, что эти модификации наделяют молекулы определёнными биохимическими различиями, они, в свою очередь, могут скрывать некоторые изотип-специфичные особенности, сокращая гетерогенность тубулина. Пока накопленные данные не могут объяснить в полной мере все свойства микротрубочек, приобретённые в результате модификаций тубулина. Как предполагается, они определяют стабильность и время жизни микротрубочек, взаимодействие их с моторными белками, некоторые из них определяют выживание всего организма (Rosenbaum J., 2000).

2.1.2.3. Белки, ассоциированные с микротрубочками

Тонкое изменение поведения микротрубочек в различных клетках и на разных этапах клеточного цикла может быть обусловлено широким спектром белков, ассоциированных с микротрубочками (microtubule associated proteins, MAPs).

Фосфорилирование MAPs является ключевым фактором в регуляции динамики микротрубочек (Drewes G., 1998). Три основных класса белков взаимодействует с микротрубочками. К первому относятся, так называемые, структурные белки, которые обратимо связываются с микротрубочками, обеспечивая их сборку и последующую стабилизацию, а так же вызывают формирование пучков. Ко всему прочему, они могут быть выделены вместе с микротрубочками в результате нескольких циклов сборки и разборки. К представителям этой группы можно отнести такие фибриллярные белки, как MAP1a и 1b, MAP2a, 2b и 2c, tau, которые имеют огромное значение в дифференциации и функционировании нервной системы; мутации в tau – белке приводят к деменциям, так называемым, таупатиям. Не менее важную роль играют нарушения в структуре этого белка при патогенезе болезни Альцгеймера (Mandelkow E. and Mandelkow E.M., 1995).

Другой класс включает в себя моторные белки, названные так, потому что они способны к перемещению используя химическую энергию, высвобождаемую при гидролизе аденозинтрифосфата (АТФ). Главными представителями этого класса являются кинезины, белки которые осуществляют транспорт к дистальному, «плюс», концу микротрубочки, и динеины, белки, которые осуществляют транспорт в обратном направлении, а также вовлечены в процесс изгибания жгутиков и ресничек. В отличие от структурных MAPs они не очищаются вместе с микротрубочками (Mandelkow E. and Mandelkow E.M., 1995).

И к третьему наиболее гетерогенному классу относятся белки, которые обычно не называются MAPs, но при этом очень часто оказываются ассоциированными с микротрубочками. Среди них представлены гликолитические ферменты (например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и альдолза), киназы, белки, вовлеченные в биосинтез (фактор элонгации EF-1 α и даже целые рибосомы), белки связанные с мембранными рецепторами и рибонуклеопротеины, несущие мРНК (Mandelkow E. and Mandelkow E.M., 1995)

Таким образом, организация интерфазных микротрубочек и митотического веретена, а также их структура, существенно меняющаяся в течение клеточного цикла и развития, в значительной степени зависит от взаимодействий между микротрубочками и вспомогательными белками.

2.1.2.4. Влияние различных веществ на структуру микротрубочек

Есть вещества, которые взаимодействуя с молекулами тубулина или же с самими микротрубочками, влияют на их динамические свойства, что приводит к нарушению тонкого баланса в клетке. Неоспоримым является тот факт, что тубулин необходим для роста клетки, поэтому, с медицинской точки зрения, микротрубочки представляют собой прекрасную мишень для подобных веществ в контроле многих заболеваний, как раковых, так и паразитических болезней человека. (Amos L., 2011). Помимо всего прочего многие из этих соединений используют в лабораторно практике. Среди них представлены, как природные соединения, полученные из различных организмов, так и их синтетические аналоги. Большинство молекул взаимодействуют практически со всеми изотипами тубулина, хотя некоторые из них селективно активны против определённого набора изотипов. Молекулы отличаются удивительным разнообразием своих структур и демонстрируют множество путей сдвига равновесия между пулом димера тубулина и собранными микротрубочками. Например, гидролиз ГТФ протекает нормально в

присутствии таксола, в присутствии колхицина он усиливается, а в случае винбластина, он полностью блокируется (Rai S.S., 1996; Cormier A. et al., 2010).

Все соединения можно разделить на две группы. К первой относятся вещества, которые блокируют сборку микротрубочек, среди них, наиболее известными являются колхицин, нокодазол и винбластин. Одни агенты из этой группы связываются с изогнутыми протофиламентами не позволяя им формировать латеральные контакты и образовывать микротрубочку. Другие же связываются с концом микротрубочки, что препятствует дальнейшей сборки. Они могут фрагментировать микротрубочки на короткие кольцевые олигомеры, или преобразовывать их в длинные спирали. Вторая группа объединяет соединения, которые обеспечивают стабилизацию микротрубочек. Как правило, они связываются с сайтами для MAPs. Это приводит к тому, что субъединицы тубулина связаны между собой настолько плотно, что сборка становится необратимой. Наиболее известным представителем этой группы является Таксол, он и его аналоги успешно используются при лечении раковых заболеваний различного генеза (Amos L., 2011).

2.2. Цитоскелетные белки в ядре

О ядерной локализации актина впервые было сообщено в работах Охниши. Актин был выделен из ядер клеток тимуса телёнка (Ohnishi et al., 1963, 1964). Немного позже актин был обнаружен в качестве компонента ядра амфибий (Clark T.G. and Merriam R.W., 1977; Clark T.G. and Rosenbaum J.L., 1979), клеток млекопитающих (Nakayasu H. and Ueda K., 1983) и на очищенных препаратах ядрышек человека (Andersen J.S. et al., 2002). По всей видимости, количество актина в ядре постоянно у разных видов так же как и в различных типах клеток (Hofmann, 2009). Так в ядрах *Physarum polycephalum* (Jockusch et al., 1974), в клетках линии HeLa (Peterson and Mc Conkey, 1976), печени крыс (Douvas et al., 1975) и ооцитах амфибий (Clark T.G. and Merriam R.W., 1977; De Robertis et al., 1978; Gounon, 1981; Lestourgeon et al., 1975) содержание актина было оценено в 4-11 % от всех не гистоновых белков.

За последнее десятилетие был достигнут огромный прогресс в изучении функций актина в ядре. Основываясь на данных о количественном содержании ядерного актина, а также на экстраполяции известного разнообразия его цитоплазматических функций, не удивительно, что актин в ядре вовлечён во множество протекающих там процессов. Обнаружено участие актина в работе всех трёх РНК-полимераз, процессинге и транспорте РНК, он входит в состав рибонуклепротеиновых частиц (Smith et al., 1979; Egly et al., 1984;

Sauman and Berry, 1994). Актин и актин-подобные белки были найдены в белковых комплексах ответственных за ремоделирование и модифицирование хроматина (Zhao et al., 1998). Немаловажную роль он играет в поддержании конденсированного состояния хромосом во время мейоза и митоза (Goldstein et al., 1977a; Jockusch et al., 1971), а также необходим при сборке и стабилизации ядерной ламина (Zhang et al., 1996).

Помимо актина в ядре обнаружены и ряд актин связывающих белков. Первым в составе ядра был обнаружен кофилин (Nishida et al., 1987), но за последнее десятилетие список многократно вырос, таким образом, в ядре обнаружены профилин, винкулин, тимозин β_4 , CapG, гельзолин, FliI, миоподин, α -актинины, пластины (фимбрины), супервилин и филамин. Считается, что они могут служить матрицей для сборки сигнальных молекул и взаимодействовать с рядом транскрипционных факторов. А также осуществлять непосредственный перенос связанных с ними сигнальных молекул в ядро (Комалетдинова Ф.М. и Пинаев Г.П., 2006). К тому же функции актин-связывающих белков в ядре, как и в цитоплазме связаны с функционированием актина.

2.2.1. Тубулин в ядре

Не смотря на то, что молекулы тубулина рассматриваются как резервуар субъединиц доступных для сборки микротрубочек в цитоплазме, существуют немногочисленные данные поддерживающие присутствие тубулина в ядре различных клеток. Менко и Тан (1980) локализовали и очистили ядерный тубулин из клеток линии 3Т3. Основываясь на способности выделенного тубулина связывать колхицин и его электрофоретической подвижности, был сделан вывод, что он ничем не отличается от того, который получают, например, из бычьего мозга. В дальнейшем была продемонстрирована ядерная локализация тубулина в клетках яичника китайского хомячка при помощи техники иммуномечения золотом (Armbruster et al., 1983). Так же тубулин был обнаружен в клетках мезанглия почки, в клеточных линиях С6 и Т98G - клетки глиомы, MCF-7, Calc 18, MDA-MB-435 - клетки раковых опухолей молочной железы, HeLa-клеточная линия полученная из раковой опухоли шейки матки, а также LNCaP-карцинома простаты (Walss et al., 1999; Walss-Bass et al., 2001; Xu and Ludueña, 2002). Однако при исследовании нормальных – не трансформированных клеток ядерный тубулин не был обнаружен (Walss-Bass et al., 2002). Выяснено, что мажорной ядерной формой тубулина является β_{II} - тубулин. Проводилось так же изучение ядерной локализации изотипов β_{I} -, β_{III} - и β_{IV} – тубулина, однако их не было обнаружено в ядре (Walss-Bass et al., 1999). При анализе раковых опухолей различного происхождения в 75% случаев был обнаружен

бета_{II}-тубулин в составе ядра. Интересно, что в близлежащих тканях раковой опухоли он так же выявлялся, в то время как в тканях здоровых людей, никогда не переносивших раковые заболевания ядерного тубулина нет (Yeh I.-T. and Ludueña, 2004). Но это не единственная форма тубулина, обнаруженная в составе ядра. Также в ядре был обнаружен гамма – тубулин, ключевой фактор в процессе нуклеации микротрубочек (Höög et al., 2011).

Считается, что ядерный тубулин представлен в виде гетеродимера, состоящего из альфа- и бета- цепей (Teicher B.A., 2008), однако он не способен полимеризоваться и формировать микротрубочки в ядре (Walss-Bass et al., 1999). Он может связываться с молекулами колхицина и таксола. Связывание таксола происходит с меньшей специфичностью, в сравнении с таковой при взаимодействии его с цитоплазматическим тубулином. При обработке трансформированных клеток таксолом наблюдалось дозозависимое уменьшение тубулина в ядре, и с течением времени клетки уходили в апоптоз. Предполагается, что уменьшение тубулина в ядре связано с миграцией его в цитоплазму и встраиванием в микротрубочки (Xu and Ludueña, 2002). Как правило, молекулы тубулина равномерно распространены по всему ядру, однако несколько большее его количество сосредоточено в ядрышке, что согласуется с данными о нахождении тубулина в составе белковых комплексов, содержащих фибрилларин - фермент входящий в snRNP (small nuclear ribonucleic particles), участвующего в первом этапе процессинга рРНК (Yanagida et al., 2004). Но в то же время есть данные демонстрирующие отсутствие тубулина в ядрышках. Так, не было выявлено тубулина в ядрышках клеток линий Calc 18 и HeLa (Akoumianaki et al., 2009; Walss-Bass et al., 2002). Тубулин был обнаружен в составе ASC-2 комплекса, который осуществляет метилирование гистонов и вовлечен в коактивацию транскрипции (Goo et al., 2003). Ранее в нашей лаборатории при исследовании ядерных белковых комплексов, при помощи методов tandemной масс-спектрометрии и иммунопреципитации было показано, что альфа- и бета- тубулины ассоциированы, с белковыми комплексами альфа-актина 4 (Khotin et al., 2010).

Так же есть данные, указывающие на вовлечение ядерного тубулина в регуляцию экспрессии генов. Предполагается, что бета_{II} – тубулин участвует в модуляции Notch – сигналинга, через связывание с Notch 1 рецептором и с C promoter - bindingfactor 1 response elements (Yeh et al., 2004). Белковый уровень гамма-тубулина регулирует транскрипционную активность E2F, транскрипционного фактора вовлечённого в регуляцию клеточного цикла и синтеза ДНК в клетках млекопитающих. В присутствии

ядерного гамма – тубулина комплекс содержащий E2F и RB осуществляет транскрипцию генов, необходимых для перехода в S – фазу клеточного цикла (Höög et al., 2011).

2.3. Ядерно-цитоплазматический транспорт белков

В эукариотической клетке, благодаря тому, что генетическая информация заключена в ядре, становится возможным пространственное и временное отделение репликации и транскрипции ДНК от белкового синтеза. Такая компартментализация позволяет обеспечить высокий уровень регуляции этих процессов, но вместе с этим возникает необходимость в системе селективного макромолекулярного транспорта между ядром и цитоплазмой. Термин ядерно-цитоплазматический транспорт описывает перемещение большого разнообразия макромолекул, как из ядра, так и в ядро.

Ядерно-цитоплазматический транспорт опосредуют особые белковые каналы, пронизывающие ядерную оболочку – ядерные поровые комплексы (nuclear pore complex, NPC) (Ryan K.J. and Wente S.R., 2000). Известны два возможных механизма транспортировки: пассивный, в виде мономеров за счет свободной диффузии, и активный транспорт, опосредованный специфичными рецепторами и вспомогательными факторами. Рецепторы имеют общее название кариоферины. В зависимости от направления транспорта их подразделяют на импортины и экспортины. Несмотря на то, что они характеризуются низкой степенью схожести между собой, все транспортные рецепторы способны связываться с белками ядерной поры и с малой GTPазой Ran. Они выборочно связываются с субстратом («грузом»), предназначенным для импорта или для экспорта, и после чего осуществляют его доставку в соответствующий пункт назначения (Рис.) (Daelemans D. et al., 2005).

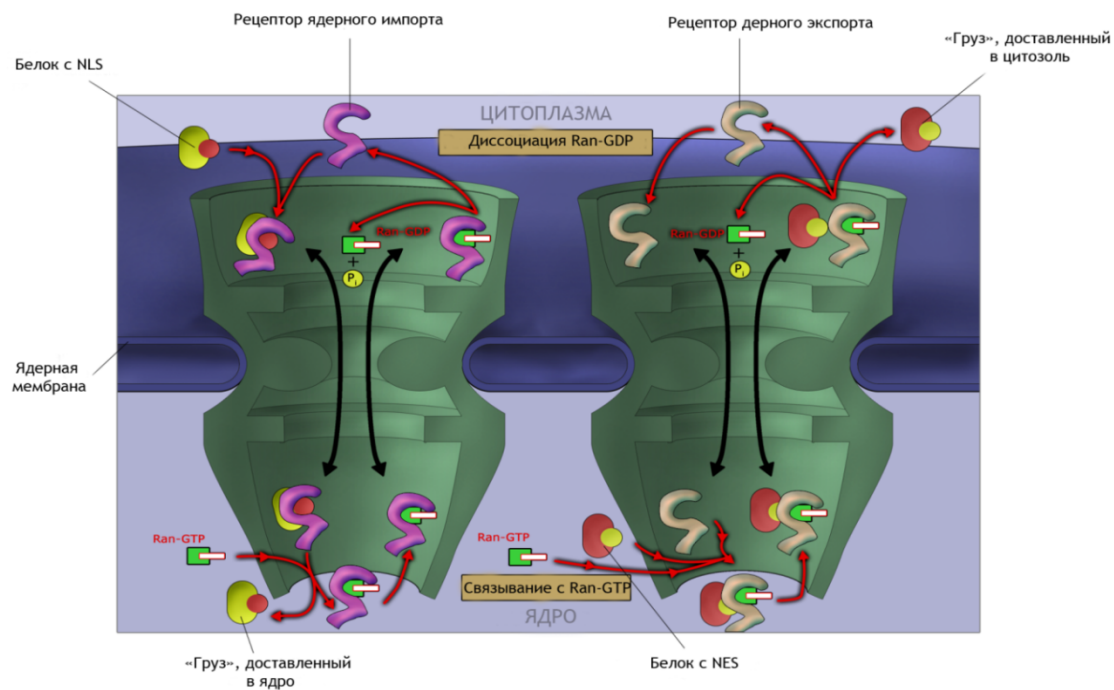


Рис. Ran – зависимый ядерно-цитоплазматический транспорт

Через ядерные поры транспортируются многие макромолекулы, включая белки и РНК, они могут перемещаться как по отдельности, так и в составе крупных комплексов, например, рибосомные субъединицы. Маленькие молекулы, такие как ионы и белки массой до 40 кДа. Могут перемещаться через ядерные поры пассивно, однако перемещение более крупных белков осуществляется благодаря активному транспорту (Wente S.R., 2000). Направления транспорта белков регулируют особые последовательности, распознаваемые транспортными рецепторами. NLS (nuclear localization signal) отвечает за импорт в ядро, и NES (nuclear export signal), ответственная за транспорт из ядра в цитоплазму (Kutay U. and Guttinger S., 2005; Pemberton L.F., 2005). Движущая сила ядерно-цитоплазматического транспорта создаётся за счёт образования градиента RanGTP через ядерную мембрану. Фактор, обменивающий гуаниловый нуклеотид на Ran (RanGEF) заключён внутри ядра, в то время как, белок, активирующий GTPазу Ran (RanGAP) локализован в цитоплазме. Ran GEF переводит RanGDP в RanGTP, и RanGAP активирует RanGTPазу, для того чтобы осуществить гидролиз ГТФ в ГДФ. Что в конечном итоге приводит к созданию высокой концентрации RanGTP в ядре и высокого уровня RanGDP в цитоплазме. RanGTP обеспечивает связывание груза с ядерным рецептором, а RanGDP напротив способствует диссоциации экспортируемого комплекса (Daelemans D. et al., 2005). Помимо Ran-зависимого ядерно-цитоплазматического транспорта также обнаружены примеры альтернативного, так называемого Ran-независимого транспорта белков. Так например, альтернативные механизмы

транспортировки описаны для β - катенина, импортина - $\beta 1$, транспортина 1, Crm1, экспортина t, hnRNP K, кальмодулина, ERK, NHP6A, импортина - α , белков семейства STAT, TIAR и TIA-1, ингибитора cAMP-зависимой киназы (PKI, protein kinase A inhibitor) и глюкокортикоидного рецептора (Сорокин с соавт., 2007).

Ядерно-цитоплазматический транспорт является важнейшим процессом для нормального функционирования клетки. В настоящее время достаточно много известно о механизмах транспорта как внутри, так и за пределами ядра, идентифицированы главные факторы транспорта – импортины, экспортины, нуклеопорины и Ran регуляторы. Но, несмотря на это, важно понять каким образом осуществляется регуляция различных механизмов транспорта. Одним из популярных методов исследования является применение ингибиторов транспортных рецепторов или специфичных факторов. Так, например, для изучения транспорта из ядра применяют антибиотик Лептомицин Б. Применение такого инструмента, позволяет изучать роль CRM1/exportin 1 в процессе экспорта (Kudo N., 1999). Сейчас становится очевидным, что обычная локализация белка в клетке не всегда отражает его биологическую функцию. Например, обычная цитоплазматическая локализация белка не позволяет проследить его динамику как внутри, так и за пределами ядра. Однако, используя Лептомицин Б, как инструмент блокирующий CRM1 – опосредованный транспорт из ядра, становится возможным детектировать белок внутри ядра, в результате его накопления там (Рис.).



Рис. Лептомицин Б блокирует NES-зависимый CRM 1 – опосредованный экспорт белков.

2.4. Субклеточное фракционирование

Для решения многих вопросов касающихся структуры, организации и функционирования внутриклеточных органелл, необходимо изолировать их в форме пригодной для дальнейших биохимических исследований (Cooper G.M., 2000). Техники субклеточного фракционирования широко применяются для исследования локализации,

процессинга и транспорта молекулярных компонентов (Graham J.M. and Rickwood D., 1997). Цель большинства методик субклеточного фракционирования это получение клеточных органелл и макромолекул в функциональном состоянии, в котором они сохраняют большинство своих оригинальных биохимических свойств. Классические методики предназначенные для выделения органелл и внутриклеточных структур, такие как – дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности, активно используются в большинстве исследований. Стоит отметить, что не всегда использование этих методов позволяет получить чистые от контаминирующих белков фракции. Это представляет собой главное ограничение в их использовании и приводит к необходимости разработки новых методов или модификации старых (Yie Hou Lee et al., 2010).

2.4.1. Дифференциальное центрифугирование

Субклеточное фракционирование позволяет разделить органеллы, основываясь на их физических и биологических свойствах. Это обычно достигается использованием механических средств разрушения клеточных мембран, детергентов и осмотического шока для лизиса клеток, с последующим фракционированием клеточных компонентов при помощи дифференциального центрифугирования. Этот метод впервые разработал де Дюв в 1955 году (De Duve C. and Beaufay H., 1981). Механические способы разрушения клеток применяются главным образом для удаления плазматической мембраны клетки, что позволит сохранить неповреждёнными внутриклеточные структуры. Среди них: соникация – воздействием ультразвуком, измельчение в гомогенизаторах или в высокоскоростных блендерах (Cooper G.M., 2000). Эти процедуры разрушают множество мембран клетки, в том числе плазматическую мембрану и эндоплазматический ретикулум, на фрагменты, которые немедленно восстанавливаются, формируя маленькие везикулы. Однако если с осторожностью проводить подобные процедуры, это позволит таким органеллам, как ядро, митохондрии, Аппарат Гольджи, лизосомы и пероксисомы оставаться в значительной степени неповрежденными. Суспензия клеток, таким образом, превращается в плотный гелеобразный раствор, называемый гомогенат или экстракт, который содержит разнообразные мембранные органеллы, каждая из которых характеризуется различным размером, зарядом и плотностью (Alberts B. et al., 2007). Разные компоненты гомогената должны быть, затем отделены друг от друга. Подобное

клеточное фракционирование стало возможно лишь после того как в 1940х годах появилось промышленное производство препаративных ультрацентрифуг. С их использованием под действием центробежной силы можно отделить более тяжелые компоненты клеточных лизатов от легких. Например, центрифугируя клеточные лизаты отделить ядра от цитоплазмы (Рис.1).

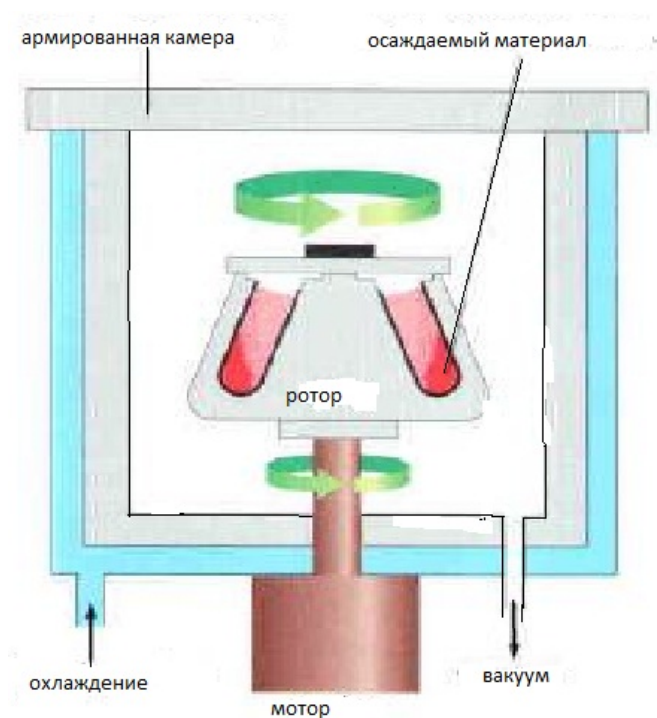


Рис 1. Пробирка с образцом, расположенная в цилиндрическом отверстии металлического ротора, подвергается воздействию центробежной силы, за счёт быстрого вращения ротора, в результате чего происходит осаждение частиц из образца. Вакуум уменьшает трение, предотвращая перегревание ротора и позволяя системе охлаждения поддерживать постоянную температуру образца на уровне 4°С

Как правило, для разделения различных групп внутриклеточных компартментов или органелл клетки гомогената применяют серии последовательного центрифугирования при различных скоростях. В результате чего осуществляется разделение компонентов клетки по размеру и плотности (Dreger M., 2003). На относительно низкой скорости (1000 x gravity), крупные компоненты клетки, такие как ядро, осаждаются, формируя на дне центрифужной пробирки осадок, при большей скорости (20000 x gravity), образуется осадок, состоящий из митохондрий, и наконец, в случае очень высоких скоростей (150000 x gravity) центрифугирования в течение долгого времени удаётся собрать маленькие везикулы и даже рибосомы. Стоит отметить, что полученные таким способом фракции перекрестно загрязнены друг другом и мембранами разрушенных органелл, Финальная очистка возможна путем повторной очистки центрифугированием (рис.2).

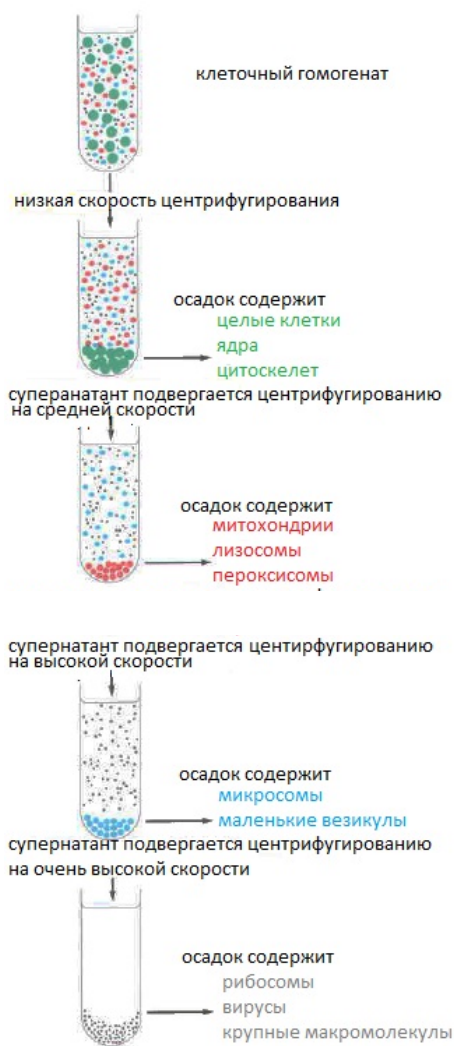


Рис. 2 Схема дифференциального центрифугирования

Однако этот метод имеет низкую разрешающую способность, что может привести к получению фракции, содержащую несколько типов органелл, характеризующихся сходной скоростью седиментации (Yie Hou Lee et al., 2010).

2.4.2. Дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности

Для разделения клеточных компонентов более широко применяется метод центрифугирования в непрерывном или дискретном градиенте плотности многочисленных сред, например, сахароза, которые могут отличаться по осмолярности, вязкости и плотности. Клеточный гомогенат наносится на поверхность среды и центрифугируется. Во время центрифугирования органеллы сосредотачиваются в той

части градиента, где их плотность равна плотности окружающей среды (изопикническая точка). В этом случае скорость осаждения органелл зависит от различия в плотности органеллы относительно среды, что в свою очередь определяется составом компонентов органелл, липид/белковым соотношением, размером и формой (De Araujo M.E. et al., 2008). Для примера, митохондрии характеризуются высокой плотностью, из-за содержания большого количества белка, в то время, как лизосомы имеют низкую плотность в связи с наличием мембран обогатённых липидами. Сахароза, наиболее часто применяемая среда для центрифугирования в градиенте плотности, так как характеризуется инертностью и дешевизной. Кроме того также используют и другие среды, такие как фикол, перкол, никоденз и митрозамид (Graham J. M. et al., 1990). В непрерывном градиенте плотность среды увеличивается линейно на протяжении всей пробирки, в случае же дискретного градиента, среда разделена на последовательные участки фиксированной плотности. В течение центрифугирования в дискретном градиенте плотности, клеточные органеллы сосредотачиваются на межфазных участках среды. С другой стороны, во время центрифугирования в непрерывном градиенте плотности, разделение происходит благодаря распределению органелл через весь градиент, и их накопление осуществляется в изопикнических точках. Этот способ обладает большим разрешением по сравнению с центрифугированием в дискретном градиенте плотности. Однако, для большинства исследователей способ центрифугирования в непрерывном градиенте плотности сопряжён с трудностями, так как такие растворы для приготовления требуют долгого времени и применение специальных устройств. В настоящее время способ разделения клеточных органелл при помощи центрифугирования в градиенте плотности остаётся наиболее популярными, существует множество его модификаций, и используется для множества исследований белкового состава органелл (Graham J.M, and Rickwood D., 1997).

2.4.3. Дифференциальное центрифугирование с применением детергентов

Помимо двух выше приведённых методов существует ещё один, который направлен на сокращение количества контаминирующих белков от других органелл и избежание трудоёмких этапов центрифугирования путем использования специальных буферов в течение субклеточного фракционирования. Это так называемое дифференциальное центрифугирование с применением детергентов, этот метод позволяет фракционировать белки в их нативном состоянии в соответствии с четырьмя локализациями (цитоплазматические; мембранные и белки мембран органелл; растворимые и

ассоциированные с ДНК ядерные белки; цитоскелетные белки) (Ramsby M.L. and Makowski G.S., 2005). Данный метод применим для исследований замороженных тканей, было показано, что в этом случае не наблюдается потерь в охвате совокупности белков или информации об их локализации (Van den Berg B.H., 2007). А также он использовался при фракционировании культивированных нейронов для выделения цитоплазматических, мембранных, ядерных и цитоплазматических белков для дифференциального протеомного анализа (Bernocco S. et al., 2008).

2.4.4. Изолирование ядер из клеток животных

Изучение клеточного ядра и событий, происходящих в ядре, необходимо для понимания ряда процессов наиболее важных в клеточной биологии, включая структуру хроматина, регуляцию транскрипции, синтез и процессинг РНК, механизм и регуляцию двунаправленного ядерного транспорта, и ядерного апоптоза. Т.о. подготовка ядер и ядерных экстрактов часто является первым этапом при изучении ядерных компонентов и событий, происходящих в нём (Watson N., 1999).

Очень важно тщательно подобрать метод выделения клеточных ядер для того чтобы в итоге получить ядра с желаемыми свойствами. В некоторых случаях, таких как изучение ядерного транспорта и исследование *in vitro* процессов сборки и разборки ядра, необходимо изолировать ядра с неповреждённой ядерной оболочкой, то есть выделенные ядра должны иметь интактные внутреннюю и внешнюю мембраны и структуру ядерных пор (Kihlmark M. and Hallberg E., 1998). Так как наружная ядерная мембрана является продолжением шероховатого эндоплазматического ретикулума, такие ядра характеризуются значительным уровнем загрязнения со стороны цитоплазмы, что может служить препятствием при очистке компонентов ядра или сделать не возможным чёткую интерпретацию данных при изучении локализации тех или иных молекул. Кроме того, процедуры, при которых происходит удаление ядерных мембран, предпочтительны для изучения компонентов нуклеоплазмы и функций не связанных с ядерным транспортом.

Все методы, применяемые для выделения ядер, можно разделить на две основные группы: первая группа включает в себя безводные или механические методы, и вторая, методы, основанные на использовании водных растворов сахарозы или солей (Murray K., 1965). Механические методы разрушения клеток включают в себя техники с применением стеклянных гомогенизаторов или же разрушение клеток при помощи пропускания клеток через иглу шприца (Asscher Y. and Barnea E.). При другом варианте вскрытия клеток

применяют, так называемые лизирующие буферы, это гипотонические растворы сахарозы или солей с добавлением или без добавления детергентов, таких как Nonidet P-40 или Igepal CA-360. В связи с тем, что ядра являются очень крупными органеллами в клетке, они достаточно легко отделяются от других органелл и от детергент-растворимых компонентов цитоплазмы при помощи центрифугирования на низких скоростях и последующим очищением повторяющимися отмывками в том же лизирующем буфере. Для выделения ядер из плотных тканей или из культуры клеток с хрупкими ядрами применяют очистку с использованием центрифугирования через плотную подушку сахарозы для защиты ядер и полного удаления компонентов цитоплазмы, которые загрязняют полученную фракцию клеточных ядер (Marzluff W.F. and Huang R.C.C., 1984; Greenberg M.E. and Bender T.P., 1997; Farrell Jr.R.E., 1998).

Согласно стандартным протоколам адгезионные клетки, культивируемые на чашках Петри, соскребаются в PBS при помощи специального скребка, собираются в пробирку и осаждаются центрифугированием, после чего лизируются в специальном буфере. Однако, клетки собранные таким образом представляют собой гетерогенную группу, содержащую как интактные, так и повреждённые клетки, клеточный дебрис и отдельные ядра. Это часто приводит к низкому и вариабельному выходу клеточных ядер и удлинению времени, во время которого лизируются клетки. Для изоляции ядер из тканей животных, клеточных культур с хрупкими ядрами или клеточных культур, которые тяжело лизируются (например, эпителиальные клетки с плотными контактами) предпочтение отдаётся применению детергентов и физическому гомогенизированию, процедуры осуществляются в изоосмотическом сахарозном буфере с последующей очисткой путём ультрацентрифугирования в плотной (2 M) сахарозной «подушке» (Marzluff W. F. and Huang, R.C.C., 1984; Farrell Jr.R.E., 1998). Но большинство клеточных ядер не достаточно плотные для того чтобы пройти через раствор такой высокой плотности, что приводит к уменьшению конечного выхода очищенных ядер (Watson N., 1999).

Все процедуры изолирования клеточных ядер имеют общие технические проблемы. Контаминация эндогенными протеазами и нуклеазами, экстракция и физические пертурбации из-за использования детергентов могут неблагоприятно сказаться на целостности и ядер. Кроме того, ядра могут стать более хрупкими в связи с потерей ядерных мембран. Эти потенциальные проблемы, как правило, преодолимы если все процедуры осуществлять при 4°C в течение очень короткого времени, необходимо применение ингибиторов протеаз и/или нуклеаз, которые добавляют в буферы, для предохранения белков интереса от ферментативного гидролиза (Watson N., 1999).

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Культивирование клеток

Клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Санкт-Петербург) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США) и 0,1% гентамицина в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °C.

3.2. Выделение ядер

Для получения ядер использовали метод, описанный ранее (Бабаков и др., 2004) с некоторыми модификациями. Клетки с чашек снимали при помощи резинового скребка, собирали и отмывали в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl pH 8.0 , 0.32 M сахарозы, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM дитеотриетол (ДТТ), 0.2 mM PMSF и ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария). После центрифугирования клетки ресуспендировали в том же буфере и инкубировали 20–40 мин (до момента лизиса) во льду. Для выделения и очистки ядер клеточный лизат 20 раз пропускали через иглу диаметром 21G. При использовании стандартного протокола ядра осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2500 g и 4 °C, ресуспендировали и очищали, осаждая в трех объемах 0.5 M сахарозы при тех же условиях. Сохранность и чистоту ядер контролировали под микроскопом. Выделение ядерной белковой фракции, содержащей транскрипционные факторы, проводили в течение 30 мин при температуре 4 °C в буфере, содержащем 400 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.9 , 25 % глицерина, 1.5 mM MgCl, 0.4 mM ЭДТА, 0.4 mM PMSF, 1 mM ДТТ и ингибиторы протеаз (Roche). Ядерный лизат получали применением буфера RIPA, содержащим 50 mM Tris-cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% дезоксихолата Na, 1 mM PMSF и ингибиторы протеаз (Roche). Остатки ядер осаждали центрифугированием (2500 g, 10 мин), супернатант использовали для анализа ядерных белков.

3.3. Определение состава ядерных белков фракции транскрипционных факторов методами SDS-электрофореза и иммуноблотинга

Белковые пробы растворяли в буфере Laemmli для проб и прогревали 7 мин при 98 °C [20]. Затем их разделяли в не градиентном (12 %) полиакриламидном геле, содержащем

SDS, в трис-глициновом буфере pH 8.3 при 100 В. Для визуализации белков использовали окрашивание полиакриламидного геля серебром и иммуноблотинг. При окрашивании геля серебром использовали Silver Staining Kit #K0681 (Fermentas, США). Для иммуноблотинга белки переносили на мембрану PVDF (Millipore, США) в трис-глициновом буфере, содержащем 10 % метанола, при помощи установки для переноса (BioRad, США). Затем мембрану трижды промывали в буфере PBST (PBS, содержащий 0.1 % Tween-20) и инкубировали 1 ч в 5 %-ном обезжиренном сухом молоке, растворенном в буфере PBST. После этого мембрану снова отмывали буфером PBST и инкубировали ночь с первичными антителами, разведенными в буфере PBST при 4 °С. Следующая трехкратная отмывка мембраны буфером PBST сопровождалась последующей инкубацией в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После шестикратной отмывки буфером PBST визуализировали связавшиеся антитела люминофором ECL с использованием субстратов люминола (1,25 мМ) и паракумаровой кислоты (0.2 мМ), 0.01-ной % перекиси водорода в 150 мМ трис-HCl pH 8.8. Хемилюминесценцию регистрировали с применением установки ChemiDoc XRS (BioRad, США).

3.4. Иммунофлуоресценция

Покровные стёкла покрывались поли-D-лизином в течение двух часов, после чего стёкла промывались дистиллированной водой. Выделенные ядра фиксировались в 4% формальдегиде в течение 10 мин, затем отмывались PBS и наносились на предварительно подготовленные покровные стёкла. Прикрепление ядер осуществлялось в течение 2 часов при комнатной температуре. В случае с клеточной культурой, осуществлялось расластывание клеток на стёклах, покрытых поли-D-лизином, в течение ночи в бессывороточной среде. Клетки фиксировались при помощи 4 % формальдегида в течение 10 минут и отмывались трёхкратно PBS. Дальнейшие этапы методики одинаковы для обоих случаев. Добавляли 2% BSA и инкубировали 30 мин, отмывали. Инкубацию с первыми антителами проводили в течение ночи при 4°C, а с антителами, содержащими флуорохром – 40 минут в темноте, после каждого раза инкубации ядра промывались PBS трижды. Окраску цитоскелета проводили 20% раствором родамин фаллоидина, окраску ядер проводили раствором DAPI 1 мкг/мл. Фиксацию препаратов осуществляли в заключающей среде Mounting Medium (Vector Laboratories). Препараты исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5.

Антитела	Производитель	Разведение антител при использовании в методах	
		Иммуноблоттинг	Иммунофлуоресценция
Поликлональные антитела к N-терминальному полипептиду	ImmunoGlobe, Германия	1:1000	1:100
Моноклональные мышинные антитела к рибонуклеопротеину A2/B1 (hnRNP A2/B1)	Santa Cruz, США	1:1000	-
Моноклональные мышинные антитела к β -актину	Sigma, США	1:1000	-
Антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена	Sigma, США	1:10 000	-
Антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с зелёным флуорохромом .	Life technologies, США	1:100	-

3.5. Подсчёт клеток и выделенных ядер в камере Горяева и статическая обработка данных.

Подсчитывалось исходное количество клеток, бравшееся в эксперимент. Далее проводилось сравнение, полученных величин и высчитывался средний выход ядер. В качестве контрольной группы подсчитывались ядра, выделенные при помощи традиционной методики. Количество клеток в 1 мл суспензии определяют с помощью камеры Горяева, представляющей собой толстое прямоугольное прозрачное стекло с двумя сетками, выгравированными на его поверхности, и с выемкой, к боковым пластинкам которой притирается покровное стекло. Для оценки количества клеток 10-15 мкл суспензии вносят в камеру и с помощью светового микроскопа подсчитывают количество клеток в нескольких квадратах и определяют среднее значение.

Расчет количества клеток в 1 мл суспензии производят по формуле:

$$\text{Количество клеток в 1 мл} = X \cdot 25 \cdot 10000,$$

где X – среднее количество клеток в одном квадрате, 25 - количество квадратов в 1 мм². Было проанализировано по три повторности в каждом из вариантов метода очистки ядер (в точности: стандартный метод, очистка через 1 М сахарозу и очистка через 1,7 М сахарозу), рассчитывался средний процентный выход и ошибка среднего (ссылка!!!).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Проверка общепринятого метода очистки выделенных ядер

Для достижения цели, поставленной в данной работе, первичной и наиболее важной задачей стало определение подходящего метода получения и очистки клеточных ядер. Основным критерием является возможность получения интактных ядер, которые не несут на своей мембране остатков цитоплазматических структур, в частности актинового и тубулинового цитоскелета. Традиционные методы, используемые в нашей лаборатории и наиболее часто встречающиеся в литературе, были подвергнуты проверке.

При подборе новых условий выделения клеточных ядер за основу был взят метод, описанный ранее (Бабаков и др., 2004). Основанный на применении механического очищения ядер после их выделения за счёт пропускания центрифугированием через 0,5 М раствор сахарозы. При помощи метода конфокальной микроскопии показано, что данная (общепринятая) методика выделения клеточных ядер не позволяет эффективно очистить их поверхность от остатков цитоскелетных структур (Рис.1) – на их поверхности выявляется кольцо актиновых филаментов. Таким образом, данный подход оказался неприемлемым для анализа содержания цитоскелетных белков в ядре. Поэтому следующим этапом данной работы стала разработка нового эффективного метода очистки клеточных ядер.

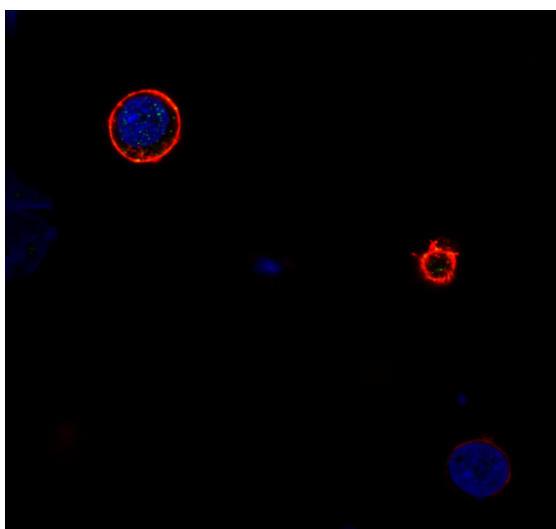


Рис.1. Поверхность клеточных ядер, выделенных при помощи стандартной методики, несёт остатки цитоскелетных структур.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия. Увеличение x40.

Детекция актиновых филаментов производилась родамин-фаллоидином, хроматин окрашен DAPI. Поверхность ядра, очищенная стандартным методом, окружена мощным актиновым кольцом, что подтверждает низкую эффективность очистки ядер в отношении цитоскелетных структур общепринятого метода.

4.2. Разработка новых условий очистки ядер от остатков структур актинового и тубулинового цитоскелета

Проверено влияние различной плотности раствора сахарозы, через которую пропускаются ядра на эффективность их очистки. Исследованы три значения плотности сахарозы: 0.5 М, 0.7 М, 1 М, при этом скорость и время осаждения составляли 2.5 тыс g в течение 5 мин. Контроль чистоты и сохранности ядер осуществлялся при помощи световой микроскопии. Осаждение фракций выделенных ядер через растворы сахарозы концентраций 0.5 М и 0.7 М не приводит к удалению цитоплазматических структур с ядерной поверхности (Рис.2). В случае прохождения ядер через 1 М раствор сахарозы поверхность свободна от остатков цитоскелетных структур (Рис. 2).

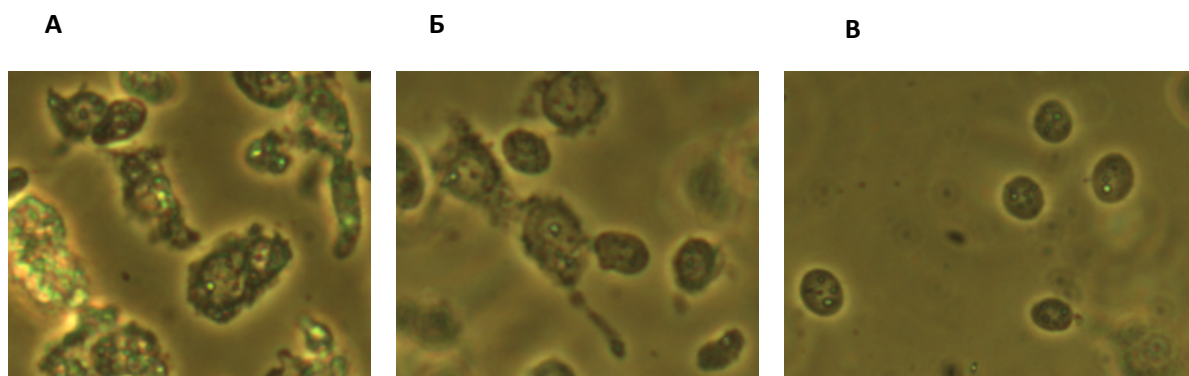


Рис.2. Выделенные ядра и подвергшиеся двукратной очистке через раствор сахарозы различной концентрации.

Световая микроскопия. Увеличение $\times 20$. **А.** Концентрация раствора сахарозы – 0,5 М. Поверхность ядер несёт достаточно большое количество остатков цитоплазматических структур. **Б.** Концентрация раствора сахарозы – 0,7 М. В этом случае остатки цитоплазматических структур остаются на поверхности ядер, но уже в меньшем количестве. **В.** Концентрация раствора сахарозы – 1 М. Поверхность ядер свободна от остатков структур цитоплазмы.

При возрастании плотности раствора сахарозы, через который пропускаются ядра, возрастают и потери – уменьшается количество получаемых ядер. Конечный выход ядер уменьшился в несколько раз при центрифугировании в растворе 1 М сахарозы по сравнению с 0,5 М (Рис.3). Для снижения таких потерь была увеличена скорость центрифугирования до 4,2 тыс g и времени до 10 мин. При таких условиях количество ядер, полученных после этапа очистки, было больше и соответствовало такому же числу, что и в случае применения стандартной методики выделения (Рис.3).

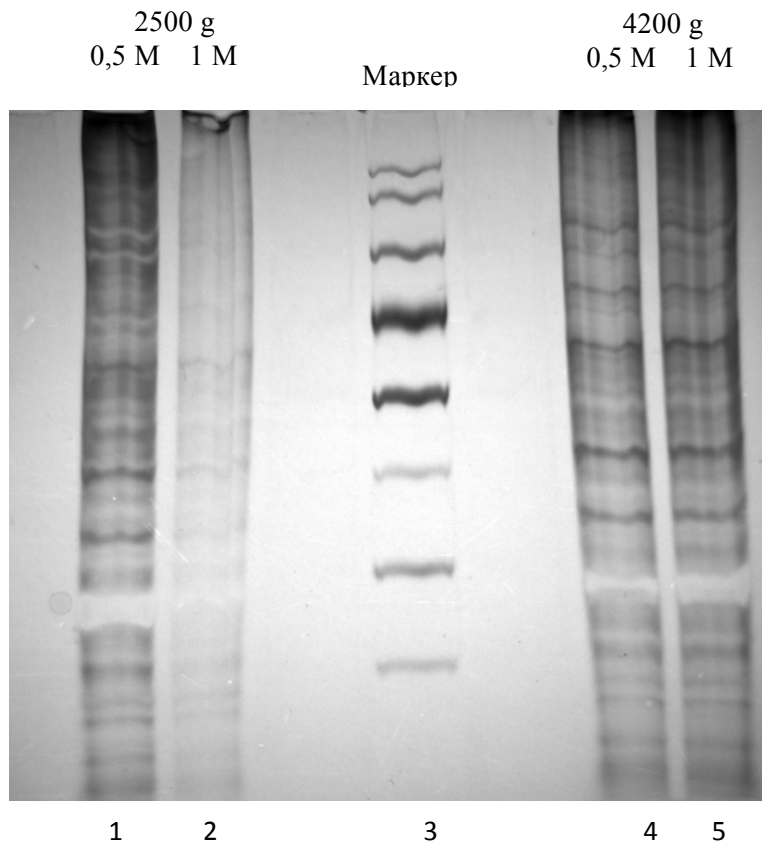


Рис.3. Сравнение количественных потерь ядер при их очистке через раствор сахарозы различных плотностей и при различных условиях центрифугирования.

Разделение фракции ядерных белков при помощи гель-электрофореза. Гель окрашен серебром. Количество белка, выделенного из ядер, осаждённых через раствор сахарозы с концентрацией 1 М при скорости центрифугирования 2500 г много меньше по сравнению с количеством белка полученного из клеточных ядер очищенных стандартным методом (дорожки 1 и 2). При увеличении же скорости центрифугирования (дорожки 4 и 5) количество белка оказывается большим и соответствует тому количеству белка, которое было экстрагировано из клеточных ядер, выделенных при помощи стандартного метода.

При анализе очищенных подобным образом ядер видно большое количество не фокусируемых отдельных от ядер структур, которые, предположительно, являются остатками цитоскелета (Рис. 4Б), что подтверждается выявлением значительного количества бета-актина во фракции ядерных белков методом иммуноблотинга (Рис. 4В). Таким образом, однократное пропускание выделенных ядер через раствор 1 М сахарозы при скорости 4.2 тыс. г приводит к тому, что помимо ядер во фракции обнаруживаются остатки цитоскелета. Для избежания контаминации цитоскелетными белками и уменьшения потерь ядер применяли двукратную очистку: осаждение в 0.7 М растворе

сахарозы при скорости центрифугирования 2.5 тыс. g в течение 5 минут, и затем собранный осадок был повторно осажден в 1 М растворе сахарозы, но при скорости 4.2 тыс. g в течение 10 минут. Однако конечный выход клеточных ядер был слишком мал - около 17 % от начального количества клеток (таб. 1.).

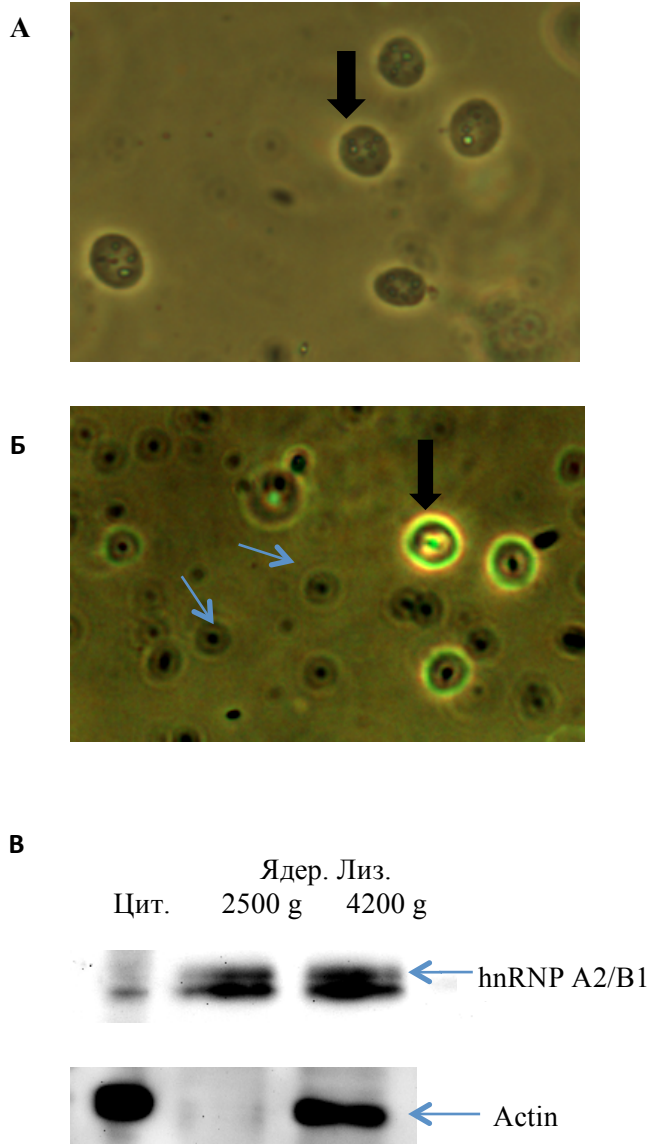


Рис.4. Фракция цитоплазматических структур загрязняет ядра при осаждении их через раствор 1 М сахарозы при скорости центрифугирования 4200g.

А-Б. Визуализация ядер при помощи световой микроскопии. Увеличение x20.

А. Ядра очищенные в растворе 1 М сахарозы при скорости центрифугирования 2500g

Б. Ядра, очищенные в растворе 1 М сахарозы при скорости центрифугирования 4200g в течение 20 минут.

(Черная стрелка указывает на ядро, маленькие стрелки – предполагаемые остатки цитоплазматических структур).

В. Иммуноблоттинг белков, полученных из клеточных ядер и цитоплазмы при разных условиях очистки:

Цит. – цитоплазматический лизат.

Ядер.Лиз. – ядерные лизаты, полученные из ядер, очищенных в растворе 1 М сахарозы при скорости центрифугирования 2500g и 4200g соответственно в течение 10 минут.

При проверке чистоты поверхности ядер при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии с окраской на актиновый цитоскелет обнаружены небольшие остатки цитоплазматического актина на поверхности ядер (Рис.5А). Таким образом, данные условия очистки не приводят к достаточно эффективному удалению цитоскелетных структур с поверхности ядер. Другим недостатком данного методического подхода являются значительные потери ядер при очистке.

Доработка метода велась по пути ужесточения механической очистки – увеличения плотности сахарозы и скорости центрифугирования. Установлено, что для эффективного удаления остатков цитоскелетных структур необходимо выделенные ядра осадить через раствор 0,5 М сахарозы, что позволит устранить растворённые остатки цитоскелета. Затем полученный осадок ядер при 30 000 g в течение 2 часов пропускается через градиентный раствор сахарозы высокой плотности – в пробирке поверх 0,5 мл раствора 1,7 М сахарозы наслаивается 5 мл суспензии 1,5 М сахарозы с выделенными ядрами. Контроль чистоты поверхности ядер осуществлялся при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии с антителами против ламина-Б, актина и β -тубулина. Анализ показал, что вокруг изолированного ядра отсутствуют как актиновые филаменты, так и микротрубочки (Рис. 5Б), при этом целостность ядра сохраняется (Рис. 6).

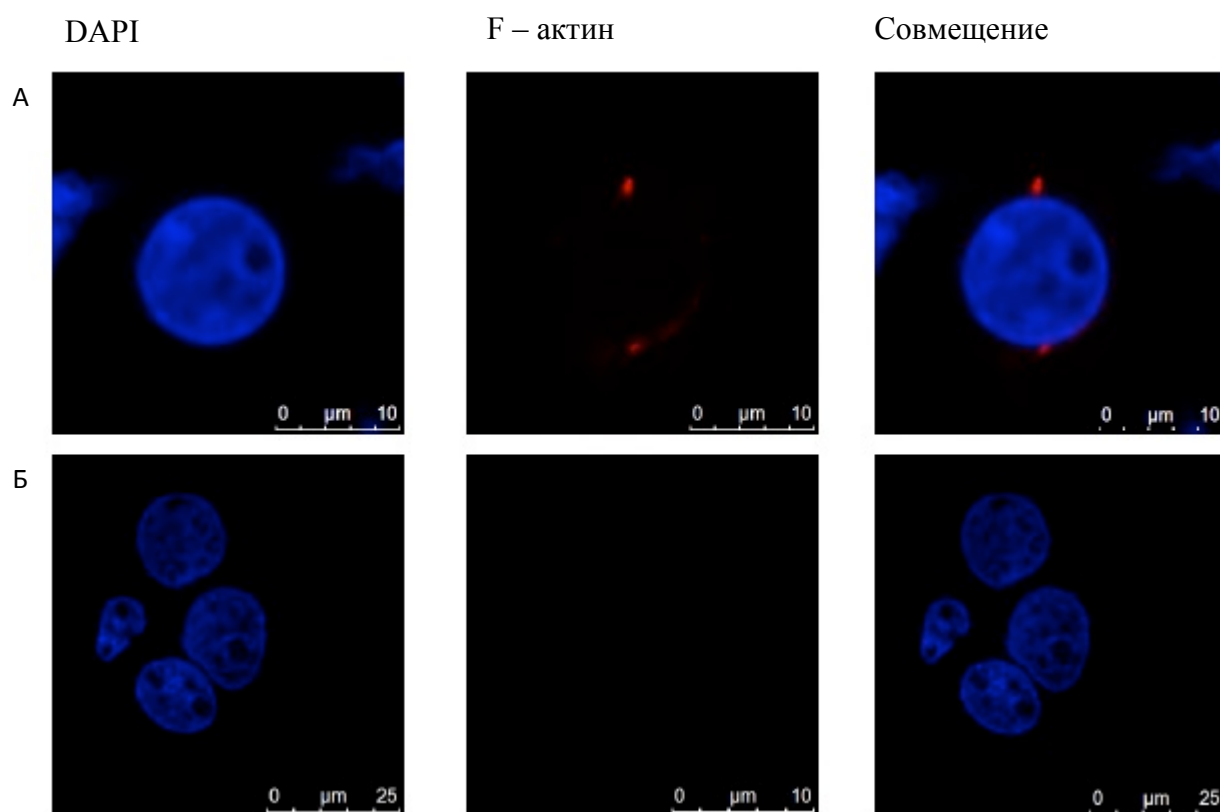


Рис.5. Демонстрация эффективности подобранных методов очистки ядер.
Визуализация ядер при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии.
Увеличение x40

А. Ядра, очищенные при помощи метода Pure. **Б.** Ядра, очищенные при помощи метода UltraPure.

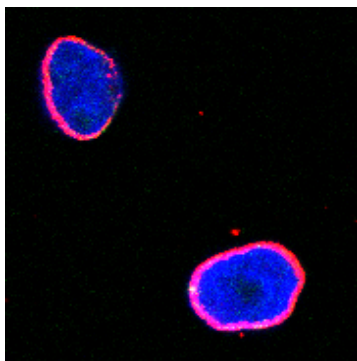


Рис.6. Ядра, очищенные при помощи разработанного метода UltraPure сохраняют целостность.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия. Увеличение x40. Синий – ядра, окраска DAPI, красный - ламин-Б.

Потери ядер при таком способе очистки минимальны (Таб.1.). Таким образом, подобранный метод подходит для дальнейшего изучения локализации тубулина в ядре.

Клеточная линия	Метод	Среднее кол-во клеток/мл (10^6)	Среднее кол-во ядер/мл (10^6)	Средний % выход
A431, эпидермоидная карцинома человека	Standart	6,7 ($\pm 0,28$)	2,8 ($\pm 0,16$)	47,9 ($\pm 4,61$)
	Pure	7,2 ($\pm 0,23$)	1,2 ($\pm 0,095$)	16,7 ($\pm 1,09$)
	UltraPure	6,8 ($\pm 0,32$)	2,24 ($\pm 0,34$)	33 ($\pm 6,92$)

Таблица.1. Конечный выход ядер, после их очистки различными методами. Подсчёт проводился при помощи камеры Горяева (гемоцитометра). Было подсчитано исходное количество клеток, бравшееся в эксперимент и количества ядер после очистки. Далее проводилось сравнение, полученных величин и высчитывался средний выход ядер. В скобках представлено значение ошибки средней.

4.3. Анализ ядерной локализации тубулина в клеточной линии A431

Выявление ядерного тубулина осуществлялось в ядрах клеток линии A431 при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии. Анализ ядерной локализации тубулина был проведен на выделенных ядрах при помощи метода конфокальной микроскопии с антителами против α - и β_{II} -тубулина. Обнаружено, что β_{II} -тубулин имеет ядерную локализацию (Рис. 7А). В то же время альфа-тубулин в ядре не обнаружен (Рис. 7Б). Стоит отметить, что β_{II} -тубулин распределён в ядре не равномерно.

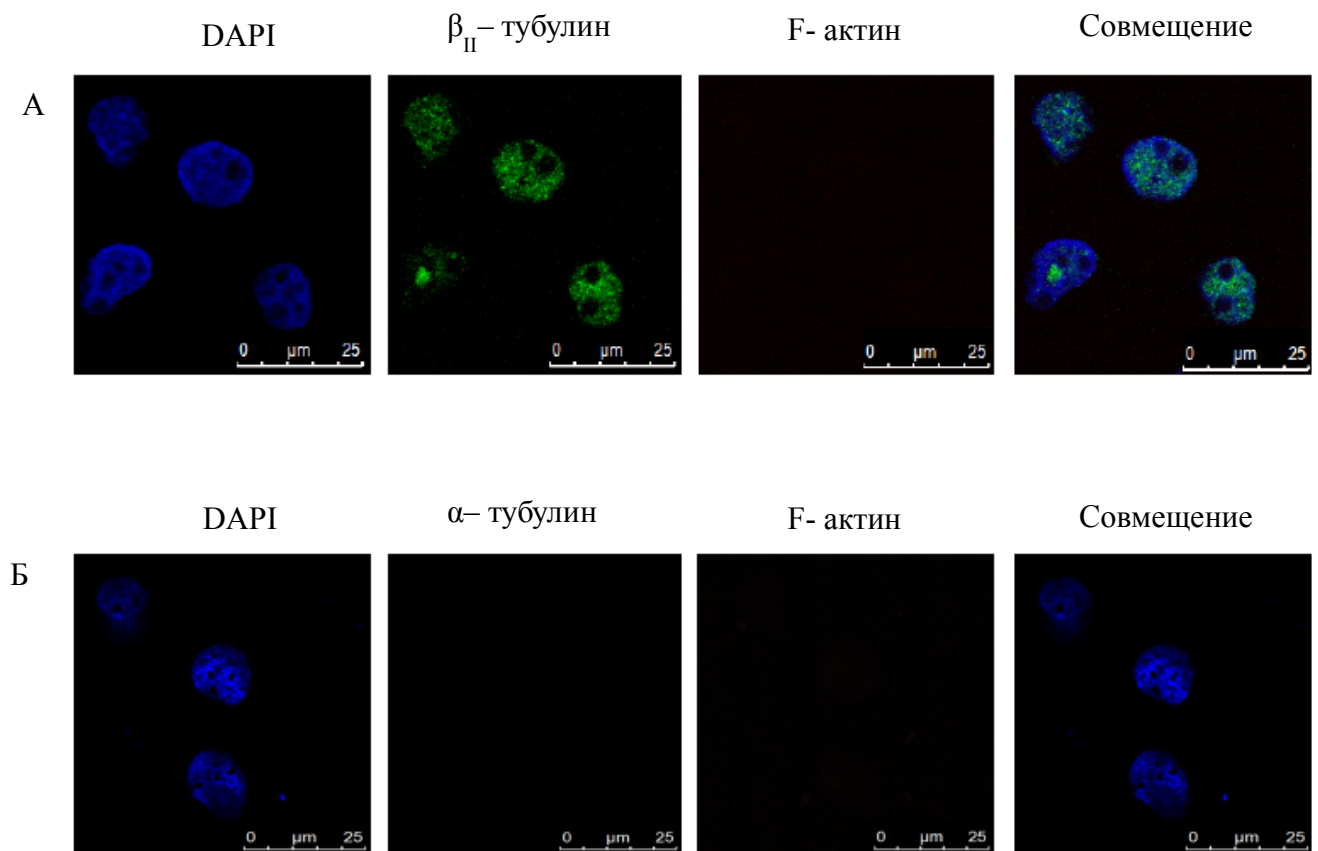


Рис.7. Выявление β_{II} тубулина в ядре.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия. Увеличение $\times 40$. Детекция тубулина осуществлялась при помощи антител специфичных к бета $_{II}$ – тубулину (А) и альфа – тубулину (В).

4.4. Анализ солокализации р65 субъединицы транскрипционного фактора NF- κ B и тубулина в клетках линии A431

Был проведён анализ солокализации транскрипционного фактора NF-κB и тубулина в клетках A431. Выявлено, что нет строгой со-локализации α-тубулина и p65субъединицы NF-κB в цитоплазме (Рис.8А). Антитела против α-тубулина специфично окрашивают микротрубочки цитоплазмы, и при этом не выявляют белок в ядре, что согласуется с предыдущими полученными данными. При изучении солокализации p65 и βII-тубулина обнаружено, что есть области преимущественной локализации p65 или тубулина, но так же и зоны их солокализации (Рис. 8Б). В отличие от α-тубулина βII-тубулин в клетке имеет только ядерную локализацию.

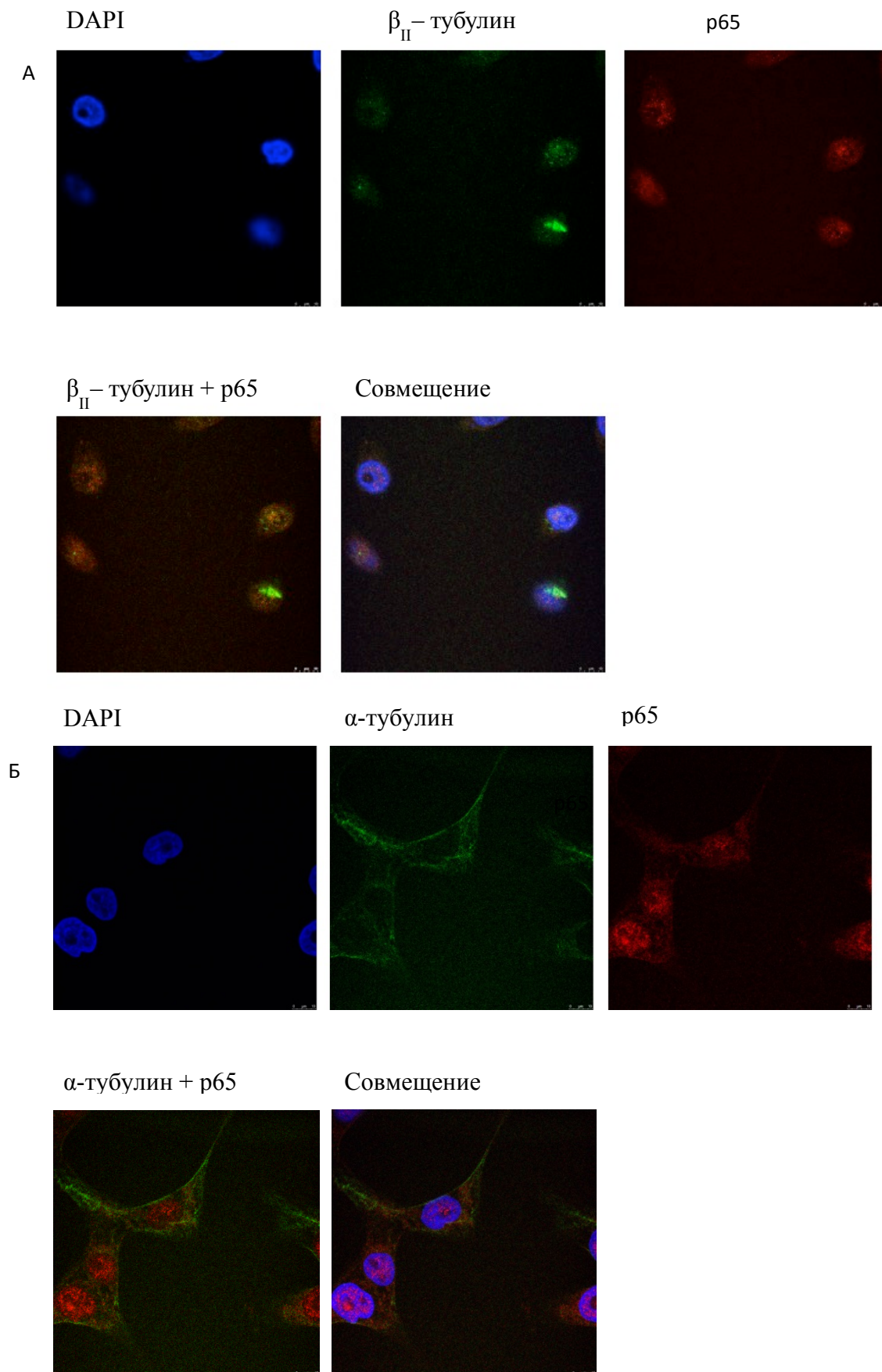


Рис.8. Анализ со-локализации транскрипционного фактора NF- κ B и тубулина в клетках линии A431. Конфокальная флуоресцентная микроскопия. Увеличение $\times 100$.

А. Детекция тубулина осуществлялась при помощи антител специфичных к β_{II} – тубулину.

Б. Детекция тубулина осуществлялась при помощи антител специфичных к α -тубулину.

Для выявления NF- κ B использовались антитела специфичные к p65.

4.5. Анализ ядерных белков фракции транскрипционных факторов

Проверено взаимодействие β -тубулина с белковыми комплексами р65 субъединицы NF- κ B во фракции транскрипционных факторов, экстрагируемых из ядер клеток линии A431. Однако при анализе этих экстрактов белков, при помощи метода иммуноблоттинга не было обнаружено ни α - ни β -тубулина (Рис. 9), Вероятно это связано с тем, что тубулин не экстрагируется во фракции транскрипционных факторов и более тесно связан с хроматином.

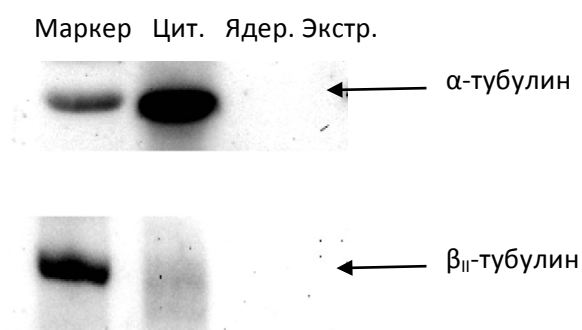


Рис.9. Отсутствие изотипов тубулина в ядерной фракции транскрипционных факторов.

Иммуноблоттинг белков, полученных из ядер и цитоплазмы.

Цит. – цитоплазматический лизат. Ядер.Экстр.– ядерные экстракты, полученные белки относятся к фракции транскрипционных

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Указания на роль цитоскелета в передаче информации в клетке начали накапливаться с 1980-х гг. Согласно существующим в настоящее время представлениям, цитоскелет играет важнейшую роль в проведении внутриклеточного сигнала и в регуляции экспрессии генов (Ingber D.E. 2002.; Schmidt A. and Hall M.H., 1998.). Эти представления сформировались главным образом на основе экспериментов, показавших, что разрушение структур цитоскелета специфическими токсинами приводит к отмене или модификации поступающего с поверхности клетки сигнала (Puck T.T., 1977.).

На данный момент достаточно много выяснено о роли системы микрофиламентов в процессах внутриклеточной сигнализации. Актин-связывающие белки обеспечивают связь между актиновыми структурами и мембранными рецепторами при взаимодействии последних с белками внеклеточного матрикса, ростовыми факторами и другими биологически активными веществами. Помимо этого они могут служить матрицей для сборки сигнальных молекул и взаимодействовать с рядом транскрипционных факторов. А также осуществлять непосредственный перенос связанных с ними сигнальных молекул в ядро (Комалетдинова Ф.М. и Пинаев Г.П., 2006.).

Поскольку в ядре реализуется генетическая информация, можно предположить, что функцией белков цитоскелета в ядре является контроль экспрессии генов и, возможно, координация ядерных и цитоплазматических процессов. Ядерный актин вовлечен в работу белковых комплексов, регулирующих процессы транскрипции, процессинга, сплайсинга и транспорте мРНК, ремоделирование хроматина и его перемещение. С другой стороны, известно о присутствии актина на внутренней стороне ядерной оболочки. Предполагают, что этот актин-содержащий комплекс белков стабилизирует ядерную оболочку. Известно, что мономеры актина могут выполнять сигнальную функцию в клетке: пул G-актина вовлечен в экспрессию большого количества цитоскелетных белков через регуляцию активности транскрипционного фактора SRF (Sauman and Berry, 1994., Szerlong et al. 2008., Goldstein et al., 1977a., Zhang et al., 1996., Gettemans J., 2005.).

В числе актин-связывающих белков, которые также были обнаружены в ядре, есть и α -актинин-4. Ранее в нашей лаборатории при исследовании ядерных белковых комплексов клеточной линии A431, содержащих α -актинин-4, при помощи методов tandem mass spectrometry и иммунопреципитации было показано, что с ним ассоциировано, по крайней мере, около 50 различных белков, среди которых α - и β -тубулины (Хотин М.Г., 2010.). Можно предположить, что тубулин и α -актинин-4, белки, которые являются важнейшими компонентами двух различных систем цитоскелета, таких как

микротрубочки и актиновая сеть, вовлечены в одни процессы и, как следствие, выполняют сходные функции.

Несмотря на то, что пул молекул димера α/β тубулина считается резервуаром субъединиц необходимых для полимеризации микротрубочек в цитоплазме, существуют несколько сообщений, поддерживающие наличие тубулина в ядре культивируемых клеток животных и даже в клетках растений (Walss, Kreisberg, & Ludueña, 1999; Walss-Bass, Kreisberg, & Ludueña, 2001; Xu & Ludueña, 2002; Schwarzerová K., 2006.). Отмечалось, что ядерный тубулин ассоциирован с хроматином (Menko, A.S. and Tan, K.B., 1980.) и взаимодействует *in vitro* с коровыми и линкерными гистонами, он способен формировать стабильные связи с гистонами H1-H4 (Mithieux, G et al., 1984).

В рамках данной работы важно избежать контаминации полученных ядер цитоплазматическими белками, и при этом сохранить нативную структуру ядра. К тому же, полученные ядра должны быть приемлемы для дальнейшего исследования их белковых комплексов при помощи методов биохимии. Тубулин является цитоплазматическим белком, таким образом, если не проделать данную работу и по возможности не предотвратить наличие цитоплазматических структур в исследуемых ядрах и в пробах ядерных белковых комплексов, то полученные данные могут быть интерпретированы не верно, что приведёт к ошибочным выводам об истинной локализации и выполняемых функциях исследуемого белка в ядре.

Первично выбранный метод выделения и очистки ядер, основанный на применении центрифугирования через 0,5 М раствор сахарозы, не приводит к удалению остатков цитоскелетных структур с поверхности ядра. В связи с этим для достижения цели, поставленной в данной работе, первичной и наиболее важной задачей стало определение подходящего метода очистки выделяемых ядер. Возможно два пути модификации метода очистки изолированных ядер: использование детергентов или применение механических способов удаления остатков цитоскелета. Применение детергентов бесспорно упрощает работу, однако использование подобных веществ может привести к нарушению белок-белковых взаимодействий, что делает невозможным исследование белковых комплексов. В то время как механическое воздействие не оказывает существенного влияния на структуру белковых комплексов. Таким образом, было принято решение сделать выбор именно в пользу данного варианта. Выбор сахарозы не случаен, так как сахароза характеризуется наибольшей инертностью по сравнению другими веществами применяемых для данных целей.

При отработке метода важно найти баланс между концентрацией сахаразы и скоростью центрифугирования, для того чтобы получить максимально очищенные ядра не

нарушив их целостность и при этом свести потери ядер к минимуму. Как было показано в данной работе, всё осложняется тем, что в растворе после лизиса клеток помимо ядер также обнаруживаются растворённые остатки цитоскелетных структур, не связанные с самим ядром, и при высоких скоростях центрифугирования они оседают вместе с ядрами. Что опять же в свою очередь приводит к загрязнению фракции выделяемых ядерных белков для последующих этапов исследования. Подобранные условия двухэтапной очистки ядер: осаждение выделенных ядер через раствор 0,7 М сахарозы при ускорении центрифуги 2500g и с последующим центрифугированием в градиентном растворе сахарозы с конечной концентрацией 1,7 М при ускорении 30 000g позволяет соблюсти все поставленные требования. Так же данная методика позволяет получать очищенные ядра не только для исследования внутриядерного распределения белков интереса при помощи методов конфокальной микроскопии, которая позволяет получать изображения «оптического среза» с высоким значением контрастности (Штейн Г.И., 2007), но и при помощи флуоресцентной микроскопии. В отличие от конфокальной микроскопии изображение, получаемое с использованием флуоресцентного микроскопа, отображает весь объект целиком (Abramowitz M., 2003), что может вызвать сложности в анализе принадлежности целевого белка к какому-то из компартментов клетки, в том случае если на поверхность ядра загрязнена цитоплазматическими остатками.

Анализ ядерной локализации проводился на клетках линии A431. Выбор этой клеточной линии обусловлен тем, что предыдущие исследования состава белковых комплексов α -актинина-4 проводились именно на ней, кроме того, до этого изучение ядерной локализации тубулина в этой линии не осуществлялось. Ранние исследования показали, что тубулин присутствует в интерфазных клетках не только в цитоплазме, но и ядре. Главным образом, тубулин обнаруживается в ядрах линий раковых и трансформированных клеток (Walss-Bass, Kreisberg and Ludueña, 2001; Xu & Ludueña, 2002), а также в клетках раковых опухолей (Yeh I.-T. and Ludueña, 2004). Однако среди клеток, в которых был обнаружен тубулин есть нормальные клетки – клетки яичника китайского хомячка (Armbruster et al., 1983) и клетки мезангия почки (Walss, Kreisberg, & Ludueña, 1999.) В связи с тем, что ядерный тубулин обнаруживается в основном в клетках раковых опухолей различного происхождения, то этот факт может быть использован в будущем для диагностики, в которой ядерный тубулин может служить маркером перерождающихся тканей, так как тубулин в ядре обнаруживается и в тканях прилежащих к опухоли. При помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии в ходе работы был выявлено, что β -тубулин преимущественно имеет ядерную локализацию, в то время как в цитоплазме его не обнаружено. Эти данные согласуются с более ранними

исследованиями, в которых была изучена ядерная локализация различных изоформ тубулина, и было показано, что мажорной формой тубулина в ядре является β -тубулин (Xu and Ludueña, 2002). Напротив, в составе ядра не был выявлен α -тубулин, тем временем, как в цитоплазме он входит в состав микротрубочек. Однако нельзя с уверенностью утверждать о том, что α -тубулина нет в ядре. Есть данные, в которых показано, что альфа тубулин также присутствует в ядре, его выявили благодаря колхицин-связывающей активности тубулина (Walss, Kreisberg and Ludueña, 1999b), что также свидетельствует о том, что тубулин в ядре так же как и в цитоплазме находится в виде гетеродимера. Причина по которой α -тубулин не выявляется в ядре, по всей видимости, связана с тем, что эпитом, к которому специфично выработаны антитела, не доступен для их взаимодействия с последующим связыванием. Стоит отметить, что β -тубулин в ядре распределён не равномерно, а имеет преимущественные зоны локализации, которые совпадают с распределением хроматина. В свою очередь, это может косвенно указывать на то, что тубулин связан с хроматином, а так же на те функции, которые он мог бы выполнять. Например, участвовать в организации хроматина на стадии интерфазы клеточного цикла или же в регуляции транскрипции тех или иных генов. Особенностью представленной работы также является то, что анализ локализация молекул тубулина проводился на выделенных ядрах, а не на клетках. Подобная методика позволяет исключить ложно-положительный сигнал от цитоплазматического тубулина, и более точно определить к какому из компартментов принадлежит анализируемый белок.

Транскрипционный фактор NF- κ B – универсальный фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла (Grilli M., 1993). Известно, что при разрушении микротрубочечного цитоскелета происходит перераспределение NF- κ B в ядро и активация транскрипции NF- κ B – зависимых генов (Rosette and Karin, 1995). Так же обнаружено, что α -актинин-4 является ко-активатором RelA/p65 субъединицы транскрипционного фактора NF- κ B (Aksenova et al., 2013). Поэтому было проанализировано распределение p65 и тубулина в клетках линии A431 при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии. Анализ не выявил чёткой локализации p65 и тубулина в цитоплазме. Однако, в ядре есть области совместной их локализации, что так же может косвенно указывать на вовлечение тубулина в регуляцию экспрессии генов. Вместе с тем, при анализе белков фракции транскрипционных факторов при помощи метода иммуноблотинга ни α - ни β -тубулин выявлены не были. Это может связано с тем, что условия, при которых экстрагируется фракция транскрипционных факторов, не подходят для выделения молекул тубулина из ядра, поэтому они требуют дальнейшего уточнения и корректировки. Таким образом, совокупность полученных

данных может свидетельствовать о тесной связи тубулина с хроматином в интерфазном ядре.

Не смотря на все исследования проливающие свет на участие цитоскелетных белков в регуляции экспрессии генов в составе ядерных белковых комплексов, вопрос о транспорте их в ядро всё ещё остаётся открытым. В этом отношении тубулин не является исключением, пока нет прямых данных объясняющих механизмы его транспорта в ядро. Однако существует несколько гипотез, позволяющих приблизиться к пониманию, как это могло бы происходить. Анализ аминокислотных последовательностей α/β -тубулина не показал наличия сигнальной последовательности, отвечающей за перемещения тубулина в ядро (Walss et al., 1999b). Вполне возможно, что во время митоза происходит связывание β -тубулин с хроматином и он оказывается таким образом пойманным в ловушку на протяжении всей интерфазы. В этом случае тубулин как бы сохраняется в ядре на протяжении всей интерфазы для того, чтобы во время митоза быть готовым для выполнения каких-либо регуляторных функций (Xu and Luduena, 2002.). Данное предположение подкрепляется тем фактом, что существуют белки, активность которых регулируется подобным образом, это такие белки, как митозин, NuMA и p62 (Zhu et al., 1997; Saredi et al., 1996; Warner and Sloboda, 1999.). Однако эту гипотеза ещё подлежит проверке в будущем. Но всё же учитывая тот факт, что ядерный тубулин, главным образом, обнаруживается именно в раковых и трансформированных клетках, то можно предположить что он участвует в быстрой клеточной пролиферации (Walss-Bass C. et al, 2002.). Кроме того, тубулин может перемещаться в ядро и в составе комплексов других белков, например белок, ингибирующий сборку микротрубочек (microtubule assembly inhibitor protein – MIP), который связывается с тубулином *in vitro* и как сообщается так же имеет ядерную локализацию (Kotani et al., 1988.), может выступать в качестве носителя при транспорте тубулина в ядро (Walss-Bass et al., 1999b.). Так же нельзя исключить возможности, которая предполагает, что транслокация тубулина в ядро осуществляется также и за счёт активного транспорта. Существуют данные, которые демонстрируют, что при обработке клеток лептомицином В, агентом блокирующим экспорт белков из ядра, происходит накопление тубулина в ядре (Akoumianaki et al, 2009.).

ВЫВОДЫ

1. Стандартная (общепринятая) методика не подходит для анализа ядерной локализации цитоскелетных белков – поверхность ядер остаётся контаминированной остатками цитоскелета.
2. Новый разработанный метод очистки ядер позволяет получить ядра свободные от остатков цитоскелетных структур.
3. β_{II} изотип тубулина преимущественно имеет ядерную локализацию в отличие от α -тубулина, который в ядре не выявляется.
4. Тубулин не равномерно распределён в ядре, вероятно это связано с его участием в процессах, локализованных в этих областях.
5. Тубулин не выявляется в составе ядерных белковых комплексов фракции транскрипционных факторов, что указывает на возможно его тесную связь с хроматином

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramowitz, M. // *Miroscope (Basics and Beyond)*. Fellow, N. Y. M. S. - 2003., - V.1
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. // *Molecular Biology of the cell*. – 2008. – Fifth ed.
3. Alexandraki D, Ruderman JV. // Evolution of α - and β - tubulin genes as inferred by the nucleotide sequences of sea urchin cDNA clones. *J.Mol.Evol.* – 1983. – V.19. – P.397–410.
4. Akoumianaki T., Kardassis D., Polioudaki H., Georgatos S.D. and Theodoropoulos P. // Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. *Journal of cell science*. – 2009. – V. 122. – P. 1111–1118.
5. Armbruster B.L., Wunderli H., Turner B.M., Raska I., Kellenberger E. // Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and histone 2B in isolated membrane-depleted nuclei, metaphase chromatin, and whole Chinese hamster ovary cells. *J Histochem Cytochem*. – 1983. – V. 31. – P. 1385–1393.
6. Amos, L. A. // *Seminars in Cell & Developmental Biology* What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Sem. in Cell & Dev. Biol.* - 2011. – V.22, № 9. – P.916–926.

7. Andersen J.S., Lyon C.E., Fox A.H. et al. // Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* – 2002. – V. 12, № 1. – P. 1–11.
8. Asscher Y. and Barnea E., Improved Methods for Nuclear Extract Preparation and Functional Nuclei Isolation, Sigma poster.
9. Bernocco S., Fondelli C., Matteoni S., Magnoni L. et al. // Sequential detergent fractionation of primary neurons for proteomics studies. *Proteomics.* – 2008. – V. 8. – P. 930–938.
10. Borisy, G. G., & Taylor, E. W. // The mechanism of action of colchicine: Binding of Colchicine - ^3H to Cellular Protein. – 1967. – V.34. – P.525–533.
11. Clark, T. G., and Merriam, R. W. // Diffusible and bound actin nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell.* – 1977. - № 12. - P.883–891.
12. Clark, T. G., and Rosenbaum, J. L. // An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell.* – 1979. - № 18. – P. 1101–1108.
13. Cooper G.M.. // *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Tools of Cell Biology. – 2000.
14. Cormier A, Knossow M, Wang C, Gigant B. // The binding of vinca domain agents to tubulin: structural and biochemical studies. *Methods Cell Biol.* – 2010. – V.95. – P.373–390.
15. Daelemans D., Costes S.V, Lockett S., Pavlakis G.N. // Kinetic and Molecular Analysis of Nuclear Export Factor CRM1 Association with Its Cargo In Vivo Kinetic and Molecular Analysis of Nuclear Export Factor CRM1 Association with Its Cargo In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* – 2005. - .V. 25, № 2. – P. 728-739.
16. De Araujo M. E., Huber L. A., Stasyk T. // Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation. *Methods Mol. Biol.* – 2008. – V. 424. – P. 317–331.
17. De Duve C. and Beaufay H. // A short history of tissue fractionation. *J. Cell Biol.* – 1981. – V. 91. – P. 293-299.
18. De Robertis, E. M., Longthorne, R. F., and Gurdon, J. B. // Intracellular migration of nuclear proteins in *Xenopus* oocytes. *Nature.* – 1978. – V. 272. – P. 254–256.
19. Donald, E. F., & Morejohn, L. C. // Structural and functional organization of tubulin. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* - 1992. – V. 43. – P.201–240.
20. Douvas, A. S., Harrington, C. A., and Bonner, J. // Major nonhistone proteins of rat liver chromatin: Preliminary identification of myosin, actin, tubulin, and tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. – V. 72. – P. 3902–3906.
21. Dreger M. // Subcellular proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* – 2003. – V. 22. – P. 27–56.

22. Drewes, G., Ebner, A., & Mandelkow, E. M. // MAPs, MARKs and microtubule dynamics. Trends in Biochem.Sci. - 1998. – V.23., № 8. – P.307–11.
23. Edvardsen RB, Flaatt M, Tewari R, et al. // Most intron positions in *Oikopleura dioica* α -tubulin genes are unique: did new introns help to preserve and expand gene families. NCBI Accession no. AAM73988, AAM73989, AAM73990. – 2002.
24. Egly, J. M., Miyamoto, N. G., Moncollin, V., and Chambon, P. (1984). Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? EMBO J. – 1984. – V. 3. – P. 2363–2371.
25. Farrell Jr. R.E. // Analysis of Nuclear RNA, in RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization, - 1998. – P. 406-437.
26. Feit, H., Slusarek, L., & Shelanski, M. L. // Heterogeneity of Tubulin Subunits. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. - 1971. – V.68., № 9. – P.2028–2031.
27. Fletcher D.A. and Mullins R. D. // Cell mechanics and the cytoskeleton. Nat. – 2010 – V. 463, № 7280. – P.485–92.
28. Fulton C, Simpson PA. // Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multi-tubulin hypothesis. In: Goldman R, Pollard T, Rosenbaum J, eds. Cell Motility. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1976. - V.3. – P.987–1005.
29. Gettemans J., Van Impe K., Delanote V., Hubert T., Vandekerckhove J., De Corte V. // Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription. Traffic. – 2005. – V.6, №10. – P.847-57.
30. Gianguzza F, Di Bernardo MG, Sollazzo M, et al. // DNA sequence and pattern of expression of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) α -tubulin genes. Mol.Reprod.Dev. – 1989. – V.1. – P.170–181.
31. Goldstein, L., Ko, C., and Errick, J. // Nuclear actin: An apparent association with condensed chromatin. Cell Biol. Int. Rep. – 1977a. – V. 1. – P. 511–515.
32. Goo Y.H., Sohn Y.C., Kim D.H., Kim S.W., Kang M.J., Jung D.J., Kwak E., Barlev N. A., Berger S.L., Chow V.T. et al. // Activating signal cointegrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins. Mol. Cell. Biol. – 2003. – V. 23. – P. 140-149.
33. Gounon, P., and Karsenti, E. // Involvement of contractile proteins in the changes in consistency of oocyte nucleoplasm of the newt *Pleurodeles waltlii*. J. Cell Biol. – 1981. – V. 88. – P. 410–421.
34. Graham J. M., Ford T., Rickwood D. // Isolation of the major subcellular organelles from mouse liver using Nycodenz gradients without the use of an ultracentrifuge. Anal. Biochem. – 1990. – V. 187. – P. 318–323.

35. Graham J.M. and Rickwood D. // Subcellular Fractionation: A Practical Approach, IRL Press, Oxford. – 1997.
36. Greenberg M.E. and Bender T.P. // Identification of Newly Transcribed RNA, in Current Protocols in Molecular Biology. – 1997. – V. 4, №10. – P. 1-11.
37. Hofmann, W. // Cell and molecular biology of nuclear actin. International review of cell and molecular biology. - 1st ed., V. 273. – P. 219–263.
38. Höög G, Zarrizi R, K. von Stedingk et al. // Nuclear localization of γ -tubulin affects E2F transcriptional activity and S-phase progression. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2011. - № 25. – P.3815-3827
39. Hyams, J.S. and Lloyd C.W., eds. // Microtubules. Wiley-Liss, New York. – 1994.
40. Ingber D. E. // Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. Circ. Res. - 2002. - № 91. – P.877—887.
41. Jordan, M A., Wilson, L. // Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat. Rev. Cancer. – 2004. – V.4. – P. 253-65.
42. Jockusch, B. M., Brown, D. F., and Rusch, H. P. // Synthesis and some properties of an actin-like nuclear protein in the slime mold *Physarum polycephalum*. J. Bacteriol. – 1971. – V. 108. – P.705–714.
43. Jockusch, B. M., Becker, M., Hindennach, I., and Jockusch, E. // Slime mould actin: Homology to vertebrate actin and presence in the nucleus. Exp. Cell Res. – 1974. - № 89. – P. 241–246.
44. Khotin M, Turoverova L, Aksenova V, Barlev N, Borutinskaite VV, Vener A, Bajenova O, Magnusson K-E, Pinaev GP and Tentler D. Proteomic analysis of ACTN4-interacting proteins reveals it's a putative involvement in mRNA metabolism. BBRC. – 2010. – V. 397. – P. 192-196.
45. Kihlmark M. and Hallberg E. // Preparation of Nuclei and Nuclear Envelopes, in Cell Biology: A Laboratory Handbook. – 1998. - V. 2. – P. 152-158.
46. Kotani S, Ikai A, Kawai G, Maekawa S, Yokoyama S, Sakai H. // Microtubule - assembly inhibitor protein: Distribution, localization and physicochemical properties. Eur J Biochem. – 1988. - №176. - P.573– 580.
47. Krauhs E, Little M, Kempf T, Hofer-Warbinek R, Ade W, Ponstingl H. // Complete amino acid sequence of β -tubulin from porcine brain. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 1981. – V.78, - P.4156–4160.

48. Kudo N, Matsumori N, Taoka H, et al. // Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* – 1999. - V. 96, № 16, - P. 9112–9117.
49. Kutay U, Güttinger S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol.* – 2005. – V. 15, № 3. – P. 121-124.
50. Laemmli U.K. // Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680 – 685.
51. Ledbetter, M.C., and K.R Porter. // A "Microtubule" in plant cell fine structure. *J.Cell. Biol.* – 1963. – V.10., № 1. – P. 239-250.
52. Lestourgeon, W. M., Forer, A., Yang, Y. Z., Bertram, J. S., and Pusch, H. P. // Contractile proteins. Major components of nuclear and chromosome non-histone proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – V. 379. – P. 529–552.
53. Luduena, R. F. // Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* - 1998. – V.178. - P.207-275.
54. Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. // Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cur.Opin.Cell.Biol.* – 1995. – V.7., № 1. - P.72–81.
55. Marzluff W.F. and Huang R.C.C. // Transcription of RNA in Isolated Nuclei, in *Transcription and Translation: A Practical Approach.* – 1984. – P. 89-129.
56. Mckean, P. G., Vaughan, S., & Gull, K. // The extended tubulin superfamily. *J.Cell.Sci.* - 2001. – V.114. – P.2723-2733.
57. Menko A.S. and Tan K.B. // Nuclear tubulin of tissue cultured cells. *Biochim Biophys Acta.* – 1980. – V. 629. – P. 359–370.
58. Mithieux, G., Alquier, C., Roux, B. and Rousset, B. // Interaction of tubulin with chromatin proteins: H1 and core histones. *J. Biol. Chem.* - 1984., - № 259., - P.15523-15531.
59. Mohri, H. // Amino-acid Composition of “Tubulin” constituting Microtubules of Sperm Flagella. *Nat.* – 1968. – V.217., № 5133. – P.1053–1054.
60. Moritz, M., Braunfeld, M. B., Guénebaud, V., Heuser, J., & Agard, D. a. // Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat.Cell.Biol.* – 2000 - V.2., № 6 - P.365–370.
61. Murray K. // The basic proteins of cell nuclei, *Annu.Rev.Biochem.* – 1965.
62. Nakayasu, H., and Ueda, K. // Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. *Exp. Cell Res.* – 1983. - № 143. – P. 55–62.

63. Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I., and Sakai, H. // Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – V. 84. – P. 5262–5266.
64. Nogales, E., Wolf, S. G., & Downing, K. H. // Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nat.* - 1998. – V.391., № 6663. - P.199–203.
65. Oakley, B. R. // An abundance of tubulins. *Trends in cell biology.* – 2000. – V. 10, № 12, - P. 537–542.
66. Ohnishi, T., Kawamura, H., and Yamamoto, T. // Extraction of a Protein Resembling Actin from the Cell Nucleus of the Calf Thymus. *J. Biochem.* – 1963. - V. 54. - P. 298–300.
67. Ohnishi, T., Kawamura, H., and Tanaka, Y. // Actin and myosin-like proteins in the calf thymus cell nucleus. *J. Biochem.* – 1964. – V. 56. - 6–15.
68. Pahl H.L. // Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* – 1999. – V.18, № 49, - P. 6853 – 6866.
69. Pemberton LF, Paschal BM. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic.* – 2005. – V. 6, № 3. – P. 187-198.
70. Peterson, J. L., and McConkey, E. H. // Non-histone chromosomal proteins from HeLa cells. A survey by high resolution, two-dimensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.* – 1976. – V. 251, 548–554.
71. Ponstingl H, Krauhs E, Little M, Kempf T. // Complete amino acid sequence of α -tubulin from porcine brain. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* – 1981. – V.78. – P.2757–2761.
72. Puck T. T. // Cyclic AMP, the microtubule-microfilament system, and cancer. *PNAS.* – 1977. - №74. – P.4491—4495
73. Rai S.S., Wolff J. // Localization of the vinblastine-binding site on beta-tubulin. *J.Biol.Chem.* – 1996. – V.271. – P.14707–14711.
74. Ramsby Melinda L., Makowski Gregory S. // Differential Detergent Fractionation of Eukaryotic Cells. *The Proteomics Protocols Handbook.* – 2005. – P. 37-48.
75. Ryan K. J. and Wente S.R. // The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology.* – 2000. – V. 12, № 3. – P. 361–371.
76. Rosenbaum, J. // Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Current Biology.* - 2000. – V.10., №21. - P.801–803.
77. Sabatini, D. D., Bensch, K., & Barnett, R. J. // Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J.Cell.Biol.* – 1963. – V.17., № 1. – P. 19–58.

78. Sander C, Schneider R. // Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins*. – 1991. – V.9., № 1. – P.56-68.
79. Saredi A, Howard L, Compton DA. NuMA assembles into an extensive filamentous structure when expressed in the cell cytoplasm. *J Cell Sci*. - 1996. - № 109. – P.619–630.
80. Sauman, I. and Berry, S. J. // An actin infrastructure is associated with eukaryotic chromosomes: Structural and functional significance. *Eur. J. Cell Biol*. – 1994. – V. 64. – P. 348–356.
81. Schmidt A., Hall M. H. // Signalling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol*. – 1998. - №14. – P.305—338.
82. Schwarzerová, K., Petrásek, J., Panigrahi, K. C. S., Zelenková, S., Opatrný, Z., & Nick, P. // Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma*., - V. 227., №2-4., - P.185–196.
83. Slautterback, D.B. // Cytoplasmic microtubules: *I. Hydra*. *J.Cell.Biol*. – 1963. – V.18., №2. – P. 367-388.
84. Shelanski, M. L., and Taylor, E. W. // Isolation of a protein subunit from microtubules. *J.Cell.Biol*. – 1967. – V.34. ,№ 2. – P.549–554.
85. Small, J.V. // The actin cytoskeleton. *Electron. Microsc. Rev*. 1 – 1988. - P.155-174.
86. Smith, S. S., Kelly, K. H., and Jockusch, B. M. // Actin co-purifies with RNA polymerase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 1979. – V. 86. – P. 161–166.
87. Teicher, B. A. (n.d.). // The role of microtubules in cell biology, neurobiology and oncology. Humana Press – 2008. – Ch.3. – P. 47-82.
88. Teicher, B. A. (n.d.). // The role of microtubules in cell biology, neurobiology and oncology. Humana Press – 2008. – Ch.5. – P. 105-122.
89. Teicher, B. A. (n.d.). // The role of microtubules in cell biology, neurobiology and oncology. Humana Press – 2008. – Ch.6. – P. 123-176.
90. Van den Berg B. H., Harris T., McCarthy F. M., Lamont S.J., Burgess S. C. // Non-electrophoretic differential detergent fractionation proteomics using frozen whole organs. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. – 2007. – V. 21. – P. 3905–3909.
91. Vogel, J. M., Stearns, T., Rieder, C. L., & Palazzo, R. E. // Centrosomes Isolated from *Spisula solidissima* Oocytes Contain Rings and an Unusual Stoichiometric Ratio of α/β Tubulin. *J.Cell.Biol*. – 1997 – V.137., № 1. – P.193–202.
92. Walss C., Kreisberg J.I. and Ludueña R.F. // Presence of the betaII isotype of tubulin in the nuclei of cultured mesangial cells from rat kidney. *Cell motility and the cytoskeleton*. – 1999. – V. 42, № 4. – P. 274–84.

93. Walss-Bass, C., Kreisberg, J. I., & Ludueña, R. F. // Mechanism of localization of betaII-tubulin in the nuclei of cultured rat kidney mesangial cells. *Cell motility and the cytoskeleton*. – 2001. – V. 49, № 4. – P. 208–217.
94. Walss-Bass, C., Xu, K., David, S., Fellous, A., & Ludueña, R. F. (2002). Occurrence of nuclear beta(II)-tubulin in cultured cells. *Cell and tissue research*. – 2002. – V. 308, № 2. – P. 215–223.
95. Warner AK, Sloboda RD. // C-terminal domain of the mitotic apparatus protein p62 targets the protein to the nucleolus during interphase. *Cell Motil Cytoskeleton*. - 1999. - № 44. – P.68–80.
96. Watson Ned. // Isolation and Use of Mammalian Cell Nuclei. Reprinted from *Neurotransmissions*, a newsletter of Sigma-RBI. – 1999. – V. 15, № 4. – P. 18-21
97. Wente S. R. // Gatekeepers of the nucleus. *Science*. – 2000. – V. 288. – P. 1374-1377.
98. Wiese, C., & Zheng, Y. // γ -Tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Cur.Opin. in Struct.Biol.* – 1999. - V.9., № 2. – P.250–259.
99. Wilson, P. G. and Borisy, G. G. // Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *BioEssays*. - 1997. – V.19. – P.451-454.
100. Xu, K. and Luduena, R. F. // Characterization of Nuclear β II -Tubulin in Tumor Cells : A Possible Novel Target for Taxol – 2002. – V. 52, № 4. – P. 39–52.
101. Yanagida, M., Hayano, T., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Natsume, T., Isobe, T. and Takahashi, N. // Human fibrillarin forms a sub-complex with splicing factor 2-associated p32, protein arginine methyltransferases, and tubulins alpha 3 and beta 1 that is independent of its association with preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P.1607-1614.
102. Yeh T., Hsieh R., Shen S. et al. // Nuclear betaII-tubulin associates with the activated notch receptor to modulate notch signaling. *Cancer research*. – 2004. - № 64. – P. 8334-8340.
103. Yie Hou Lee, Hwee Tong Tan and Maxey C. M. Chung. // Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *Proteomics*. – 2010. – V. 10. – P. 3935–3956
104. Zhang, C., Jenkins, H., Goldberg, M. W., Allen, T. D., and Hutchison, C. J. // Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in *Xenopus* egg extract. *J. Cell Sci.* – 1996. – V. 109. – P. 2275–2286.

105. Zhao, K., Wang, W., Rando, O. J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., and Crabtree, G. R. // Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell*. – 1998.- V. 95. – P. 625–636.
106. Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B., & Mitchison, T. // Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nat.* - 1995. – V.378., № 6557. – P.578–583.
107. Zhu X, Ding L, Pei G. // Carboxyl-terminus of mitotin is sufficient to confer spindle pole localization. *J Cell Biochem*. – 1997. - № 66. – P.441– 449.
108. Бабаков В.Н. // Взаимодействие изоформ α -актинина с транскрипционным фактором RelA/NF- κ B. Диссертация на соискание ученой степени канд. биол. наук. С.-Петербург. – 2004. - 100 с.
109. Комалетдинова Ф.М., Пинаев Г.П. // Роль фидамина в проведении внутриклеточного сигнала. *Цитология*. – 2006. - Том 48., №11., - Стр.924-934.
110. Сорокин А. В., Ким,Е. Р. и Овчинников Л. П. // Ядерно - цитоплазматический транспорт белков. *Успехи биологической химии* – 2007. – т. 42. – стр.89-128.
111. Хотин М.Г. // Взаимодействие альфа-актинина-4 с ядерными белковыми комплексами, регулирующими экспрессию генов. Диссертация на соискание ученой степени канд. биол. наук. С.-Петербург. – 2010., - 112с.