



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. Ломоносова

Биологический факультет
Кафедра клеточной биологии и гистологии

Павлюченкова Анастасия Никитична

МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ Т-КАДГЕРИНА И ЕГО ЛИГАНДА
АДИПОНЕКТИНА В ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОМ
ПЕРЕХОДЕ

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научные руководители:

д.б.н. Рубина К.А., лаборатория морфогенеза и
репарации тканей ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова;
к.б.н. Сысоева В.Ю., лаборатория генных и клеточных
технологий ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова

Москва, 2020

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	8
1.1. Патологическое ремоделирование стенки кровеносных сосудов при развитии атеросклероза.....	8
1.2. Белки суперсемейства кадгеринов.....	11
1.3. Внеклеточные везикулы в регуляции метаболизма клеток....	20
Глава 2. Материалы и методы	27
2.1.Выделение первичной культуры сосудистых клеток из легких мыши с флоксированным геном Т-кадгерина.....	27
2.2.Культивирование перевиваемых клеточных линий.....	27
2.3.Индукция нейритогенеза клетками Neuro2A.....	28
2.4.Транфекция клеток.....	29
2.5.Клонирование трансфицированных клеток и селекция клонов.....	30
2.6.Вестерн-блоттинг.....	30
2.7.Иммунофлуоресцентное окрашивание на Т-кадгерин.....	31
2.8.Проточная цитометрия внеклеточных везикул.....	32
Глава 3. Результаты и обсуждение	33

3.1.Влияние Т-кадгерина и адипонектина на метаболизм сосудистых клеток мышцы.....	33
3.2.Участие Т-кадгерина в миграции опухолевых клеток и передаче материала между клетками.....	34
Заключение	47
Выводы	49
Благодарности	50
Список литературы	51

Список сокращений

AMPK — аденозинмонофосфат-зависимая протеинкиназа (AMP activated proteinkinase)

AKT1 — RAC- α серин-треониновая протеинкиназа

ARF6 — малый ГТФ-связывающий белок семейства ARF (ADP-ribosylation factor 6)

BMP — костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein)

Cdc42 — белок контроля клеточного цикла (cell division control protein 42 homolog)

DMEM — среда Игла, модифицированная Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle medium)

EGF — эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)

ERK1/2 — киназы, регулируемые внеклеточным сигналом (extracellular signal-regulated kinases)

FAP — белок активации фибробластов (fibroblast activating protein)

LAMP1 — гликопротеин лизосомальной мембраны (lysosomal-associated membrane protein 1)

MEM NAA — среда Игла с незаменимыми аминокислотами (minimum essential medium non-essential amino acids)

Nf- κ B — ядерный фактор активированных В-клеток (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

PAQR — AdipoR, рецептор адипонектина (progesterone and adiponectin receptor)

PBS — фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline)

PKC — протеинкиназа C (protein kinase C)

PLD — фосфолипаза Д (phospholypase D)

Rac1 — малый G-белок семейства ГТФаз, субстрат ботулотоксина C3 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)

TGF- β — фактор роста опухолей β (tumor growing factor β)

TSPAN — тетраспанин

БСА — бычий сывороточный альбумин

ГФИ — гликозилфосфатидилинозитол

кДНК — копияная ДНК

ЛПНП — липопротеиды низкой плотности

МВТ — мультивезикулярное тельце

ПААГ — полиакриламидный гель

ФБС — фетальная бычья сыворотка

ЭндоМТ — эндотелиально-мезенхимальный переход

ЭПР — эндоплазматический ретикулум

Введение

Атеросклероз — хроническое прогрессирующее заболевание, одной из причин развития которого является эндотелиальная дисфункция и нарушение целостности эндотелиального монослоя. Эндотелиально-мезенхимальный переход, для которого характерно нарушение межклеточных контактов и приобретение промигрантного фенотипа, способствует нарушению целостности эндотелиальной выстилки сосудов. Основным механизмом инициации патологического ремоделирования стенки кровеносных сосудов при атеросклерозе является накопление в ней модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Ранее было показано, что рецептором, опосредующим гормоноподобное действие ЛПНП на гладкомышечные клетки аорты человека, является Т-кадгерин. В организме человека Т-кадгерин экспрессирован преимущественно в нервной и сердечно-сосудистой системе: в кардиомиоцитах, эндотелиальных, гладкомышечных клетках и перицитах. Т-кадгерин имеет несколько значимых отличий от других представителей суперсемейства: он не выполняет функцию адгезии в отсутствие трансмембранного и цитоплазматического доменов, а его закрепление в мембране обеспечивается гликозилфосфатидилинозитольным (ГФИ) якорем. Вероятно, основной его функцией является передача внутриклеточных сигналов, однако механизмы передачи сигнала и участия этой сигнализации в функционировании клетки не до конца известны. В частности, роль Т-кадгерина в регуляции дифференцировки и транс-дифференцировки клеток сосудистой стенки до сих пор не изучены.

Т-кадгерин также является рецептором адипонектина — гормона жировой ткани, конкурирующего с ЛПНП за связывание и обладающего кардиопротекторными свойствами. Одним из возможных механизмов, активируемым в ответ на связывание адипонектина с Т-кадгерином, является

запуск сигнального пути MAPK/ERK. Недавно было обнаружено, что, помимо запуска внутриклеточной сигнализации, адипонектин усиливает биогенез и секрецию экзосом, что является способом межклеточной передачи регуляторных молекул и компонентов мембран.

Целью данного исследования стало изучение механизмов участия Т-кадгерина и его лиганда – адипонектина в эндотелиально-мезенхимальном переходе.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить внутриклеточную сигнализацию сосудистых клеток с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина в ответ на действие адипонектина;
2. Исследовать роль внеклеточных везикул в передаче сигнала с участием Т-кадгерина.

Работа проводилась на базе факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Патологическое ремоделирование стенки кровеносных сосудов при развитии атеросклероза.

1.1.1. Роль эндотелиально-мезенхимального перехода в развитии атеросклероза.

Развитие **атеросклероза** характеризуется уплотнением и истончением стенок крупных артерий и формированием склеротических бляшек, включающих в себя иммунные и мезенхимные клетки, а также некоторые липиды и компоненты внеклеточного матрикса (Bentzon et al., 2014). Источником мезенхимных клеток в атеросклеротических бляшках, согласно результатам последних исследований, являются эндотелиальные клетки стенки самих артерий, претерпевающие **эндотелиально-мезенхимальный переход**, который представляет собой комплексный процесс клеточной трансдифференцировки, в ходе которого эндотелиальные клетки теряют свои фенотипические особенности и приобретают мезенхимальный фенотип (Chen et al., 2015). При этом на молекулярном уровне данный процесс характеризуется снижением уровня экспрессии эндотелиальных белков, к которым относятся фактор фон Виллебранда, CD31/PECAM-1 и VE-кадгерин, при параллельной инициации экспрессии белков, специфичных для мезенхимальных клеток, таких как гладкомышечный актин, фибронектин, N-кадгерин, FAP, а также коллагены I и III типов (*рис. 1*).

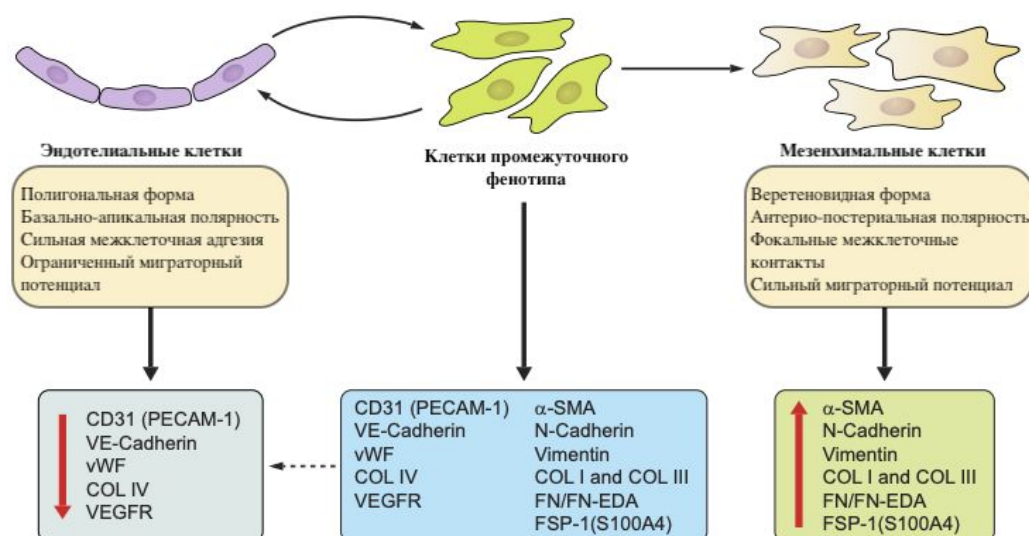


Рисунок 1. Иллюстрация процесса эндотелиально-мезенхимального перехода (no Piera-Velazquez et al., 2019).

Впервые описанный при развитии сердечных клапанов в куриных и мышинных эмбрионах, данный процесс регулируется большим количеством специфических индукторов, к которым относятся макромолекулярные компоненты внеклеточного матрикса, такие как фибриллин и фибулин, а также факторы роста TGF- β , BMP и некоторые другие регуляторные молекулы, представленные в примордиальном субэндотелиальном слое мезенхимы (Markwald et al., 1975; Markwald et al., 1977; Armstrong and Bischoff, 2004). Тем не менее, регулирующие данный процесс молекулярные механизмы до сих пор достоверно не известны.

1.1.2. Роль липопротеидов низкой плотности в развитии атеросклероза.

Влияние различных адипокинов на клетки сосудистой стенки активно изучается, на данный момент обнаружено порядка 30 белков играющих роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний (Taube et al., 2012). Особый интерес представляют адипокины, участвующие в регуляции миграции и пролиферации гладкомышечных клеток (ГМК) при развитии атеросклероза. Одним из основных механизмов инициации и прогрессирования атеросклеротических

поражений является накопление в сосудистой стенке модифицированных **липопротеидов низкой плотности (ЛПНП)** — макромолекулярных комплексов, осуществляющих перенос холестерина и, в случае повышения их концентрации в крови, инициирующие накопление этого вещества в стенках сосудов путем эндоцитоза, опосредованного рецептором аполипопротеина В (Goldstein et al., 1985). Однако были получены данные, свидетельствующие о способности ЛПНП влиять на клетки альтернативным путем, характеризующимся высокой скоростью и временным эффектом, имеющим сходства с действием веществ гормональной природы (Block et al., 1988). В частности, подобный эффект был показан на примере регуляции липопротеидами низкой плотности активности, дифференцировки и пролиферативной способности клеток сосудистых стенок (Sachinidis et al., 1990; Resink et al., 1999). Были получены данные о способности ЛПНП стимулировать активацию фосфолипазы С и аденилатциклазы, а также влиять на кислотность цитоплазмы и регулировать внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , непосредственно или путем активации гормонов и факторов роста, регулирующих его обмен (Bochkov et al., 1993; Matsumura et al., 1997; Honda et al., 1999). На основании результатов этих исследований была высказана гипотеза о запуске сигнальных каскадов как причины высокой скорости гормоноподобных эффектов липопротеидов низкой плотности.

В нашей лаборатории было показано, что для осуществления гормоноподобного эффекта липопротеидов существует еще один рецептор нативных и модифицированных ЛПНП, специфический для гладкомышечных клеток и, вероятно, выполняющий сигнальную функцию (Bochkov et al., 1996). Анализ чувствительности лигандов к различным ингибиторам показал, что этим белком является **Т-кадгерин**, представленный двумя формами, различающимися по массе — зрелой p105 и про-белком p130 (рис. 2).

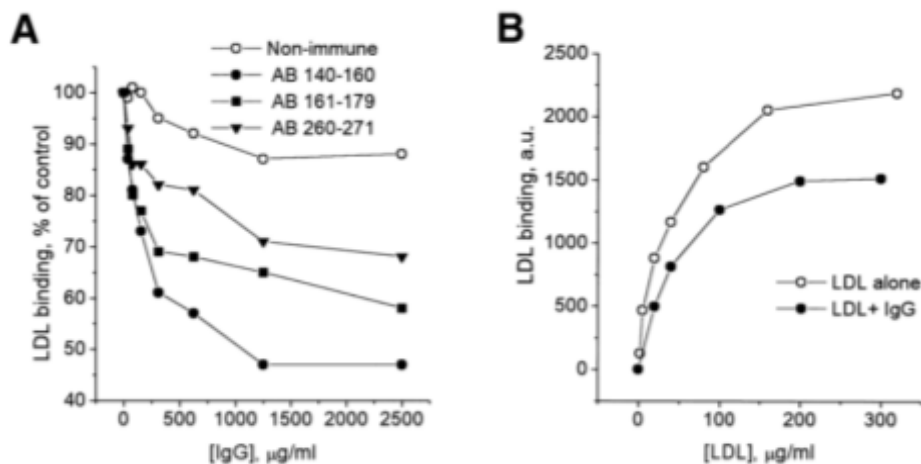


Рисунок 2. Ингибирование ЛПНП/p105 связывания антителами против Т-кадгерина (Ткачук *et al.*, 1998). (А) ЛПНП в одинаковой концентрации инкубировали с p105 в присутствии тотальных IgG (В) Различные концентрации ЛПНП инкубировали с p105 в присутствии/отсутствии иммуноглобулинов против 140-160 кДа.

Позднее была показана рецепторная роль Т-кадгерина в кардиомиоцитах и других клетках сосудистой стенки — перицитах и эндотелиальных клетках, а также в МСК, фибробластах легких, кератиноцитах и некоторых опухолевых клетках (Ivanov *et al.*, 2001; Niermann *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002; Rubina *et al.*, 2012; Andreeva and Kutuzov, 2010).

1.2. Белки суперсемейства кадгеринов.

1.2.1. Общая характеристика суперсемейства.

Кадгерины представляют собой Ca^{2+} -зависимые гликопротеины, играющие важную роль в формировании гомофильных и гетерофильных межклеточных контактов для поддержания структурной целостности тканей (Takeichi M., 1991). Несмотря на первоначальное открытие кадгеринов как адгезионных мембранных молекул, к данному суперсемейству относится широкий ряд разнообразных белков (723-748 аминокислотных остатков), являющихся трансмембранными рецепторами схожей конфигурации и делящихся на такие группы как «классические» кадгерины, протокадгерины,

десмосомальные кадгерины, атипичные кадгерины и некоторые другие (Angst et al., 2001), с орган-специфическими паттернами экспрессии. Большинство представителей суперсемейства кадгеринов имеет консервативные кальций-связывающие сайты, располагающиеся между внеклеточными (EC, extracellular cadherin) доменами и стабилизированные тремя ионами Ca^{2+} , короткую трансмембранную часть и вариабельную цитоплазматическую часть, которая непосредственно взаимодействует с различными внутриклеточными белками (George and Beeching, 2006; Nagar et al., 1996). Однако, помимо формирования межклеточных контактов, некоторые кадгерины могут принимать участие в регуляции процессов миграции, пролиферации и дифференцировки клеток (Angst et al., 2001).

1.2.2. Т-кадгерин — атипичный представитель суперсемейства.

Первоначально **Т-кадгерин** («truncated»), также ныне известный как кадгерин-13 (Cdh13) или Н-кадгерин («heart»), был описан в эмбриональной нервной ткани птиц (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991). Было показано его прямое участие в регуляции роста формирующихся нейритов и определена его функция как молекулы навигации (Fredette et al., 1994). Последующее обнаружение Т-кадгерина в мозге человека и других позвоночных показало высокую консервативность гена и аминокислотной последовательности этого белка (табл. 1).

Таблица 1. Эволюционный консерватизм Т-кадгерина (по Rivero et al., 2013).

Биологический вид	ДНК (% гомологии)	Белок (% гомологии)
<i>Homo sapiens</i>	100	100
<i>Canis familiaris</i> (собака)	91.42	95.92
<i>Pan troglodytes</i> (шимпанзе)	98.66	98
<i>Bos taurus</i> (корова)	91.44	95
<i>Rattus norvegicus</i> (крыса)	87.9	94.4
<i>Mus musculus</i> (мышь)	87.7	93.94
<i>Gallus gallus</i> (курица)	73.61	75.5

Несмотря на обнаружение Т-кадгерина в клетках многих тканей и органов, наиболее высокий уровень экспрессии Т-кадгерина наблюдается в кровеносных сосудах (эндотелиальные и гладкомышечные клетки, перициты), однако он может различаться в зависимости от органа (Ivanov et al., 2001; Wyder et al., 2000). В связи с этим, вопрос о роли этого белка в функционировании сердечно-сосудистой системы в норме и при патологиях за последние пару десятилетий вызывает особый интерес. В частности, наблюдается усиление экспрессии Т-кадгерина в гладкомышечных клетках при развитии атеросклеротического поражения сосудистой стенки, а также на различных клеточных моделях *in vitro* было показано изменение пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток в зависимости от уровня экспрессии Т-кадгерина и участие этого белка в регуляции цитокинеза и репликации centrosом (Ivanov et al., 2001; Ivanov et al., 2004; Andreeva et al., 2009). В более поздних работах была показана роль Т-кадгерина как навигационной молекулы, определяющей направленный рост сосудов и нервов (Рубина и Ткачук, 2017; Rubina and Tkachuk, 2015).

Структура внеклеточных доменов Т-кадгерина сходна с таковыми у «классических» кадгеринов, однако некоторые особенности его строения позволяют предполагать, что он, вероятно, практически не способен участвовать в процессах специфической межклеточной адгезии, но является важным звеном в передаче внутриклеточных сигналов (рис. 3). У Т-кадгерина отсутствуют цитоплазматический и трансмембранный домены, а в EC1 нет свойственной одному из типов «классических» кадгеринов HAV (His-Ala-Val) последовательности, обеспечивающей узнавание при гомофильном связывании (Blashuk and Rowlands, 2000). Более того, существует большое количество изоформ этого белка, появляющихся благодаря механизмам альтернативного сплайсинга или в результате процессинга. В частности, как уже было сказано, Т-кадгерин человека синтезируется в виде про-формы, на N-конце которой

располагается сигнальный пептид, отщепляемый пептидазой лишь после попадания незрелого белка в ЭПР (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991).

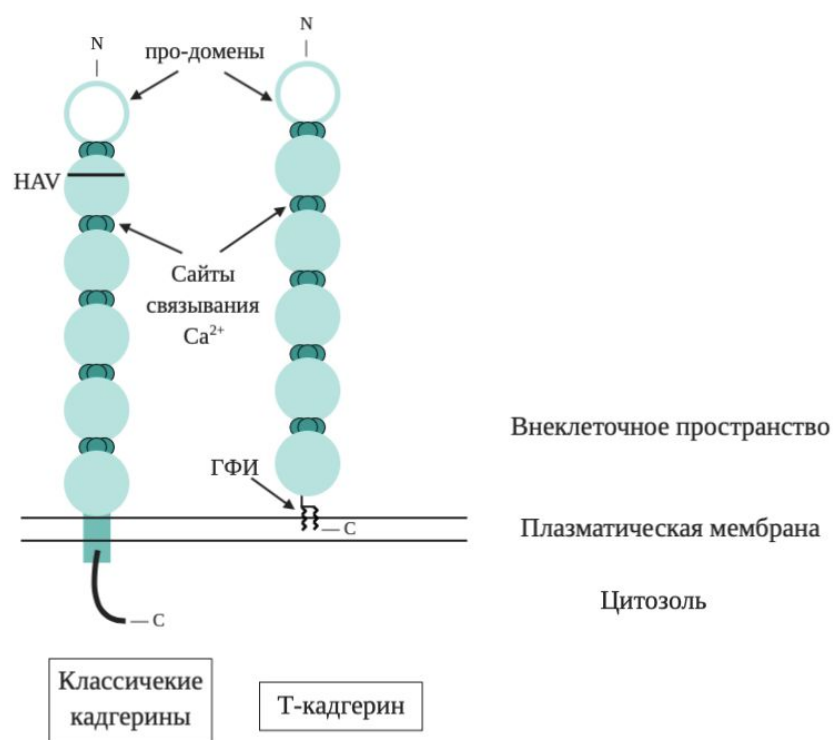


Рисунок 3. Схема структурной организации Т-кадгерина в сравнении с «классическими» представителями суперсемейства (по Ranscht, 1994 и Philippova et al., 2009).

В результате ряда посттрансляционных модификаций молекулярная масса зрелой формы Т-кадгерина достигает 105 кДа, а масса про-белка — 130 кДа. Интересно, что на мембранах одних и тех же клеток, экспрессирующих Т-кадгерин, в норме обнаруживаются обе формы белка, и, хотя их соотношение различается в зависимости от происхождения клеток, рецептором ЛПНП является как p105, так и p130 (Tkachuk et al., 1998). N-гликозилирование играет очень важную роль в созревании Т-кадгерина — ингибирование данного процесса приводит к накоплению незрелой формы белка (75 кДа), не транслоцирующейся на поверхность клетки. Для опухолевых клеток характерен широкий разброс при оценке молекулярной массы Т-кадгерина по результатам

иммуноблоттинга — от 45 до 130 кДа, достоверного объяснения чему на данный момент все еще нет (Philippova et al., 2009).

В пользу гипотезы об участии Т-кадгерина в активации внутриклеточной сигнализации свидетельствует его закрепление на внешней стороне плазматической мембраны благодаря расположенному на С-конце гликозилфосфатидилинозитольному (ГФИ) якорю (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991). Строение ГФИ-якоря сходно для всех клеток млекопитающих (рис. 4), но может отличаться рядом дополнительных модификаций и вариациями алкильных заместителей. Модификация С-конца белка начинается в ЭПР, где концевой пептид из 20 аминокислотных остатков замещается на про-форму ГФИ-якоря, и завершается в аппарате Гольджи преобразованием двух остатков жирных кислот, которые обеспечивают непосредственное закрепление в липидной мембране (Kinoshita, 2014).

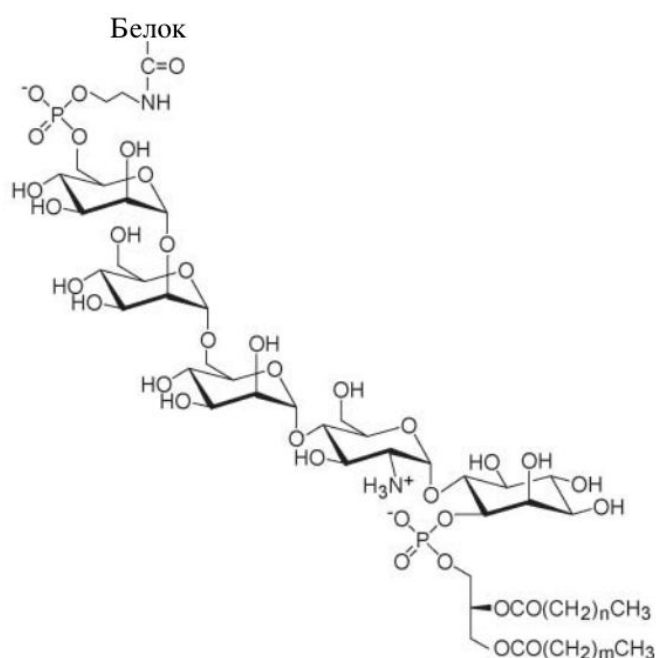


Рисунок 4. Общая схема строения ГФИ-заякоренных белков в клетках млекопитающих (по Orlean and Menon, 2007): белок - фосфоэтаноламин - манноза (х3, могут быть модифицированы дополнительными углеводными остатками) - глюкозамин - фосфатидилинозитол (в качестве алкильного заместителя чаще всего стеариновая кислота).

Как и многие ГФИ-заякоренные белки, Т-кадгерин локализуется в липидных плотках, вместе с такими сигнальными молекулами, как Src-киназы, G-белки, РКС и многие другие (Philippova et al., 1998), что способствует их взаимодействию. В частности, была показана способность Т-кадгерина активировать ГТФазы Rac1 и Cdc42 в эндотелиальных клетках, что приводит к изменению проницаемости стенки кровеносных сосудов, а также было обнаружено, что гиперэкспрессия Т-кадгерина активирует один из универсальных внутриклеточных сигнальных путей — PIK3/AKT/mTOR, необходимого для избежания апоптоза, вызванного оксидативным стрессом (Joshi et al., 2005; Rubina et al., 2009).

1.2.3. Адипонектин как лиганд Т-кадгерина.

В соответствии с существующей гипотезой, одновременно с липопротеидами низкой плотности, еще одним лигандом Т-кадгерина является гексамерная и высокомолекулярная форма белка **адипонектина** (рис. 5).

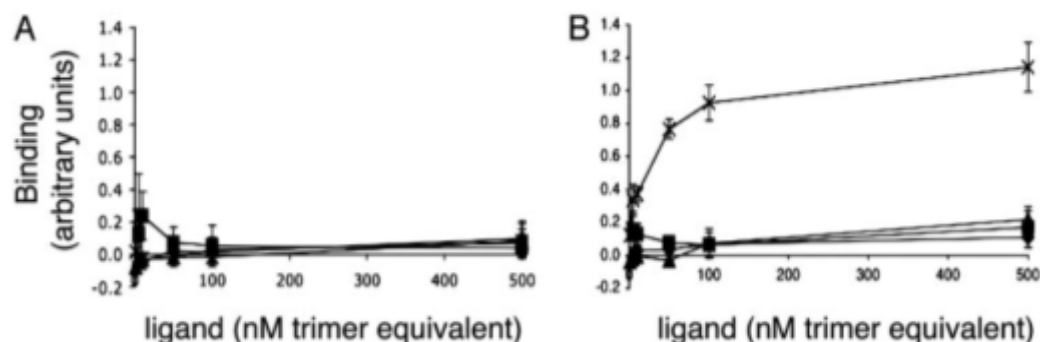


Рисунок 5. Оценка связывания гексамерной и молекулярной форм адипонектина клетками линии CHO (Hug et al., 2004). X - гексамерная/высокомолекулярная форма адипонектина, продуцируемая клетками линии HEK; ▲ - тримерная форма адипонектина, продуцируемая клетками линии HEK; ◇ - глобулярная форма адипонектина, продуцируемая бактериальными клетками; ■ - развернутая форма адипонектина, продуцируемая бактериальными клетками. (A) FLAG-меченный рекомбинантный белок инкубировали с клетками CHO-GFP (B) FLAG-меченный рекомбинантный белок инкубировали с клетками CHO-GFP, экспрессирующими Т-кадгерин.

Адипонектин, также имеющий обозначения apM1 (Adipose most abundant gene transcript 1), AdipoQ (Adiponectin, C1q and collagen domain containing) и Acrp30 (Adipocyte complement-related protein of 30 kDa), является полипептидным гормоном жировой ткани, для которого в норме характерно высокое содержание в крови, обратно коррелирующее с процессами ожирения, развитием диабета II типа и прогрессией заболеваний сердечно-сосудистой системы (Yamauchi et al., 2001; Kojima et al., 2003). Мономер адипонектина состоит из варибельного N-концевого участка с сигнальной последовательностью, глобулярного C-концевого домена, гомологичного компоненту системы комплемента C1q, и расположенного между ними коллагеноподобного домена (рис. 6), имеющего структурные сходства с таковыми у TNF- α и необходимого для ассоциации мономеров в комплексы (Scherer et al., 1995).

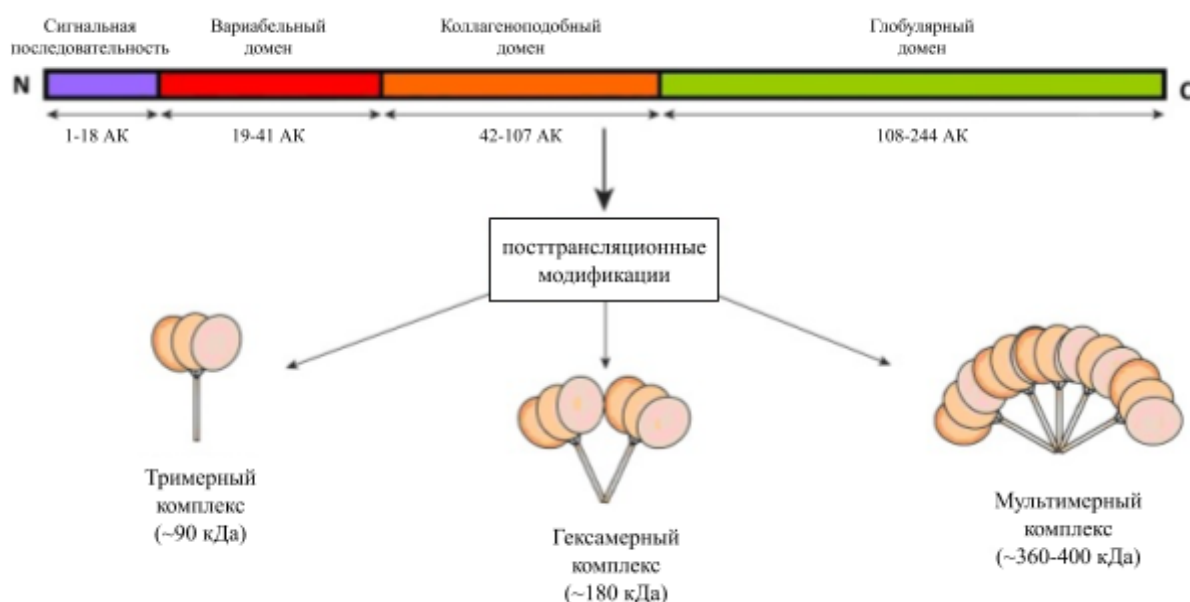


Рисунок 6. Строение белка адипонектина и формируемые им структуры (Wang et al., 2017).

Поскольку важную роль в активности адипонектина и его способности связываться со своими рецепторами играют олигомеризация и различные посттрансляционные модификации (например, гидроксирование и

гликозилирование), в кровотоке мономерные формы этого белка практически не обнаруживаются — основная масса адипонектина представлена циркулирующими в крови тримерными, гексамерными и высокомолекулярными комплексами, последние из которых считаются мажорными (Pajvani et al., 2003).

В отличие от липопротеидов низкой плотности, адипонектин обладает противовоспалительными функциями и может предотвращать апоптоз. Данные эффекты были выявлены при изучении влияния адипонектина на стенки сосудов — при взаимодействии этого белка с рецепторами адипонектина в эндотелиальных клетках наблюдалась активация церамидазы, протеинкиназ AKT1 и AMPK, а также подавление синтеза IL-8 и деградация транскрипционного фактора Nf-κB (Kobayashi et al., 2004; Kobashi et al., 2005; Wang et al., 2014). Помимо локального противовоспалительного действия адипонектина, было показано его ингибиторное влияние на провоспалительные функции макрофагов и CD4⁺ Т-клеток (Cheng et al., 2011).

Несмотря на тот факт, что первыми описанными рецепторами адипонектина являются AdipoR1 (PAQR1) и AdipoR2 (PAQR1), представляющие собой трансмембранные белки из семи α-спиральных доменов, современные данные указывают на роль Т-кадгерина в качестве специфического рецептора адипонектина, обладающего высокой аффинностью к наиболее активным формам этого белка, характерным для клеток сосудистой стенки (Hug et al., 2004; Yamauchi et al., 2014,). В частности, эксперименты на мышах, нокаутных по гену Т-кадгерина, показали гипертрофию миокарда, невозможность полноценной реваскуляризации, а также повышение концентрации адипонектина в крови и формирование атеросклеротических бляшек, что объяснялось невозможностью эндотелиальных и мышечных клеток связать данный цитокин в отсутствие его специфического рецептора (Denzel et

al., 2010; Parker-Duffen et al., 2010; Fujishima et al., 2017). Таким образом, было сделано заключение о роли адипонектина в качестве протектора, предотвращающего патологическую и возрастную дисфункцию эндотелия. Одним из механизмов, который рассматривается в качестве гипотезы о механизмах реализации таких протекторных эффектов на сегодняшний день - это конкурентное взаимодействие адипонектина и ЛПНП с Т- кадгерином, запускающее разные пути внутриклеточной сигнализации (Balatskaya et al. 2019).

Внутриклеточная сигнализация от адипонектина через Т-кадгерин на данный момент изучена мало. К возможным механизмам сигнализации, характерным для связывания адипонектина с Т-кадгерином, относятся AMPK и MAPK/ERK-каскады (Denzel et al., 2010; Lee et al., 2008).

Недавно было обнаружено, что адипонектин при взаимодействии с Т-кадгерином способен также усиливать биогенез и секрецию экзосом в эндотелиальных и гладкомышечных клетках, что приводит к снижению концентрации глюкозы в крови (рис. 7).

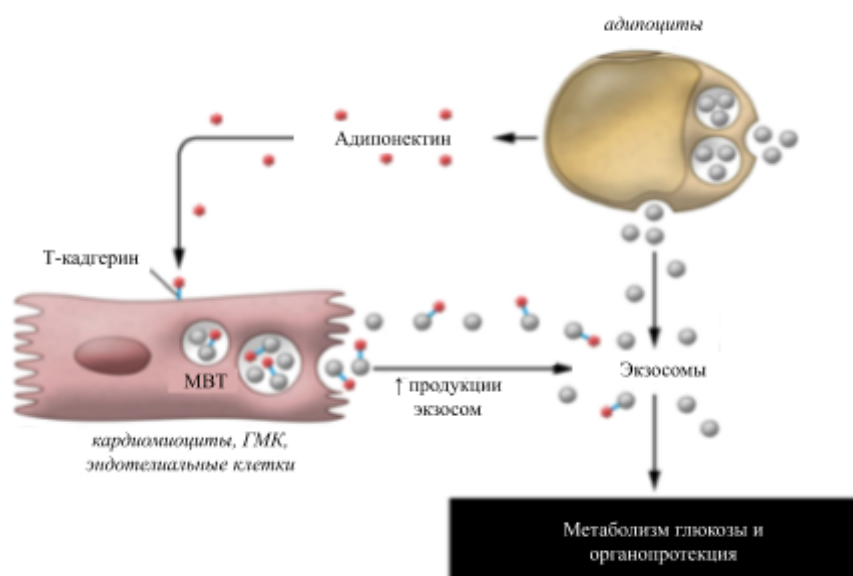


Рисунок 7. Экзосомы, полученные из жировой ткани, влияют на метаболизм глюкозы всего организма (Kita et al., 2019).

1.3. Внеклеточные везикулы в регуляции метаболизма клеток.

1.3.1. Общая характеристика внеклеточных везикул.

Внеклеточные везикулы представляют собой обширную группу секретируемых клеткой мембранных пузырьков, гетерогенных по составу и варьирующих в размерах от 30 до 1 000 нм. Их формирование считается важным способом межклеточной коммуникации и показано для всех живых организмов, от архей и бактерий до человека и высших растений (Deatherage and Cookson, 2012; Robinson et al., 2016). В частности, у человека наличие внеклеточных везикул регистрируется в моче, молоке, слюне, синовиальной и спинномозговой жидкостях и плазме крови, где они наиболее хорошо изучены (Gonzalez et al., 2015).

На основании механизма биогенеза выделяется две группы — экзосомы и микровезикулы, также называемые эктосомами (*рис. 8*). Некоторые авторы выделяют отдельный, третий тип внеклеточных везикул — апоптотические тельца (Caruso and Poon, 2018), другие же относят их к микровезикулам. Совсем недавно появились данные о существовании еще одного типа внеклеточных везикул — миграсом (Li et al., 2015).

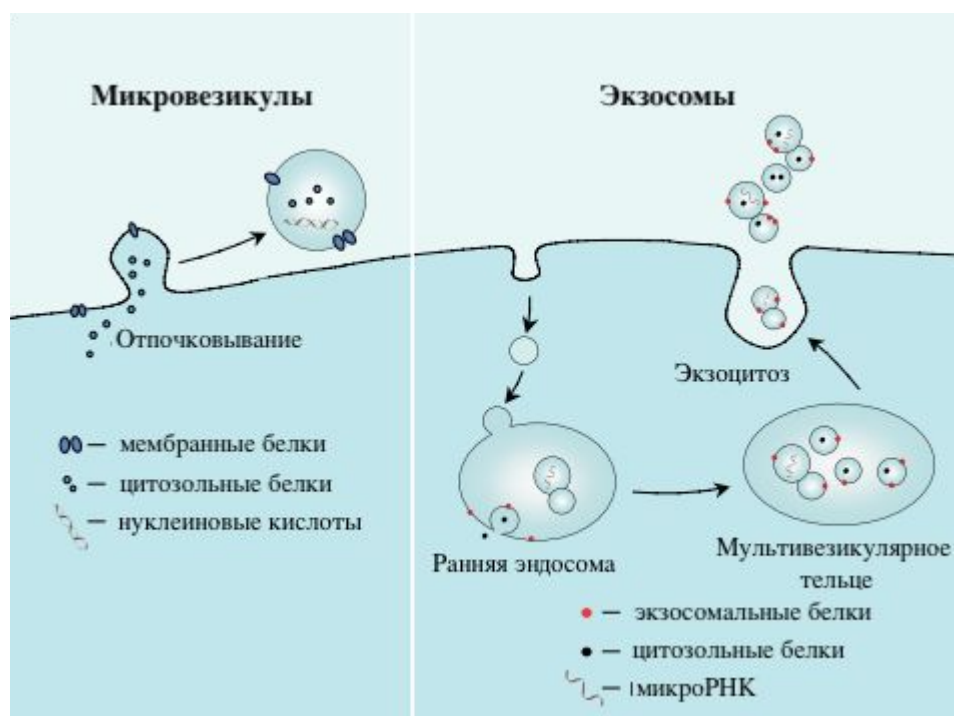


Рисунок 8. Типы внеклеточных везикул (по Lawson et al., 2016).

Несмотря на разделение внеклеточных везикул на несколько основных типов, каждая из групп также гетерогенна и представлена различными подтипами со своими особенностями.

1.3.2. Экзосомы.

Экзосомы — наиболее мелкий тип внеклеточных везикул (30-150 нм в диаметре), впервые описанный при созревании ретикулоцитов крысы (Pan and Johnstone, 1983). На данный момент экзосомы являются самым изученным типом внеклеточных везикул, их секреция в норме показана для большинства типов человеческих клеток, включая стволовые, эндотелиальные, гладкомышечные и нервные, а также для опухолевых клеток различного происхождения (Zhang et al., 2019).

Биогенез экзосом напрямую связан с процессом эндоцитоза. Поглощенные в результате эндоцитоза вещества и структуры упаковываются в небольшие мембранные пузырьки, формирующиеся в люмене ранней эндосомы в результате инвагинации ее мембраны. Часть РНК и белков попадает в

формирующиеся интралюминальные везикулы в результате захвата прилежащей к ним части цитоплазмы (Mizrak et al., 2013), однако существуют и механизмы направленного транспорта, обеспечивающие накопление в экзосомах специфического набора РНК и белков (Valadi et al., 2007; Buschow et al., 2005). При созревании эндосомы в ее мембране образуются микродомены, обогащенные гликосфинголипидами, холестерином, сфингомиелином, церамидом и специфическими мембранными белками, такими как TSPAN28, TSPAN29 и TSPAN30 (Subra et al., 2007; Pols and Klumperman, 2009). Также в мембране присутствует особый компонент — лизобисфосфатная кислота, необходимая для направленного транспорта холестерина (Kobayashi et al., 1999). Образовавшееся мультивезикулярное тельце (поздняя эндосома) либо сливается с лизосомой для дальнейшей деградации содержимого, либо перемещается по микротрубочкам к плазматической мембране клетки, в результате слияния с которой интралюминальные везикулы попадают во внеклеточное пространство и становятся экзосомами (Piper and Katzman, 2007).

В механизмы формирования экзосом вовлечено большое количество веществ, способных напрямую или косвенно регулировать реализацию и эффективность этих процессов. Белковые комплексы ESCRT-0, I, II и III и ассоциированная с ними Vps4-АТФаза играют важную роль в транспорте при эндосомальной дифференцировке, нарушение их функционирования снижает секрецию экзосом (Wollert and Hurley, 2010). Аналогичным действием обладает и выключение белка Alix, который является адаптером при сборке комплекса ESCRT и препятствует деградации белков интралюминальных везикул путем инициации их деубиквитинилирования (Odorizzi, 2006). Еще одними важными регуляторами процессов биогенеза и синтеза экзосом являются белки семейства Rab-ГТФаз, их роль показана на линии клеток аденокарциномы протоков молочной железы человека (MCF-7), на линии клеток карциномы шейки матки человека (HeLa) и на первичной культуре дендритных клеток мыши, что

свидетельствует о единстве механизмов формирования экзосом в различных клетках (Baietti et al., 2012; Ostrowski et al., 2010).

1.3.3. Микровезикулы.

Микровезикулы — более крупный тип внеклеточных везикул (100-2000 нм), первоначально описанный как “тромбоцитарная пыль” — субклеточный материал тромбоцитарного происхождения, встречающийся в норме в крови и сыворотке (Wolf, 1967). Последующие исследования показали наличие экзоцитоза у стимулированных нейтрофилов, опухолевых клеток и многих других (Stein and Luzio, 1991; Al-Nedawi et al., 2008), однако микровезикулы до сих пор остаются менее изученным типом внеклеточных везикул.

Биогенез микровезикул имеет общие черты для всех секретирующих их клеток и заключается в отпочковывании части плазматической мембраны клетки вместе с прилежащей цитоплазмой (Cocucci et al., 2009). Начальной стадией является потеря асимметричности участка липидного бислоя мембраны, в частности, перераспределение фосфатидилсерина во внешний слой (Hugel et al., 2005). По аналогии с биогенезом экзосом, регуляция инициации экзоцитоза осуществляется сфингомиелином, церамидом и холестерином, причем для последнего из них показана особая роль в модуляции данного процесса (Bianco et al., 2009). Процесс непосредственного отпочковывания сформировавшихся микровезикул от клеточной мембраны осуществляется благодаря актин-миозиновому комплексу — регуляция его работы влияет на их биогенез. В частности, усиление секреции микровезикул наблюдалось у линии клеток меланомы человека (LOX-IMVI) при гиперэкспрессии ARF6, белка, запускающего активацию PLD (Muralidharan-Chari et al., 2009). Однако с этим механизмом регуляции связаны еще некоторые процессы. Так же как и при эндосомально-опосредованном экзоцитозе, в механизмах отшнуровывания везикул во внеклеточное

пространство задействованы белки комплекса ESCRT. Тем не менее, на линии человеческих эмбриональных клеток почек (HEK) подавление экспрессии α -аррестина, белка, нарушающего работу отдельных компонентов машинерии, не вызывает полное ингибирование биогенеза микровезикул (Nabhan et al., 2012), что подтверждает наличие иных механизмов их секреции.

1.3.4. Миграсомы.

Миграсомы — недавно открытый тип микровезикул (Li et al., 2015). Они ассоциированы с матриксом и обнаруживаются в “следе” мигрирующих клеток, на конце сократительной фибриллы (рис. 9). Другие клетки способны поглощать эти везикулы и таким образом следовать за секретирующими их клетками, что может являться механизмом навигации при метастазировании опухолей и многих других процессах, связанных с направленной миграцией клеток.

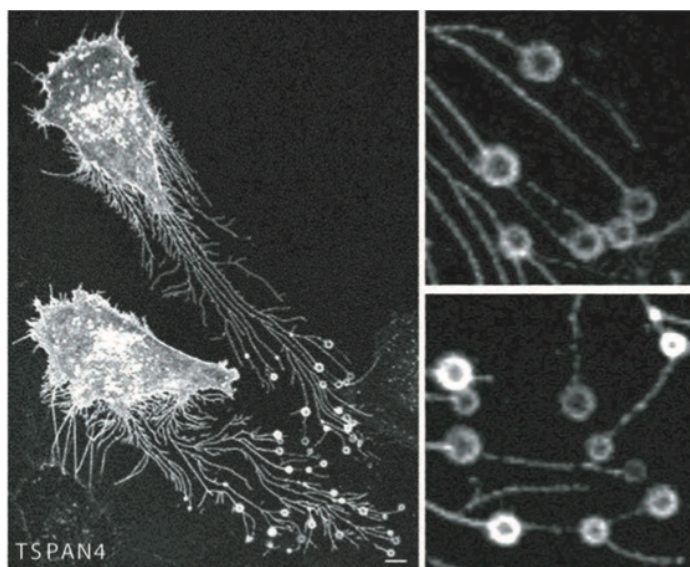


Рисунок 9. Клетки линии NRK (нормальные клетки почки крысы), экспрессирующие TSPAN4-mCherry. Конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 5 нм. Справа представлены увеличенные фрагменты изображения (Li et al., 2015).

Миграсомы представляют собой внеклеточные везикулы более крупного размера (~500 нм) по сравнению с экзосомами, синтезируемыми теми же

клетками (рис. 10-А,Б), а также отличаются от них по белковому составу — молекулярными маркерами миграсом являются TSPN4 и интегрин $\alpha 5$ (Zhao et al., 2019). Непосредственный механизм биогенеза миграсом на данный момент изучен слабо, однако отсутствие в них LAMP1, одного из основных гликопротеинов лизосомальной мембраны, позволяет судить об отсутствии аналогии с биогенезом экзосом (рис. 10-В).

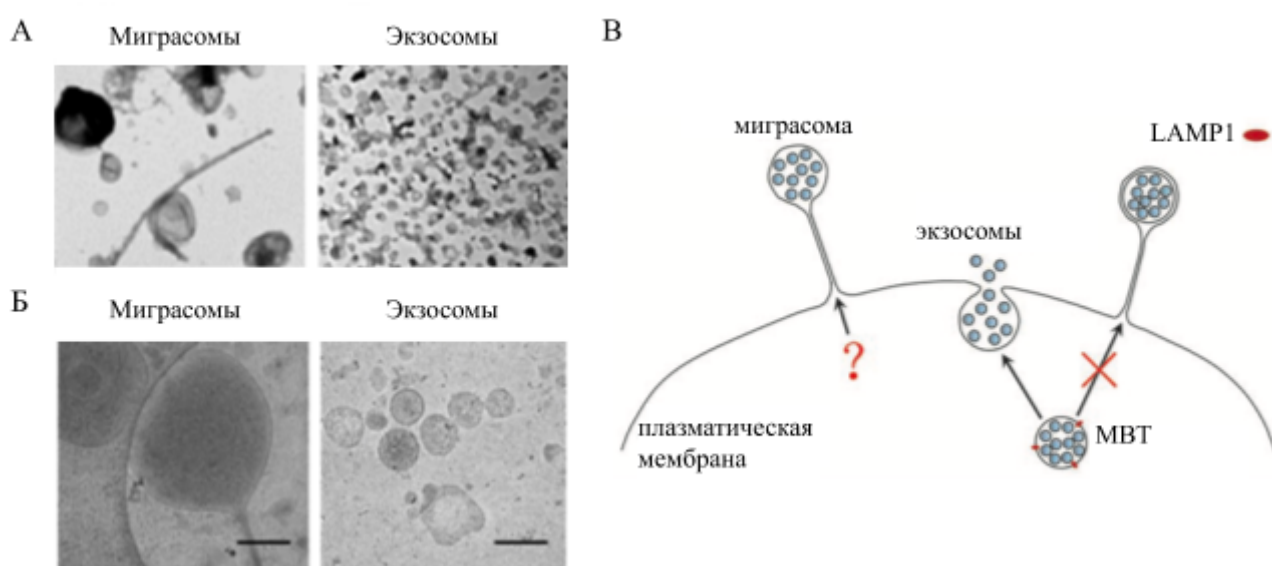


Рисунок 10. Сравнение миграсом и экзосом. (А) Трансмиссионная электронная микроскопия миграсом и экзосом, формируемых клетками линии NRK с гиперэкспрессией TSPN4-GFP, негативное контрастирование, масштабный отрезок 500 нм (Zhao et al., 2019); (Б) Криоэлектронная микроскопия миграсом и экзосом, формируемых клетками линии NRK с гиперэкспрессией TSPN4-GFP, линейка 200 нм (Zhao et al., 2019); (В) Иллюстрация биогенеза экзосом и миграсом (по Li et al., 2015).

Особый интерес в настоящее время представляет разнообразие переносимых внеклеточными везикулами веществ — липидные и белковые компоненты клеточных мембран, а также некоторые цитоплазматические белки и нуклеиновые кислоты (Hwang et al., 2013). Важным свойством, характерным для всех внеклеточных везикул, является посттранскрипционная регуляция экспрессии различных генов в поглощающих их клетках-реципиентах, основную роль в чем играют переносимые внеклеточными везикулами

микроРНК и регуляторные белки, способные инициировать запуск внутриклеточного сигналинга (Redzic et al., 2014). Продукция внеклеточных везикул выявляется для большинства клеток организма, и в зависимости от их типа, показана роль внеклеточных везикул в регуляции мобильности сперматозоидов, миелинизации отростков нервных клеток, минерализации внеклеточного матрикса, стимуляции ангиогенеза, подавлении апоптоза и обмене разнообразными рецепторами между клетками (Yuana et al., 2013). В настоящее время активно изучается роль внеклеточных везикул в патологических процессах. В частности, усиление их секреции наблюдается у опухолевых клеток, участие внеклеточных везикул показано в процессах подготовки премеастатической ниши и непосредственно метастазирования, а также индукции хемотаксиса и развития множественной лекарственной устойчивости (Zmigrodska et al., 2016).

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Выделение первичной культуры сосудистых клеток из легких мыши с флоксированным геном Т-кадгерина

В работе использовали 8-недельных мышей, с флоксированным геном Т-кадгерина — $Cdh13^{tm1.1Kry}$ (Columbia University, Kajimura et al., 2013), полученных с использованием Flp-FRT рекомбинации в результате инсерции loxP сайта перед экзоном 3 и FRT-фланкированной кассеты устойчивости к неомицину после него. В результате ткани мышей содержали ген Т-кадгерина, который мог быть выключен с использованием фермента Кре-рекомбиназы. Животные содержались в соответствии с Приложением А к Европейской конвенции о защите позвоночных животных используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) (ГОСТ 33216-2014).

Первичную культуру эндотелиальных клеток выделяли из легких 5 мышей в соответствии с протоколом (Sawaguchi et al., 2017), методом механической и ферментативной дезагрегации клеток с последующей магнитной сепарацией с использованием антител против CD31 мыши и магнитных бус для двухэтапной магнитной сепарации. Полученную фракцию клеток культивировали на чашках Петри покрытых коллагеном 1 типа в среде для эндотелиальных клеток EGM-2 (CC-4176, Lonza Cambrex), с добавлением ростовых факторов (SingleQuots® Kit, Cambrex). Для проведения эксперимента использовали клетки 2-3 пассажей.

2.2. Культивирование перевиваемых клеточных линий

В работе использовали следующие линии клеток: линия клеток карциномы шейки матки человека (HeLa), линия клеток нейробластомы мыши (Neuro2A).

Клетки HeLa культивировали в среде DMEM (среда Игла, модифицированная Дульбекко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (HyClone) и раствора антибиотика-антимикотика (HyClone).

Клетки Neuro2A культивировали в среде DMEM (среда Игла, модифицированная Дульбекко) с добавлением незаменимых аминокислот (MEM NAA, Gibco), 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (HyClone) и раствора антибиотика-антимикотика (HyClone).

Клетки всех типов пассировали, обрабатывая раствором Версена с последующей инкубацией в 0,25% растворе трипсина и 0,02% ЭДТА (Gibco) 10 минут при +37°C и 5% CO₂.

2.3. Индукция нейритогенеза клетками Neuro2A

Клетки высаживали в 24 луночные планшеты в концентрации 20 тыс/мл и культивировали в полной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотика и раствор незаменимых аминокислот. Для индукции нейритогенеза через 24 часа среду заменяли на DMEM с содержанием сыворотки 1% FBS. В контрольных лунках среду заменяли на полную.

Регистрацию производили методом прижизненной съемки в течение 72 часов или через 24, 48 и 72 часа с использованием инвертированного микроскопа Leica AF6000LX (Leica, Германия), оснащенного CO₂ камерой, системой поддержания температуры 37°C и цифровой камерой Leica DFC 350 FX (Leica, Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ (National Institute of Health). На 10 случайных полях зрения подсчитывали количество клеток, формирующих отростки длиной, более чем в два раза превышающей длину самих клеток. Также оценивали длину отростков.

2.4. Трансфекция клеток

Эукариотические клетки трансфицировали соответствующими плазмидами с устойчивостью к G418 (Gibco) и фрагментами кДНК:

- Клетки Hela трансфицировали плазмидной конструкцией CD63-GFP с устойчивостью к G418 для визуализации маркера внеклеточных везикул;
- Клетки Neuro2A трансфицировали плазмидными конструкциями TSPN4-GFP либо TSPN4-mCherry с устойчивостью к G418 для визуализации маркера миграсом;
- Клетки Neuro2A трансфицировали плазмидной конструкцией pcDNA3 T-cadherin⁺ с устойчивостью к G418 для гиперэкспрессии этого белка;
- Клетки Neuro2A трансфицировали плазмидной конструкцией shT-cadherin с устойчивостью к пурамицину для выключения экспрессии этого белка.

Клетки высаживали в 6 луночный и после достижения плотности 70-80% монослоя среду культивирования заменяли на среду Opti-MEM™ (Gibco) без сыворотки и антибиотика. Для трансфекции использовали трансфицирующий агент — Lipofectamine 2000™ (LF, Invitrogen). Сборку комплекса производили по протоколу производителя, из расчета на лунку 6 луночного культурального планшета. Полученный раствор ДНК-LF2000 капельно наносили на клетки, равномерно распределяя по всей лунке в 2 мл среды Opti-MEM™ (Gibco). Через 6 часов после трансфекции среду культивирования меняли на полную среду для культивирования.

2.5. Клонирование трансфицированных клеток и селекция клонов

По достижении трансфицированными клетками монослоя, их промывали раствором Версена для удаления сыворотки, затем 10 минут инкубировали в 0,25% растворе трипсина/0,02% ЭДТА (Gibco) и разбивали путем пипетирования. Последующая селекция клонов проводилась путем добавления в среду для культивирования селективного антибиотика G418 (Gibco) или пурамицина (Gibco). Концентрацию антибиотика подбирали экспериментально для каждого типа клеток так чтобы в контрольных клетках без трансфекции погибали все клетки.

2.6. Вестерн-блоттинг

Все процедуры проводили на льду. Из культуральных чашек Петри с растущими в них клетками после предварительного охлаждения на льду удаляли культуральную среду и промывали холодным буфером PBS 3 раза, после чего наносили лизирующий буфер (666 mM Tris-HCl; 4% SDS, pH 6.8) и пипетировали через иглу инсулинового шприца до гомогенности лизата.

Концентрацию белков в лизатах определяли при помощи Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Смешивали растворы А и Б в соотношении 1:50, затем на 1 мл смеси добавляли 5 мкл лизата белков и 30 минут инкубировали при +60°C. После этого проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 562 нм. После измерения на спектрофотометре (562 нм), определение количества белка в пробе осуществляли при помощи программы Sigma Plot, по калибровочному графику, составленному на основании стандарта БСА с концентрацией 1 - 8 мкг/мл (Pierce).

Полученные лизаты клеток смешивали с 4-х кратным буфером Лэммли, содержащим β-меркаптоэтанол, и инкубировали 10 минут при температуре +90°C. Разделение образцов проводили в SDS/ПААГ при денатурирующих

условиях. Плотность геля в экспериментах составляла 5% для концентрирующего и 7,5% для разделяющего при анализе Т-кадгерина; при анализе ERK/pERK — 5% для концентрирующего и 10% для разделяющего. Для идентификации молекулярных масс белков использовали коммерческую смесь лизатов окрашенных белков Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). После этого осуществляли электроблоттинг образцов с геля на LF PVDF мембрану (Immobilon, Millipore) в течение 120 минут при постоянной силе тока 300 мА. Для блокирования неспецифического связывания вторичных антител мембраны инкубировали в течение 20 минут в блокирующем буфере, содержащем 5% обезжиренное молоко, 0.1% детергента Tween20 в буфере PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ NaH₂PO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄, pH 7.4), а далее на мембраны последовательно наносили раствор первичных и вторичных антител с соответствующими промывками. Инкубацию с первичными антителами осуществляли overnight при +4°C, со вторичными антителами — в течение 1 часа при комнатной температуре.

Для проявления сигнала использовали SuperSignal™ West Chemiluminescent Substrate Pico/Dura. Флуоресценцию регистрировали с помощью прибора ChemiDoc (Bio-Rad), последующий анализ изображений проводился в программе Image Lab (Bio-Rad).

2.7. Иммунофлуоресцентное окрашивание на Т-кадгерин

Для оценки солокализации маркеров внеклеточных везикул и Т-кадгерина было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание клеток линий HeLa и Neuro2A. Клетки высаживали на покровные стекла и культивировали до достижения 70-80% монослоя. Далее клетки фиксировали 4% раствором нейтрального формалина на PBS в течение 10 минут, после чего отмывали от фиксатора и блокировали неспецифическое связывание 1% раствором БСА (Sigma-Aldrich) 30 минут на PBS. Клетки инкубировали в

растворе первых антител против Т-кадгерина (ProSci) 1 час при комнатной температуре. В качестве негативного контроля использовали кроличьи IgG (BD). После трехкратной отмывки PBS клетки окрашивали вторыми антителами, конъюгированными с AlexaFluor594 или AlexaFluor488 (Invitrogen), в зависимости от флуоресцентного красителя в трансфицируемой в клетку плазмиде. Для визуализации ядер препараты окрашивали красителем DAPI (Sigma-Aldrich) и после промывки в PBS заключали в Aqua POLY/MOUNT. Флуоресценцию DAPI и вторых антител детектировали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 и программного обеспечения ZEN 2010 (Zeiss) при помощи лазеров с длиной волны 405 , 488 и 594 нм соответственно, а также с использованием инвертированного микроскопа Leica DMI6000. Последующую обработку изображений проводили в программе ImageJ (National Institute of Health).

2.8. Проточная цитометрия внеклеточных везикул

Для оценки количества внеклеточных везикул, формируемых клетками нейробластомы мыши (Neuro2A) с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина, использовали проточный цитометр с визуализацией Amnis® ImageStreamX MKII. Клетки линии Neuro2A, трансфицированные плазмидами pcDNA3 T-cadherin⁺ и shT-cadherin, в течение суток культивировали в среде DMEM без добавления сыворотки, после чего среду отбирали, и методом проточной цитофлуориметрии проводили подсчет внеклеточных везикул, формируемых каждым из клонов.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Влияние Т-кадгерина и адипонектина на метаболизм сосудистых клеток мышцы

Нами была разработана модель для оценки изменения метаболизма сосудистых клеток с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина в ответ на действие адипонектина. В сосудистых клетках выделенных из легких мышей с флоксированным геном Т-кадгерина ($Cdh13^{tm1.1Kry}$) выключали экспрессию Т-кадгерина. Для этого часть эндотелиальных клеток, выделенных из легких флоксированных мышей обрабатывали 1 час ТАТ-Cre (Cre) 50 $\mu\text{g/ml}$ в среде без сыворотки и затем 100 μM chloroquine 30 минут. Через 6 часов среду заменяли на полную (был использован модифицированный протокол Liebner et al, 2008). В контрольных (необработанных) клетках экспрессия Т-кадгерина сохранялась. Затем экспериментальные и контрольные клетки рассаживали на лунки 6 луночного планшета. После достижения монослоя клетки депривировали 12 часов и в половину опытных и контрольных лунок добавляли адипонектин в концентрации 10 $\mu\text{g/ml}$. Через 10 минут клетки лизировали. Анализ методом иммуноблоттинга лизатов контрольных эндотелиальных клеток и клеток с выключенным геном Т-кадгерина показал, что при добавлении адипонектина к клеткам, экспрессирующим Т-кадгерин, запускается фосфорилирование ERK1/2 (*рис. 11*) в то время, как в клетках, где экспрессия Т-кадгерина была выключена, фосфорилирование ERK1/2 не увеличивается.

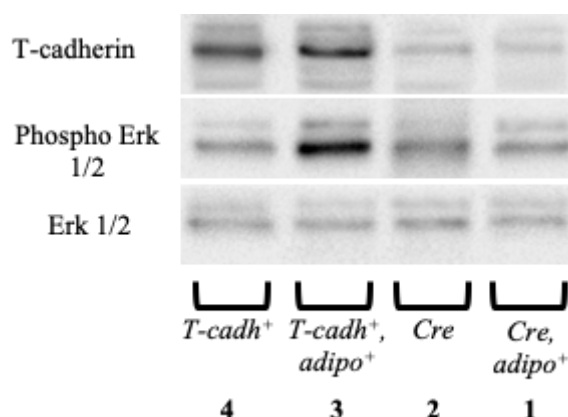


Рисунок 11. Вестерн-блоттинг лизатов эндотелиальных клеток из легких *Cdhl3^{tm1.1Kry}* мышей: (1) клетки после обработки *Cre* и добавления 10 $\mu\text{g/ml}$ адипонектина; (2) после обработки *Cre*; (3) после добавления 10 $\mu\text{g/ml}$ адипонектина; (4) контрольный образец.

Полученный результат подтверждает существующую гипотезу о роли Т-кадгерина, как одного из рецепторов адипонектина и свидетельствует о запуске одного из внутриклеточных MAPK-сигнальных путей, необходимого для выживания и пролиферации клеток. Роль MAPK/ERK-опосредованных механизмов в регуляции эндотелиально-мезенхимального перехода ранее была показана при критическом повышении уровня глюкозы в крови и при ремоделировании стенок сосудов в результате изменения структуры внеклеточного матрикса (Dahal et al., 2017; Yu et al., 2017). Пролиферативный эффект в ответ на связывание адипонектина с Т-кадгерином был показан также на примере фосфорилирования аденозинмонофосфат-зависимой протеинкиназы (AMPK), что предотвращало апоптоз клеток эндотелиальных клеток (Kobayashi et al., 2004). Разработанная модель будет использована для исследования изменения внутриклеточного метаболизма сосудистых клеток под действием адипонектина и роли в этом процессе Т-кадгерина.

3.2. Роль Т-кадгерина в биогенезе микровезикул.

Один из механизмов с помощью которых Т-кадгерин может изменять метаболическую активность эндотелиальных клеток могут быть разные классы

микровезикул. Недавно было обнаружено, что адипонектин усиливает биогенез и секрецию экзосом. Нами было изучено два типа внеклеточных везикул — внеклеточные везикулы, выполняющие функцию межклеточной коммуникации, и миграсомы, ассоциированные с матриксом и участвующие в навигации.

3.2.1. Т-кадгерин в процессах формирования внеклеточных везикул клетками карциномы шейки матки человека (HeLa)

В нашей лаборатории ранее были получены клоны опухолевых клеток эпителиального фенотипа (HeLa) с подавлением Т-кадгерина методом CRISPR CAS9. На основании результатов иммуноблоттинга (*рис. 12*), для дальнейшего анализа были отобраны два клон: P153.2 — как наиболее близкий к контрольным клеткам HeLa по уровню экспрессии Т-кадгерина, и S3#46 — как клон с наиболее успешным вырезанием Т-кадгерина.

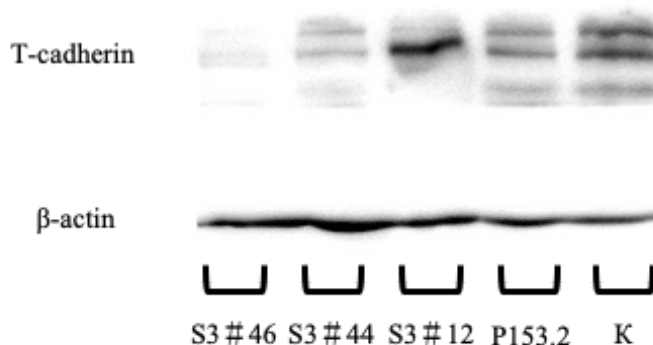


Рисунок 12. Вестерн-блоттинг лизатов клеток HeLa. S3#12, S3#44, S3#46, P153.2 — клоны клеток HeLa, полученные методом CRISPR CAS9; K — контрольный образец.

Отобранные клоны были трансфицированы плазмидой, содержащей помеченный GFP белком маркер экзосом CD63 для оценки возможности переноса Т-кадгерина при помощи формируемых клетками HeLa экзосом. Иммунофлуоресцентная окраска клеток HeLa антителами против Т-кадгерина не выявила колокализации в распределении Т-кадгерина и меченого зеленым белком GFP маркера экзосом CD63, ни в клонах с нормальным уровнем экспрессии Т-кадгерина (*рис. 13-А*), ни в клонах с подавлением экспрессии

этого белка (рис. 13-Б). Можно предположить, что в этом типе клеток Т-кадгерин не переносится с участием экзосом.

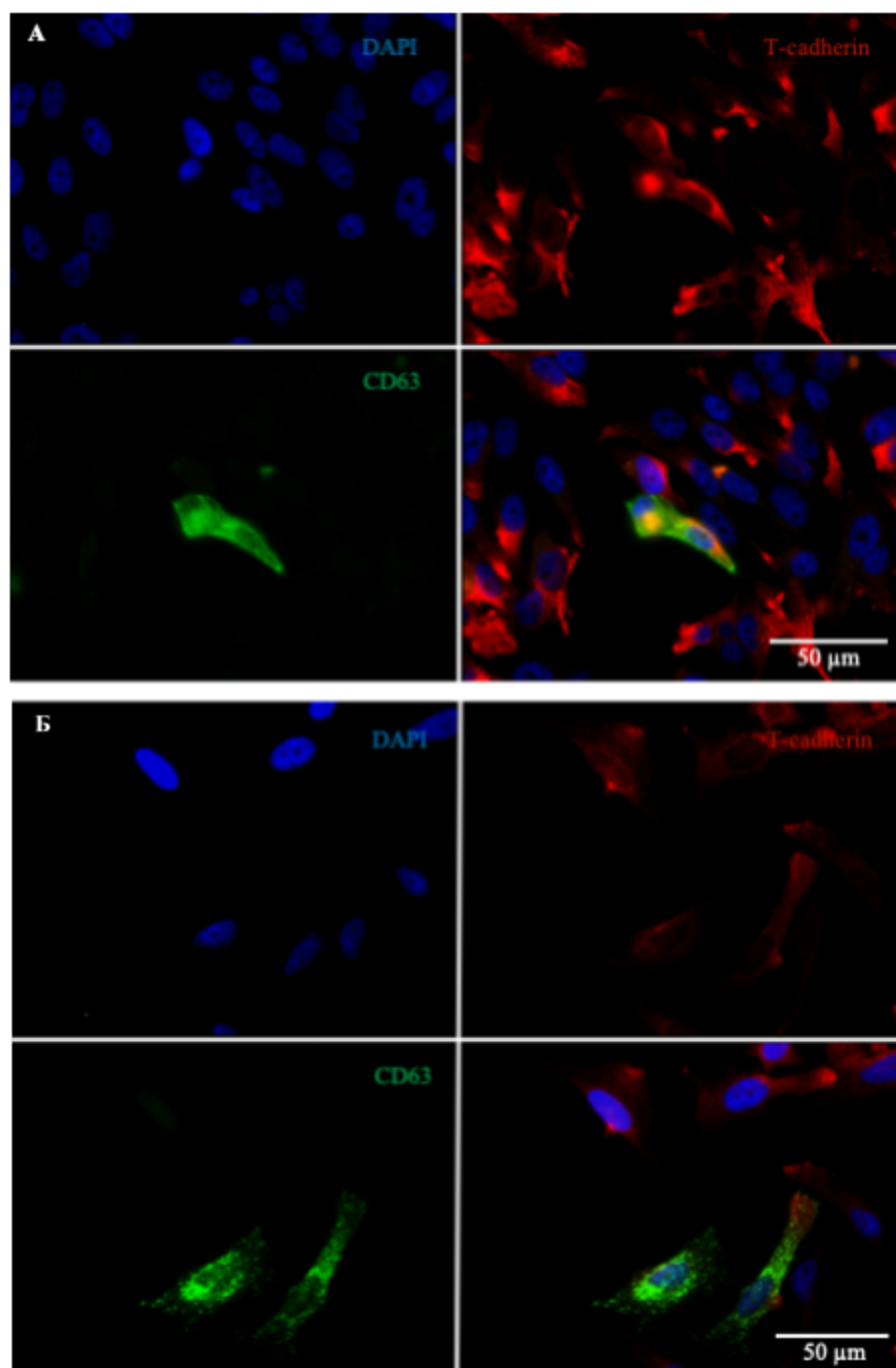


Рисунок 13. Иммунохимическое окрашивание Т-кадгерина (красная флуоресценция) в клетках культуры HeLa. (А) P153.2 — *T-cadherin*⁺; (Б) S3#46 — *T-cadherin*⁻. Часть клеток содержит плазмиду CD63 GFP (зеленая флуоресценция).

Поскольку при исследовании окраски клеток HeLa на Т-кадгерин была обнаружена кластеризация его распределения в цитоплазме и на поверхности мембраны, было проверено предположение о перераспределении Т-кадгерина на ведущий край клеточного пласта. Была использована модель “экспериментальной раны”. Однако на ведущем крае эпителиального пласта клеток линии HeLa не наблюдалось конститутивной локализации Т-кадгерина (рис. 14). Также можно отметить, что не все клетки в популяции контрольной линии HeLa позитивно окрашиваются на Т-кадгерин.

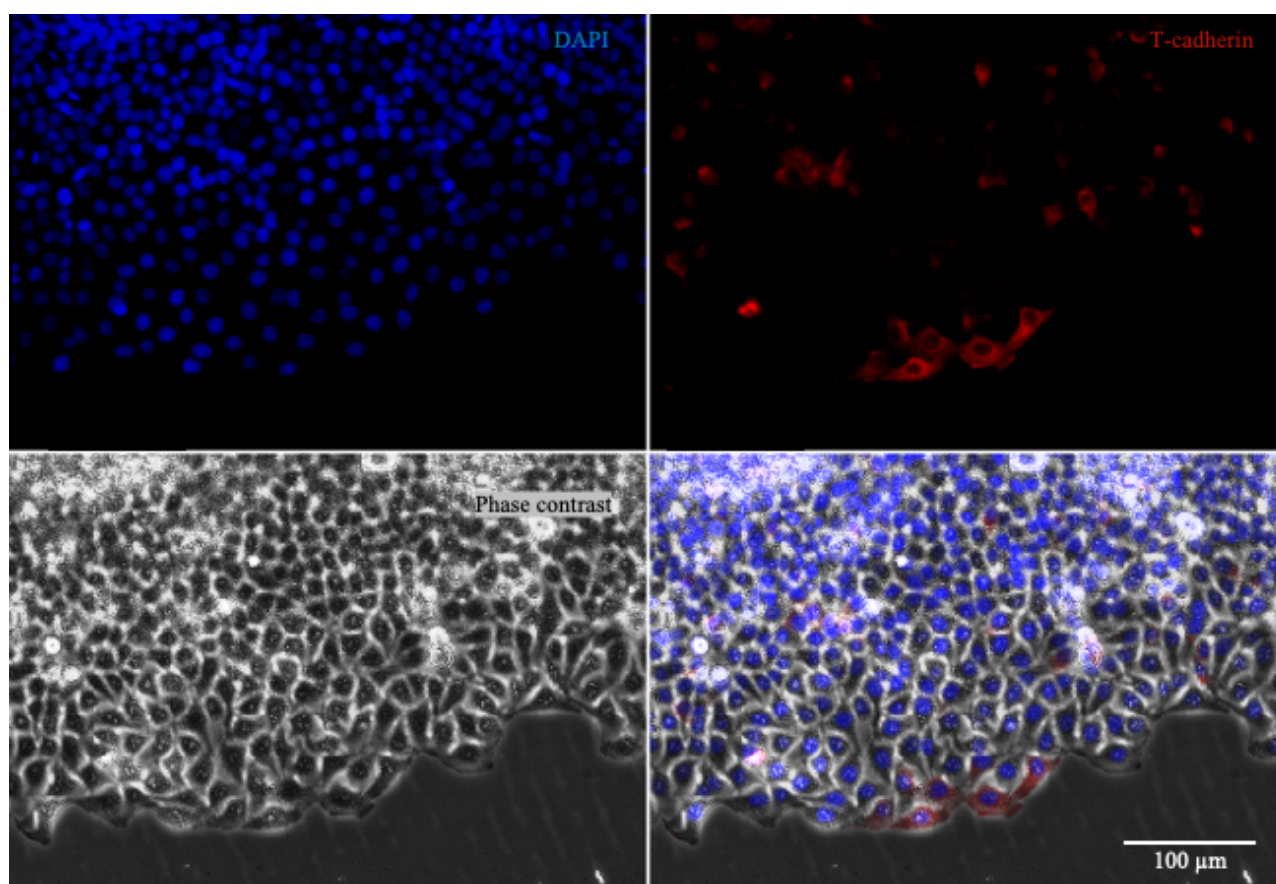


Рисунок 14. Иммунохимическое окрашивание Т-кадгерина (красная флуоресценция) в клетках культуры HeLa. Ядра окрашены красителем DAPI. Для визуализации клеточного пласта представлено фазово-контрастное изображение.

Данный результат может свидетельствовать о том, что в отличие от нервных и сосудистых клеток, для которых показана навигационная функция Т-кадгерина (Fredette et al., 1994; Philippova et al., 2005), он не участвует в

приобретении клетками эпителиальной опухолевой линии карциномы шейки матки HeLa промигранторного фенотипа и дальнейшей миграции в рану.

3.2.2. Участие Т-кадгерина в формировании внеклеточных везикул клетками нейробластомы мыши (Neuro2A)

Клетки мышинной нейробластомы Neuro2A с гиперэкспрессией Т-кадгерина и после подавления Т-кадгерина были трансфицированы плазмидной конструкцией, содержащей маркер миграсом TSPN4, помеченный флуоресцентными белками GFP или mCherry. При обычных условиях клетки данной культуры имеют амебоидную морфологию иногда с небольшими отростками. Т-кадгерин и TSPN4 распределены диффузно без какой-либо выраженной компартментализации (рис. 15).

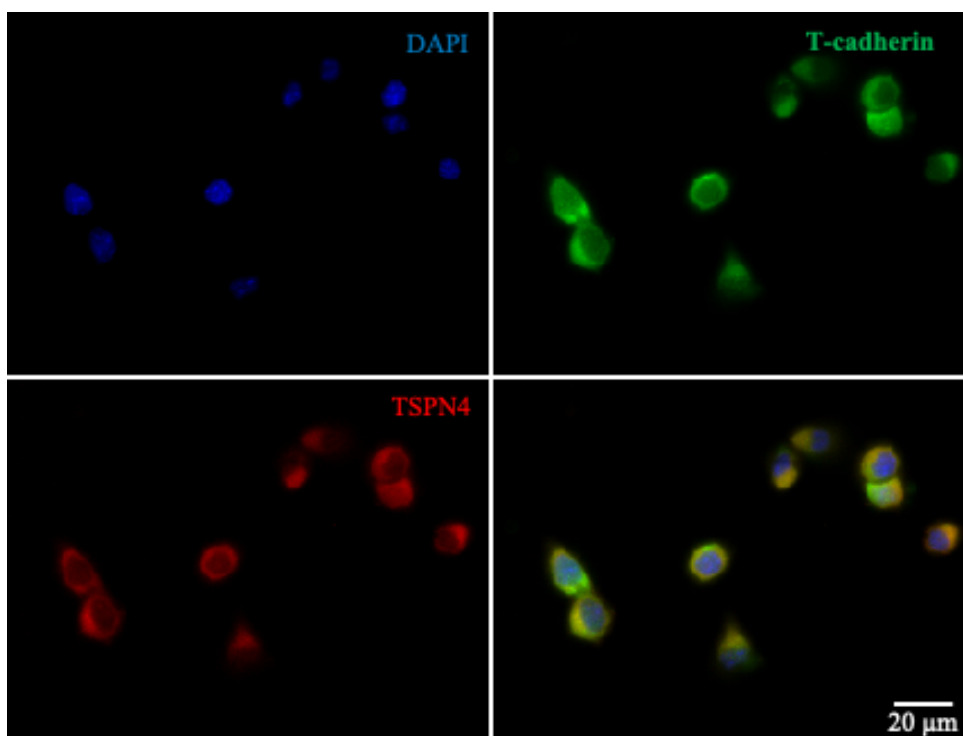


Рисунок 15. Иммунохимическое окрашивание Т-кадгерина (зеленая флуоресценция) в клетках культуры Neuro2A. Клетки экспрессирующие конструкцию TSPN4-mCherry флуоресцируют в красном канале.

Последующая индукция нейритогенеза в клетках Neuro2A для изучения изменения внутриклеточной локализации Т-кадгерина показала закономерное

увеличение длины отростков (рис. 16-18). Поскольку Т-кадгерин был впервые описан как белок-навигатор клеток нервной ткани (Fredette et al., 1994), мы ожидали увидеть перераспределение данного белка при формировании нейритов. Вместе с тем мы ожидали увидеть перераспределение маркера миграсом TSPN4 и таким образом получить подтверждение первоначального предположения, что навигационная функция Т-кадгерина может быть связана с его участием в формировании миграсом.

Через 24 часа после запуска нейритогенеза клетки приобретают нейрональную морфологию, Т-кадгерин локализуется в теле клетки и формирующихся отростках, в то время как TSPN4 выявляется только в центральной части клетки (рис. 16).

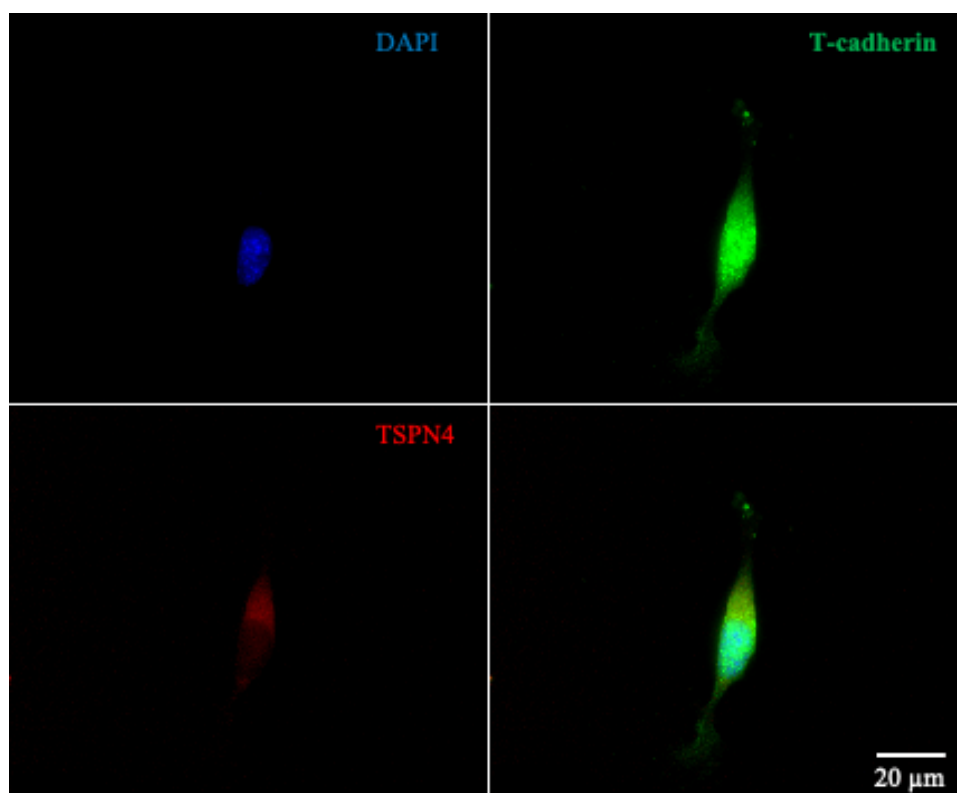


Рисунок 16. Иммунохимическое окрашивание Т-кадгерина (зеленая флуоресценция) в клетках культуры Neuro2A. Клетки экспрессирующие конструкцию TSPN4-mCherry флуоресцируют в красном канале. 24 часа после стимуляции нейритогенеза.

Подобная локализация Т-кадгерина, по всей видимости, объясняется участием этого белка в регуляции роста нейритов клеток нейробластомы, а

отсутствие в отростках TSPN4 может говорить о том, что на данном этапе биогенеза миграсом не происходит, и он не колокализован с Т-кадгерином в нейритах.

Через 48 часов после индукции нейритогенеза наблюдается увеличение длины формируемых клетками нейритов. Т-кадгерин сохраняет свою локализацию в нейритах и цитоплазме клеток, в то время как TSPN4 также начинает обнаруживаться не только в телах нервных клеток, но и в их отростках (рис. 17).

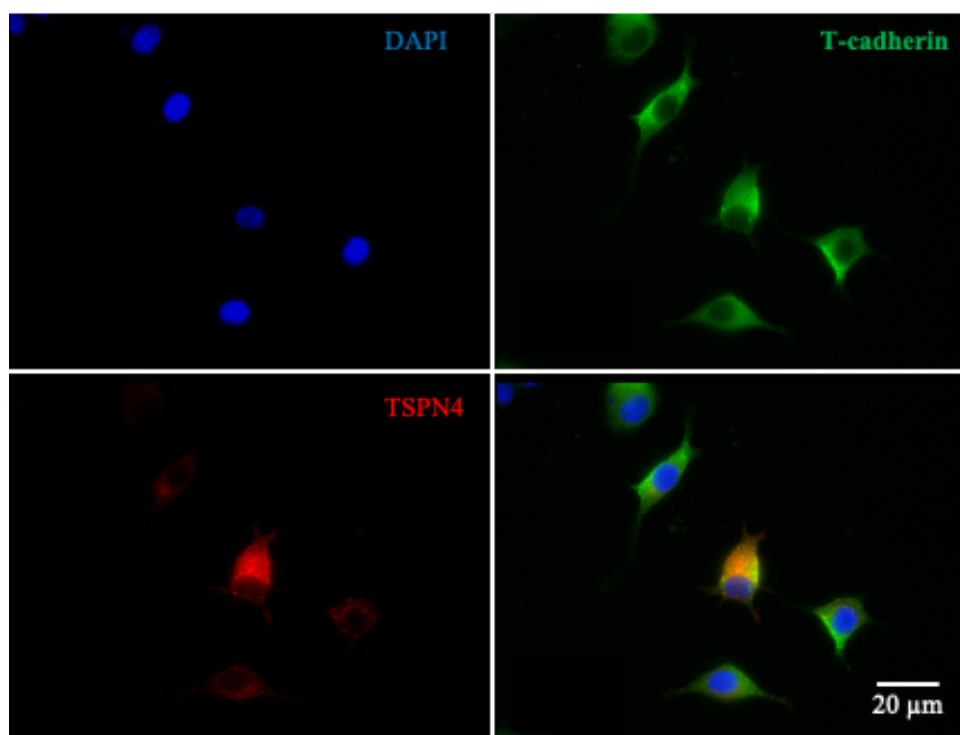


Рисунок 17. Иммунохимическое окрашивание Т-кадгерина (зеленая флуоресценция) в клетках культуры *Neuro2A*. Клетки экспрессирующие конструкцию *TSPN4-mCherry* флуоресцируют в красном канале. 48 часов после стимуляции нейритогенеза.

Визуализация TSPN4 в отростках некоторых клеток может являться признаком его участия в регуляции роста нейритов на более поздних этапах, например при навигации на ведущем крае нейрита (Zhao et al., 2019, Рубина и др. 2018).

На самой поздней исследуемой стадии нейритогенеза, через 72 часа после индукции, наблюдается формирование большого числа нейритов, значительно превышающих длину формирующих их клеток. Т-кадгерин визуализируется преимущественно в телах нервных клеток, в то время как TSPN4, наоборот, локализуется и в теле, и в формируемых клетками нейритах (рис. 18).

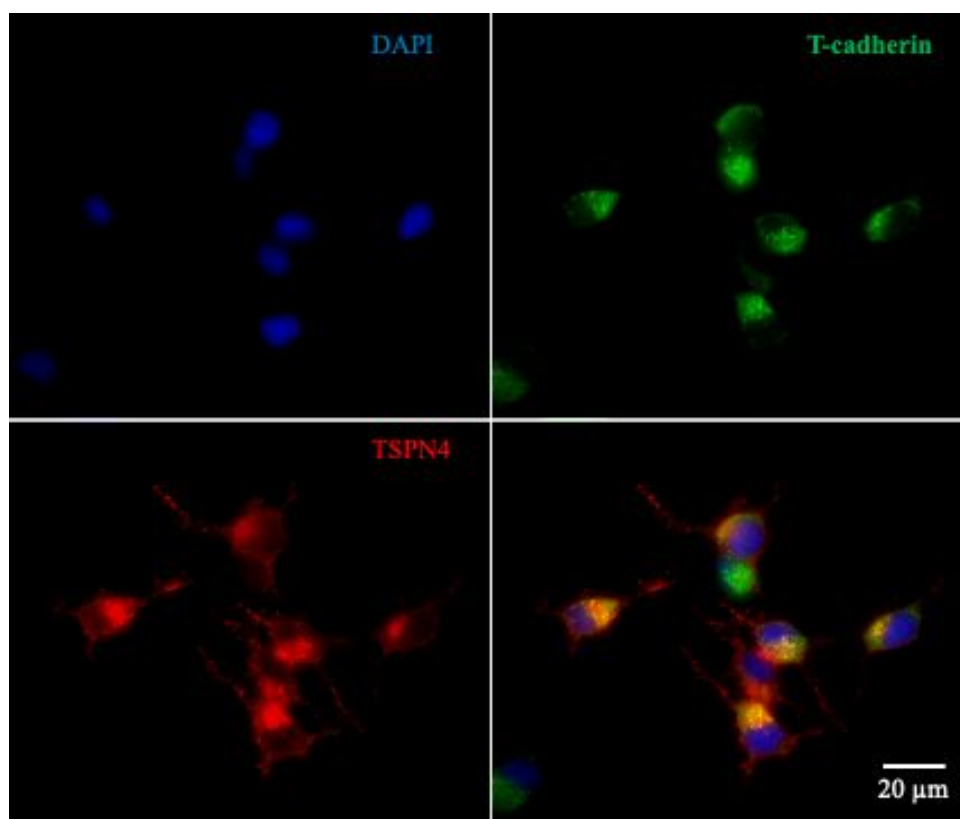


Рисунок 18. Иммунохимическое окрашивание Т-кадгерина (зеленая флуоресценция) в клетках культуры Neuro2A. Клетки экспрессирующие конструкцию TSPN4-mCherry флуоресцируют в красном канале. 72 часа после стимуляции нейритогенеза.

Отсутствие локализации Т-кадгерина в отростках клеток линии Neuro2A на данном этапе может свидетельствовать об отсутствии необходимости в навигации на столь поздних стадиях их нейритогенеза, когда длинные отростки, сформированные клетками, находятся в непосредственной близости друг от друга. Обнаружение TSPN4 в нейритах практически всех клеток, вероятно, говорит об активных процессах формирования миграсом, что

подтверждается обнаружением TSPN4⁺ внеклеточных везикул вокруг дифференцирующихся клеток (*рис. 19-А*).

Тем не менее, двойное окрашивание ни на одном из наблюдаемых сроков после стимуляции нейритогенеза не выявило колокализации TSPN4 и Т-кадгерина — ни в нейритах, ни во внеклеточных везикулах. На верхней панели экспрессия Т-кадгерина наблюдается в одном из нейритов, а флуоресцирующая конструкция TSPN4 GFP хорошо видна во всех остальных нейритах этой же клетки (*рис. 19-А*). На нижней панели две клетки в центре содержат конструкцию TSPN4 mCherry в длинных отростках, напоминающих аксоны, но в этих отростках нет окрашивания антителами на Т-кадгерин (*рис. 19-Б*)

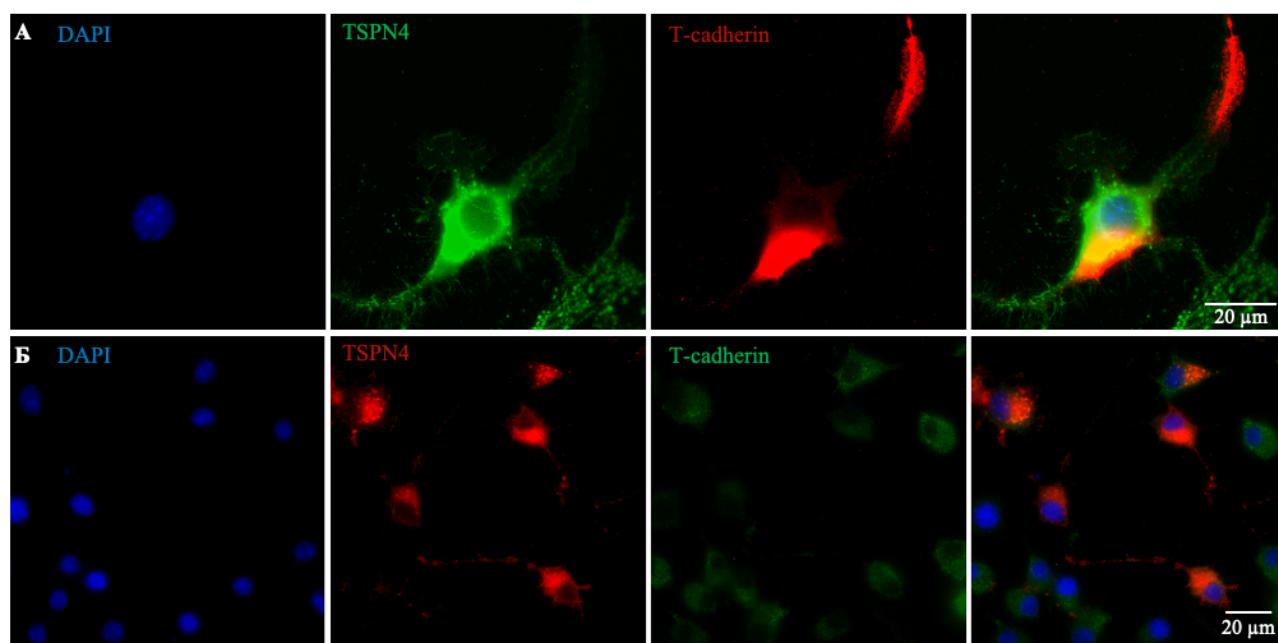


Рисунок 19. Иммунохимическое окрашивание Т-кадгерина в клетках культуры Neuro2А. (А) Трансфекция плазмидой TSPN4-GFP, Т-кадгерин (красное окрашивание) ; (Б) Трансфекция плазмидой TSPN4-mCherry , Т-кадгерин(зеленое окрашивание).

3.2.3. Влияние Т-кадгерина на формирование отростков клетками мышинной нейробластомы

При работе с клонами клеток линии Neuro2A была отмечена качественная разница в формировании нейритов в ходе индуцированного нейритогенеза, и мы проверили, как разный уровень экспрессии Т-кадгерина в этих клетках влияет на число и длину нейритов. Для этого были получены два клона — с подавлением и гиперэкспрессией этого белка (*рис. 20*).

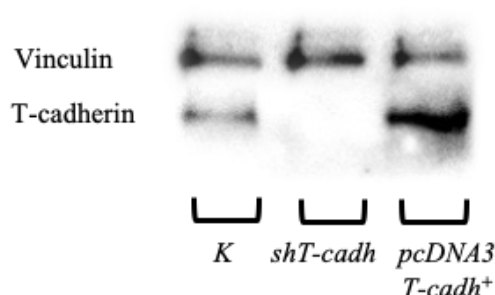


Рисунок 20. Вестерн-блоттинг лизатов клеток Neuro2A. K — контрольный образец; shT-cadh — клон с подавлением экспрессии Т-кадгерина; pcDNA3 T-cadh⁺ — клон с гиперэкспрессией Т-кадгерина.

Учитывая, что роль Т-кадгерина была впервые показана при прорастании нейронов (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991), ожидалось увидеть определенные различия в длине и числе нейритов в клетках мышинной нейробластомы с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина. При подсчете оценивалось количество клеток, начинающих формировать нейриты (отростки в 2 раза превышающие диаметр тела клетки). Нами было показано, что подавление экспрессии Т-кадгерина увеличивает долю клеток, формирующих отростки при индукции нейритогенеза (*рис. 21*).

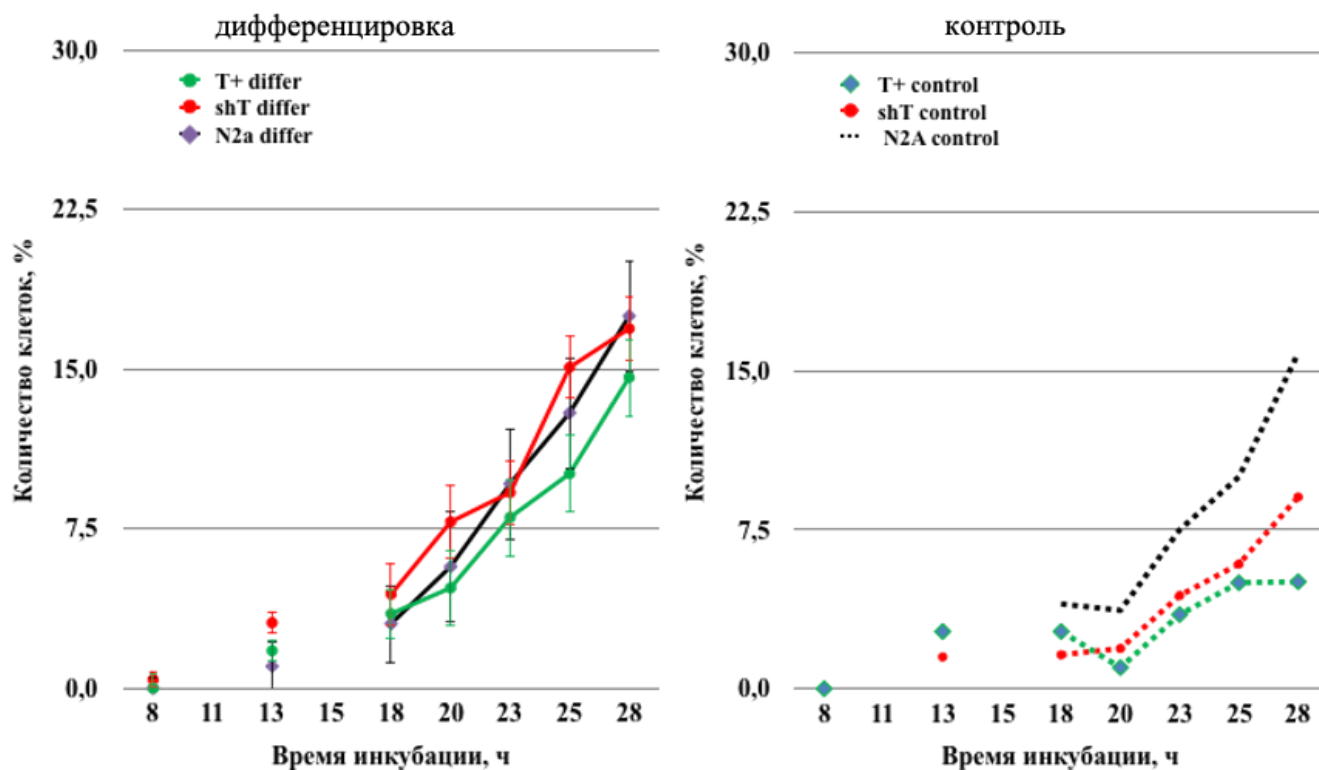


Рисунок 21. Статистическая обработка данных, полученных в ходе прижизненного наблюдения формирования нейритов клетками линии Neuro2A с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина в ходе индуцированного нейритогенеза (дифференцировки). T^+ — клетки с гиперэкспрессией Т-кадгерина; shT — клетки с подавлением Т-кадгерина; N2A — контрольные клетки.

Обнаружено, что подавление экспрессии Т-кадгерина увеличивает долю клеток, формирующих нейриты в ходе индукции нейритогенеза клеток нейробластомы. Это соответствует гипотезе о роли Т-кадгерина как навигатора при миграции клеток нейрального происхождения, однако, вероятно, данный белок не передается между клетками посредством формируемых клетками Neuro2A везикул, и навигационные свойства миграсом опосредованы иными ее компонентами.

Полученные данные также могут свидетельствовать о роли Т-кадгерина в качестве регулятора способности клеток нейробластомы к метастазированию. Аналогичный эффект был показан ранее, на клетках нейробластомы человека, где гиперэкспрессия данного белка подавляла инвазию опухолевых клеток и

снижала их пролиферативную способность при добавлении EGF (Takeuchi et al., 2000).

Вместе с тем обнаружено, что подавление экспрессии Т-кадгерина увеличивает долю клеток, формирующих нейриты в ходе дифференцировки клеток нейробластомы, что подтверждает ранее выдвинутую гипотезу о роли Т-кадгерина в навигации сосудов и нервов (Fredette et al., 1994; Philippova et al., 2005). Интересно, что для эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) была показана обратная связь — гиперэкспрессия Т-кадгерина стимулировала миграцию клеток из сосудистой стенки (Philippova et al., 2005), что может определяться различиями в регуляции процессов миграции в зависимости от типа клеток и условий наблюдения.

3.2.4. Оценка влияния экспрессии Т-кадгерина на биогенез микровезикул

Трансфицированные клоны с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина нарастили на среде содержащей селективный антибиотик и рассадили в одинаковой концентрации на чашки Петри диаметром 10 см. После достижения монослоя клетки трижды промывали раствором Хэнкса и затем инкубировали в среде DMEM без сыворотки и фенолового красного двое суток.

Среду собирали, фильтровали и центрифугировали для удаления дебриса. Последующий анализ полученных образцов методом проточной цитометрии с визуализацией (AMNIS) показал шестикратное увеличение числа везикул в среде культивирования клеток нейробластомы с гиперэкспрессией Т-кадгерина по сравнению с контролем (*рис. 22*).

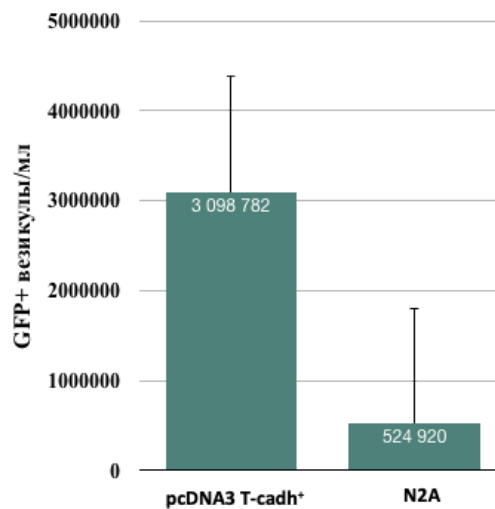


Рисунок 22. Статистическая обработка данных, полученных в результате проточной цитометрии с визуализацией (AMNIS) внеклеточных везикул в среде культивирования клеток линии Neuro2A с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина.

Можно предположить, что усиление формирования внеклеточных везикул, индуцированное повышенной экспрессией Т-кадгерина, является необходимым механизмом для регуляции дифференцировки и активности соседних клеток в случае изменений внешних условий и/или развития патологических процессов, например, атеросклероза. Вероятно, что подобный механизм может быть задействован для регуляции метаболизма клеток стенки сосудов. Так, существуют данные о влиянии адипонектина на продукцию экзосом гладкомышечными клетками, экспрессирующими Т-кадгерин (Kita et al., 2019).

Таким образом обнаружено, что Т-кадгерин влияет на продукцию клетками везикул, однако не обнаружена колокализация Т-кадгерина ни с одним из исследованных маркеров везикул.

Заключение

В данной работе были получены данные об участии Т-кадгерина и его лиганда адипонектина в регуляции метаболизма сосудистых клеток, а также влиянии Т-кадгерина на межклеточный транспорт веществ, осуществляемый посредством формирования внеклеточных везикул.

Поскольку существуют данные о том, что функции эндотелия нарушаются раньше, чем становится возможным зафиксировать клинические и морфологические атеросклеротические проявления в сосудистых стенках, изучение механизмов регуляции метаболизма эндотелиальных клеток является перспективной темой для разработки методов профилактики и лечения атеросклероза. Разработанная нами модель исследования метаболизма эндотелиальных клеток с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина в ответ на действие гормона жировой ткани адипонектина позволила показать ингибирование фосфорилирования ERK1/2 в случае подавления экспрессии Т-кадгерина клетками. Запуск MAPK/ERK-сигнального пути, по всей видимости, помимо стимуляции клеточной пролиферации, может инициировать транскрипцию белков, специфичных для мезенхимальных клеток (α -SMA, виментин, FSP-1) и подавление экспрессии эндотелиальных белков (CD31/PECAM-1, VE-кадгерин), что является важной частью эндотелиально-мезенхимального перехода (Piera-Velazquez and Jimenez, 2019). Именно эти маркеры мы планируем проверить на следующем этапе настоящей работы.

Регуляция клеточного метаболизма может осуществляться при помощи внеклеточных везикул, и данный способ регуляции показан для многих клеток как при физиологических условиях, так и при развитии большого числа заболеваний, в том числе сердечно-сосудистой системы и опухолевой прогрессии. Поскольку внеклеточные везикулы переносят ассоциированные с

мембраной сигнальные белки и рецепторы от одних клеток к другим, и служат для регуляции клеточной активности и перепрограммирования их микроокружения, нами было высказано предположение о возможности переноса подобным образом Т-кадгерина, как одной из важных сигнальных и навигационных молекул, экспрессируемых клетками в разной степени. Однако на исследуемых нами моделях опухолевых клеток, секретирующих внеклеточные везикулы, колокализации Т-кадгерина и маркеров внеклеточных везикул обнаружено не было. Тем не менее, нами были получены данные об активации процесса нейритогенеза при подавлении экспрессии Т-кадгерина и усилении продукции везикул клетками линии Neuro2A при гиперэкспрессии Т-кадгерина, что указывает на вовлеченность этого белка в регуляцию механизма биогенеза внеклеточных везикул. Подобное влияние было показано и для экспрессирующих Т-кадгерин клеток миокарда и сосудистой стенки — наличие данного рецептора стимулирует повышение уровня продукции экзосом в ответ на взаимодействие с адипонектином (Kita et al., 2019).

Полученные результаты свидетельствуют о роли Т-кадгерина как важной сигнальной молекулы, регулирующей запуск внутриклеточных каскадов в результате взаимодействия со своим лигандом — адипонектином, а также о способности Т-кадгерина опосредовать внеклеточный сигналинг путем стимуляции биогенеза внеклеточных везикул.

Выводы

1. Выключение экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках из легких мышей препятствует фосфорилированию ERK1/2, которое запускается в норме при добавлении адипонектина.
2. Подавление экспрессии Т-кадгерина в клетках нейробластомы мыши вызывает увеличение доли клеток, формирующих нейриты при индуцированном нейритогенезе.
3. Гиперэкспрессия Т-кадгерина в шесть раз увеличивает продукцию везикул клетками линии Neuro2A.

Благодарности

Автор выражает благодарность Рубиной Ксении Андреевне и Сысоевой Веронике Юрьевне за руководство исследовательской работой, а также Карагяуру Максиму Николаевичу, Кулебякину Константину Юрьевичу и Калининой Наталье Игоревне за помощь в проведении экспериментов.

Список литературы

1. Рубина К.А., Ткачук В.А. Молекулярные и клеточные механизмы физиологического и опухолевого роста кровеносных сосудов. // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова, издательство Наука (СПб.). – 2017. – № 2. – С. 121-137.
2. Рубина К.А., Семина Е.В., Балацкая М.Н., Плеханова О.С., Ткачук В.А. Механизмы регуляции направленного роста нервов и сосудов компонентами фибринолитической системы и GPI-заякоренными навигационными рецепторами. // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2018. – Т. 104. – № 9. – С. 1001–1026.
3. Al-Nedawi K., Meehan B., Micallef J., et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. // Nat. Cell Biol. – 2008. – V. 10. – P. 619–624.
4. Andreeva A.V. and Kutuzov M.A. Cadherin 13 in cancer. // Genes, Chromosomes and Cancer. – 2010. – V.49. – No 9. – P. 775-790.
5. Andreeva A.V., Kutuzov M.A., Tkachuk V.A., Voyno-Yasenetskaya T.A. T-cadherin is located in the nucleus and centrosomes in endothelial cells. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2009. – V. 297. – P. 1168–1177.
6. Angst B., Marozzi C., Magee A. The cadherin superfamily: diversity in form and function. // Journal of cell science. – 2001. – Vol. 114. – No 4. – P. 629-641.
7. Baietti M.F., Zhang Z., Zimmermann P., et al. Syndecan-syntenin- ALIX regulates the biogenesis of exosomes // Nature cell biology. – 2012. – V. 14. – No 7. – P. 677-685.
8. Balatskaya M.N., Sharonov G.V., Tkachuk V.A., et al. Different spatiotemporal organization of GPI-anchored T-cadherin in response to low-density lipoprotein and adiponectin. // Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. – 2019. – V.1863. – No 11.
9. Bentzon J.F., Otsuka F., Virmani R., Falk E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. // Circulation Research. – 2014. – V.114. – No 12. – P. 1852–1866.
10. Blashuk O.W., Rowlands T.M. Cadherins as modulators of angiogenesis and structural integrity of blood vessels. // Cancer and Metastasis Reviews. – 2000. – No 9. – P. 1-5.
11. Block L., Knorr M., Vogt E., et al. Low density lipoprotein causes general cellular activation with increased phosphatidylinositol turnover and lipoprotein catabolism. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – V. 85. – No 3. – P. 885-889.
12. Bochkov V.N., Tkachuk V.A., Resink T.J., et al. Concerted effects of lipoproteins and angiotensin II on signal transduction processes in vascular smooth muscle cells. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 1993. – V. 13. – No 9. – P. 1261-1269.

13. Bochkov V.N., Tkachuk V.A., Resink T.J. et al. Ligand selectivity of 105 kDa and 130 kDa lipoprotein-binding proteins in vascular-smooth-muscle-cell membranes is unique // *Biochem J.* – 1996. – V. 317. – Pt. 1. – P. 297 - 304.
14. Buschow S.I., Liefhebber J.M., Wubbolts R., Stoorvogel W. Exosomes contain ubiquitinated proteins // *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* – 2005. – V. 35. – No 3. – P. 398- 403.
15. Caruso S. and Poon I. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. // *Frontiers in immunology.* – 2018. – V. 9. – P. 1486.
16. Chen P.Y., Qin L., Baeyens N., et al. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression // *J Clin Invest.* – 2015. – V. 125. – No 12. – P. 4514 - 4528.
17. Cheng X., Folco E.J., Shimizu K., Libby P. Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4+ T-cells // *J Biol Chem.* – 2012 – V. 287. – No 44. – P. 36896-36904.
18. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more // *Trends in cell biology.* – 2009. – V. 19. – No 2. – P. 43-51.
19. Crewe C., Joffin N., Scherer P.E., et al. An Endothelial-to-adipocyte extracellular vesicle axis governed by metabolic state. // *Cell.* – 2018. – V. 175. – No 3. – P. 695–708.
20. Dahal S., Huang P., Murray B.T., Mahler G.J. Endothelial to mesenchymal transformation is induced by altered extracellular matrix in aortic valve endothelial cells. // *J Biomed Mater Res A.* – 2017. – V. 105. – P. 2729–2741.
21. Deatherage B.L. and Cookson B.T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. // *Infect. Immun.* – 2012. – V. 80. – P. 1948–1957.
22. Denzel M.S., Scimia M.C., Ranscht B., et al. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice // *J Clin Invest* – 2010. – V. 120. – No 12. – P. 4342-4352.
23. Fredette B.J., Ranscht B. T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway // *J Neurosci.* – 1994. – V. 14. – No 12. – P. 7331-46.
24. Fujishima Y., Maeda N., Shimomura I., et al. Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis // *FASEB Journal.* – 2017. – V. 31. – No 4. – P. 1571-1583.
25. George S., Beeching C. Cadherin: catenin complex: a novel regulator of vascular smooth muscle cell behaviour. // *Atherosclerosis.* – 2006. – Vol. 188. – No 1. – P. 1-11.
26. Goldstein J., Brown M., Schneider W., et al. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. // *Annual review of cell biology.* – 1985. – V. 1. – No 1. – P. 1-39.
27. Gonzalez E. and Falcon-Perez J. Cell-derived extracellular vesicles as a platform to identify low-invasive disease biomarkers. // *Expert review of molecular diagnostics.* – 2015. – V. 15. – P. 1-17.

28. Honda H., Wakamatsu B., Weiss J., et al. High-density lipoprotein increases intracellular calcium levels by releasing calcium from internal stores in human endothelial cells. // *Atherosclerosis*. – 1999. – V. 143. – No 2. – P. 299-306.
29. Hug C., Wang J., Lodish H.F., et al. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2004. – V. 10. – No 28. – P. 10308-13.
30. Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J. M. Membrane microparticles: two sides of the coin // *Physiology*. – 2005. – V. 20. – No 1. – P. 22-27.
31. Hwang I. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. // *Mol Cells*. – 2013. – V. 36. – P. 105–11.
32. Ivanov, D., Philippova, M., Resink, T., et al. T-cadherin upregulation correlates with cell-cycle progression and promotes proliferation of vascular cells. // *Cardiovasc. Res*. – 2004. – V. 64. – P. 132–143.
33. Ivanov D., Philippova M., Tkachuk V., et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature // *Histochem Cell Biol*. – 2001. – V. 115. – No 3. – P. 231-242.
34. Joshi M., Philippova M., Resink T. et al. T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. // *The FASEB journal*. – 2005. – V. 19. – No 12. – P. 1737-1739.
35. Kajimura D., Lee H.W., Karsenty G., et al. Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1. // *Cell Metab*. – 2013. – V. 17. – No 6. – P. 901-15.
36. Kinoshita T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*. – 2014. – V. 90. – P. 130–143.
37. Kita S, Maeda N, Shimomura I. Interorgan communication by exosomes, adipose tissue, and adiponectin in metabolic syndrome. // *J Clin Invest*. – 2019. – V. 129. – No 10. – P. 4041–4049.
38. Kobayashi T., Beuchat M.H., Gruenberg J., et al. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport // *Nature cell biology*. – 1999. – V. 1. – No 2. – P. 113-118.
39. Kobashi C., Urakaze M., Kishida M., et al. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8 // *Circ Res*. – 2005. – V. 97. – No 12. – P. 1245-1252.
40. Kobayashi H., Ouchi N., Matsuzawa Y., et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin // *Circ Res*. – 2004. – T. 94. – No 4. – P. 27-31.
41. Kojima S., Funahashi T., Ogawa, H. et al. The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction // *Heart*. – 2003. – V. 89. – No 6. – P. 667.
42. Lässer C., Alikhani V.S., et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. // *J Transl Med*. – 2011. – V. 9. – No 9.

43. Lawson C., Vicencio J.M., Yellon, D.M., Davidson, S.M. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. // *Journal of Endocrinology*. – 2016. – V. 228. – No 2. – P. R57–R71.
44. Lee M.H., Klein R.L., Luttrell L.M., et al. The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth // *Biochemistry*. – 2008. – V. 47. – No 44. – P. 11682-92.
45. Liebner S., Corada M., Bangsow T., et al. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. // *J Cell Biol*. – 2008. – V. 183. – No 3. – P. 409 - 417.
46. Ma, L., Li, Y., Peng, J. et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration// *Cell Res*. – 2015. – V. 25. – P. 24–38.
47. Matsumura T., Sakai M., Kobori S., et al. Two intracellular signaling pathways for activation of protein kinase C are involved in oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage growth. // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 1997. – V. 17. – No 11. – P. 3013- 3020.
48. Mizrak A., Bolukbasi M.F., Saydam O., et al. Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth // *Molecular Therapy*. – 2013. – V. 21. – No 1. – P. 101-108.
49. Muralidharan-Chari V., Clancy J., D'Souza-Schorey C., et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles // *Current Biology*. – 2009. – V. 19. – No 22. – P. 1875-1885.
50. Nabhan J.F., Hu R., Lu Q., et al. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109. – No 11. – P. 4146-4151.
51. Nagar B., Overduin M., Ikura M., Rini J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization // *Nature*. – 1996. – V. 380. – No 6572. – P. 360-4.
52. Niermann T., Kern F., Erne P., Resink T. The glycosyl phosphatidylinositol anchor of human T-cadherin binds lipoproteins // *Biochem Biophys Res Commun* – 2000. – V. 276. – No 3. – P. 1240-7.
53. Odorizzi, G. The multiple personalities of Alix // *Journal of cell science*. – 2006. – V. 119. – No 15. – P. 3025-3032.
54. Ostrowski M., Carmo N.B., Goud B., et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway // *Nature cell biology*. – 2010. – V. 12. – No 1. – P. 19-30.
55. Pajvani U.B., Du X., Scherer P.E., et al. Structure-function studies of the adipocyte- secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity // *J Biol Chem*. – 2003. – V. 278, No 11. – P. 9073-85.
56. Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor // *Cell*. — *Cell Press*. – 1983. — V. 33. – No 3. — P. 967—978.

57. Parker-Duffen J.L., Nakamura K., Walsh K., et al. T-cadherin Is Essential for Adiponectin- mediated Revascularization // *J Biol Chem.* – 2013. – V. 288. – No 34. – P. 24886- 24897.
58. Philippova M.P., Joshi M.B., Resink T.J., et al. A guide and guard: The many faces of T-cadherin. // *Cell signal.* – 2009. – V. 21. – P. 1035-1044.
59. Philippova M.P., Bochkov V.N., Stambolsky D.V., Tkachuk V.A., Resink T.J. T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domains of vascular smooth muscle cells // *FEBS Lett.* – 1998. – V. 429. – No 2. – P. 207-10.
60. Piera-Velazquez S., Jimenez S.A. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. // *Physiological Reviews.* – 2019. – V. 99. – No 2. – P. 1281–1324.
61. Piper R.C., Katzmann D.J. Biogenesis and function of multivesicular bodies // *Annual review of cell and developmental biology.* – 2007. – V. 23. – P. 519-547.
62. Pols M.S., Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 // *Experimental cell research.* – 2009. – V. 315. – No 9. – P. 1584-1592.
63. Ranscht B. Cadherins and catenins: Interactions and functions in embryonic development. // *Curr Opin Cell Biol.* – 1994. – V. 6. – P. 740-746.
64. Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. // *Neuron.* – 1991. – V. 7. V No 3. – P. 391-402.
65. Redzic J.S., Balaj L., van der Vos K.E., Breakefield X.O. Extracellular RNA mediates and marks cancer progression. // *Semin Cancer Biol.* – 2014. – V. 28. – P. 14–23.
66. Rivero O., Sich S., Lesch K.P., et al., Impact of the ADHD-susceptibility gene *Cdh13* on development and function of brain networks. // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2013. – V. 23. – No 6. – P. 492-507.
67. Resink T, Kuzmenko Y, Kern F et al. LDL binds to surface-expressed human T-cadherin in transfected HEK293 cells and influences homophilic adhesive interactions. // *FEBS letters.* – 1999. – V. 463. – No 1. – P. 29-34.
68. Robinson D.G., Ding Y., Jiang L. Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. // *Protoplasma.* – 2016. – V. 253. – P. 31–43.
69. Rubina K.A, Sysoeva V.Y., Molochkov V.A., et al. Malignant transformation in skin is associated with the loss of T-cadherin expression in human keratinocytes and heterogeneity in T-cadherin expression in tumor vasculature. // *Tumor Angiogenesis.* – 2012. – V. 2 – P. 135–166.
70. Rubina K.A., Tkachuk V.A. Guidance Receptors in the Nervous and Cardiovascular Systems. // *Biochemistry (Mosc).* – 2015. – V. 80. – No 10. – P. 1235 - 1253.
71. Rubinstein E., Le Naour F., Boucheix C., et al. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA - DR and VLA integrins. // *Eur J Immunol.* – 1996. – V. 26. – P. 2657–2665.

72. Sachinidis A., Mengden T., Vetter W., et al. Novel cellular activities for low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. // *Hypertension*. – 1990. – V. 15. – Pt. 2. – P. 704-711.
73. Sawaguchi S., Varshney S., Ogawa M., et al. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. // *Elife*. – 2017. – V. 6.
74. Scherer P.E., Williams S., Lodish H.F. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes // *J Biol Chem*. – 1995. – V. 270. – No 45. – P. 26746-9.
75. Semina E.V., Rubina K.A., Tkachuk V.A. et al. T-cadherin activates Rac1 and Cdc42 and changes endothelial permeability // *Biochemistry (Mosc)*. – 2009. – V. 74. – No 4. – P. 362-70.
76. Shapiro L., Fannon A., Kwong P. et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. // *Nature*. – 1995. – V. 374. – No 6520. – P. 327-337.
77. Stein J.M., Luzio J.P. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma- membrane proteins and lipids into shed vesicles. // *Biochem. J.* – 1991. – V. 274. – P. 381–386.
78. Subra C., Laulagnier K., Perret B., Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies // *Biochimie*. – 2007. – V. 89. – No 2. – P. 205-212.
79. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. // *Science*. – 1991. – V. 251. – P. 1451-1455.
80. Takeuchi, T., Misaki, A., Liang, S. et al. Expression of T-Cadherin (CDH13, H-Cadherin) in Human Brain and Its Characteristics as a Negative Growth Regulator of Epidermal Growth Factor in Neuroblastoma Cells. // *Journal of neurochemistry*. – 2000. – V. 74. – No 4. – P. 1489-1497.
81. Taube A., Schlich R., Sell H., Eckardt K., Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2012. – V. 302. – No 11. – P. 2148-65.
82. Tkachuk V.A., Bochkov V.N., Philippova M.P., et al. Identification of an atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin // *FEBS Letters*. – 1998. – V. 421. – No 3. – P. 208-212.
83. Valadi H., Ekström K., Lötvall J.O., et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nature cell biology*. – 2007. – V. 9. – No 6. – P. 654-659.
84. Wang Y., Ma X.L., Lau W.B. Cardiovascular adiponectin resistance: the critical role of adiponectin receptor modification // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2017. – V. 28. – P. 519-530.
85. Wang Y., Wang X., Lau W.B., et al. Adiponectin inhibits tumor necrosis factor- α -induced vascular inflammatory response via caveolin-mediated ceramidase recruitment and activation // *Circ Res*. – 2014. – V. 114. – No 5. – P. 792-805.
86. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. // *Br. J. Haematol*. – 1967. – V. 13. – P. 269–288.

87. Wollert, T., Hurley, J.H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes // *Nature*. – 2010. – V. 464. – No 7290. – P. 864-869.
88. Wyder L., Vitaliti A., Klemenz R., et al. Increased expression of H/T-cadherin in tumor- penetrating blood vessels // *Cancer Res*. – 2000. – V. 60. – No 17. – P. 4682-8.
89. Yamauchi T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., et al. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. – 2014. – V. 28. – No 1. – P. 15-23.
90. Yamauchi, T., Kamon, J., Kadowaki, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity // *Nat Med*. – 2001. – V. 7. – No 8. – P. 941-6.
91. Yu C.H., Gong M., Yi Z.C., et al. High glucose induced endothelial to mesenchymal transition in human umbilical vein endothelial cell. // *Exp Mol Pathol*. – 2017. – V. 102. – P. 377–383.
92. Yuana, Y., Sturk, A., Nieuwland, R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev*. – 2013. – V. 27. – P. 31-39
93. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. // *Cell Biosci*. – 2019. – V. 9.
94. Zhao X., Lei Y., Zheng J. et al. Identification of markers for migrasome detection // *Cell Discov*. – 2019. – V. 5. – No 27.
95. Zhou S., Matsuyoshi N., Miyachi Y. et al. Expression of T-cadherin in Basal keratinocytes of skin // *J Invest Dermatol*. – 2002. – V. 118. – No 6. – P. 1080-4.
96. Zmigrodzka M., Guzera M., Miskiewicz A., et al. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. // *Tumour Biol*. – 2016. – V. 37. – P. 14391-401.