

УДК 577.353.2

Т-КАДГЕРИН АКТИВИРУЕТ RAC1 И CDC42 И ВЛИЯЕТ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ^{*,**}

© 2009 г. Е.В. Семина¹, К.А. Рубина^{2***}, П.Н. Руткевич¹,
Т.А. Войно-Ясенецкая³, Е.В. Парфенова¹, В.А. Ткачук²

¹ Институт экспериментальной кардиологии,
ФГУ РКНПК Росмедтехнологий, 121552 Москва,
ул. 3-я Черепковская, 15а; факс: (495)414-6712

² Факультет фундаментальной медицины МГУ
им. М.В. Ломоносова, 117192 Москва; факс: (495)932-9904,
электронная почта: rkseniya@mail.ru

³ Department of Pharmacology, University of Illinois
at Chicago, Chicago, USA; fax: (312)996-1225

Поступила в редакцию 02.10.08
После доработки 20.11.08

В работе изучали сигнальные эффекты Т-кадгерина на модели линейных фибробластов NIH3T3. Было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина активирует Rac1 и Cdc42 GTPазы ($p < 0,01$), но не влияет на активность RhoA. Гиперэкспрессия Т-кадгерина с использованием аденовирусных конструкций в клетках HUVEC вызывает разборку микротрубочек и полимеризацию актиновых стресс фибрилл, а подавление экспрессии с использованием лентивирусных конструкций вызывает полимеризацию микротрубочек и уменьшение количества актиновых стресс фибрилл. Подавление экспрессии Т-кадгерина достоверно снижает проницаемость эндотелиального монослоя по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Т-кадгерин, Rho GTPазы, проницаемость эндотелиального монослоя, микротрубочки, актин.

Кадгерины — это суперсемейство молекул, обеспечивающих Ca^{2+} -зависимую гомофильную межклеточную адгезию. «Классические» кадгерины имеют внеклеточную часть, с характерной пятидоменной организацией, а также трансмембранную и цитоплазматическую часть, где последняя взаимодействует с компонентами цитоскелета и обеспечивает формирование прочных межклеточных контактов [1]. Т-кадгерин — нетипичный представитель суперсемейства кадгеринов. В структуре Т-кадгерина имеется внеклеточная часть, характерная для «классических» кадгеринов [2], но отсутствует трансмембранный и цитоплазматический домены, при этом Т-кадгерин заякорен на мембране через глико-

зилфосфатидилинозитол [3]. Отсутствие цитоплазматической части и локализация Т-кадгерина в липидных плотках [4] указывает на то, что Т-кадгерин, вероятнее всего, не опосредует формирование стабильных межклеточных контактов, а участвует во внутриклеточной сигнализации [4, 5, 6].

Локализация Т-кадгерина на лидирующем крае мигрирующих эндотелиальных клеток [7], на конусе роста прорастающих к своим мишеням аксонов мотонейронов [8, 9], а также участие Т-кадгерина в прорастании мелких сосудов и капилляров при неоангиогенезе и опухолевом ангиогенезе [10, 11] позволило сделать предположение о том, что Т-кадгерин является навигационным рецептором. В основе механизма, обеспечивающего направленный рост сосудов и нервов, а также миграцию клеток, лежит гомофильное связывание между молекулами Т-кадгерина на поверхности мигрирующих клеток, взаимодействующих со своим окружением [3, 10, 12].

В модельных экспериментах *in vitro* было показано, что взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на поверхности эндотелиальных

Принятые сокращения: HUVEC — эндотелиальные клетки пуповины человека, SRE — Serum Response Element, shRNA — короткие шпилечные РНК, GFP — зеленый флуоресцентный белок, siRNA — РНК интерференция, α -GAPDH — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа.

* Ускоренная публикация.

** Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 08-186, 15.02.2009.

*** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

клеток приводит к активации RhoA- и Rac1-сигнальных путей, изменению организации актинового цитоскелета и смене клеточного фенотипа с нормального на промигранторный [13]. Кроме того, способность эндотелиальных клеток, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, прикрепляться и распластываться на субстрате, содержащем рекомбинантный Т-кадгерин, достоверно снижается по сравнению с контролем [12]. Однако следует отметить, что в основном, эти данные были получены при изучении влияния Т-кадгерина на клеточную миграцию, пролиферации и адгезию эндотелиальных клеток *in vitro*.

Результаты, полученные ранее в нашей лаборатории, позволяют предполагать, что Т-кадгерин участвует не только в процессах роста сосудов *de novo* и миграции эндотелиальных клеток. В норме Т-кадгерин экспрессируется в мелких и крупных сосудах в эндотелиальных, гладкомышечных клетках и перicyтах [14], что предполагает важную роль Т-кадгерина в функционировании, в том числе, и зрелых, стабильных сосудов. В настоящей работе, изучая роль Т-кадгерина в функциональной активности эндотелиальных клеток и изменении клеточного фенотипа при формировании эндотелиального монослоя, мы обнаружили, что экспрессия Т-кадгерина влияет на проницаемость эндотелиального монослоя, при этом Т-кадгерин участвует в активации внутриклеточной сигнализации с участием LIMK1, Rac1 и Cdc42 GTPаз, а изменение экспрессии Т-кадгерина вызывает реорганизацию актинового и микротрубочкового цитоскелета.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали эндотелиальные клетки пуповины человека (HUVEC) 2-го пассажа («Cambrex», США) и линейные фибробласты мыши NIH3T3 (ATCC № CRL-1658). Клетки HUVEC культивировали с использованием укомплектованной среды EGM-2 («Cambrex»), для клеток NIH3T3 использовали среду DMEM («Gibco», США) с добавлением пенициллина (0,1 мг/мл), стрептомицина (0,1 мг/мл), и 10% фетальной бычьей сыворотки. Для электрофореза и иммуноблоттинга использовали реагенты фирмы «Bio-Rad Laboratories» (США). В работе использовали первые антитела против Т-кадгерина («ProSci», США), фосфорилированной LIMK1-киназы («Cell Signaling Technology», США), с-Мус эпитопа («Santa Cruz Biotechnology», США), α -тубулина («Sigma», США) против RhoA, Rac1 и Cdc42 GTPаз («Santa Cruz Biotechnology», глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (α -GAPDH)

(«Sigma»), а также вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor594 или AlexaFluor488, и фаллоидин, конъюгированный с AlexaFluor594 («Molecular Probes», Великобритания).

Культивирование и трансфекция эукариотических клеток. Клетки высевали на культуральные флаконы из расчета 10^4 клеток/см² и культивировали в CO₂ инкубаторе при 37°. Для гиперэкспрессии Т-кадгерина в NIH3T3 клетках использовали плазмиду, содержащую кДНК Т-кадгерина (pcDNA3.1/T-cad), созданную ранее в нашей лаборатории [15], или контрольную плазмиду pcDNA3.1 («Invitrogen», США). В эксперименте по измерению активности SRE (Serum Response Element) клетки NIH3T3 трансфицировали плазмидами pcDNA3.1/T-cad, pcDNA3.1, плазмидой для экспрессии β -галактозидазы pCMV-b-Gal («Clontech», США), плазмидой для экспрессии люциферазы и SRE-SRE.L («Stratagene», США). В качестве положительного контроля при измерении активации SRE использовали плазмиду, содержащую ген *p114RhoGEF*, который является фактором обмена гуанидина и активирует Rho GTPазы. Для подавления активности Rho GTPаз использовали плазмиды, несущие доминантно-негативные конструкторы RhoN17, RacN17 и Cdc42N19 для RhoA, Rac1 и Cdc42 соответственно. При оценке активации Rho GTPаз методом осаждения с использованием Сефарозы («pull-down assay») клетки NIH3T3 трансфицировали плазмидами, несущими гены постоянно активных форм GTPаз: для RhoA — *RhoV12*, для Rac1 — *RacV12*, для Cdc42 — *Cdc42V12*. Для оценки влияния гиперэкспрессии Т-кадгерина на активацию LIMK1 клетки NIH3T3 котрансфицировали плазмидами pcDNA3.1/T-cad и плазмидой мус-LIMK1, кодирующей LIMK1 и с-мус-эпитоп для усиления эндогенной экспрессии LIMK1 и для контроля присутствия трансгена в трансфицированных клетках; контрольные клетки котрансфицировали плазмидами pcDNA3.1 и мус-LIMK1. Клетки NIH3T3 трансфицировали с использованием реагента Lipofectamine2000™ («Invitrogen») согласно инструкции производителя. Для оценки влияния гиперэкспрессии Т-кадгерина на организацию микротрубочек, HUVEC котрансфицировали плазмидой pcDNA3.1/T-cad и плазмидой, содержащей ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) для визуализации трансфицированных клеток (pcDNA3.1/GFP); в контроле клетки трансфицировали плазмидами pcDNA3.1 и pcDNA3.1/GFP. Для подавления экспрессии Т-кадгерина методом РНК-интерференции (siRNA), эндотелиальные клетки котрансфицировали малыми интерферирующими

РНК («Dharmacon», США) (siRNA/T-cad) и плазмидой pcDNA3.1/GFP для визуализации трансфицированных клеток; в качестве контроля использовали плазмиду pcDNA3.1/GFP. Для трансфекции эндотелиальных клеток использовали реагент CytoPure-huv («Qbiogen», США) согласно инструкциям производителя. Уровень экспрессии Т-кадгерина, RhoA, Rac1, Cdc42, LIMK1, с-Мус, α -GAPDH, β -катенина и VE-кадгерина оценивали методом иммуноблоттинга с использованием клеточных лизатов, как было описано ранее в [6].

Метод измерения проницаемости эндотелиального монослоя *in vitro*. Для оценки проницаемости эндотелия использовали метод, описанный ранее в [16]. Клетки HUVEC 2-го пассажа высаживали в верхнюю камеру на полупроницаемую мембрану ячеек трансвелл («Transwell®», «Corning», США) с размером пор 0,4 мкм и радиусом мембраны 6,5 мм в количестве 10^5 клеток/лунку. Через 72 ч, после достижения клетками монослоя, в верхнюю камеру ячеек трансвелл вносили раствор декстрана, конъюгированного с флуоресцентным красителем FITC (FITC-dextran, «Sigma»), в конечной концентрации FITC-декстрана 10 мкг/мл. Через 60 мин из нижней камеры отбирали 20 мкл аликвоты и измеряли интенсивность флуоресценции FITC при длине волны 525 нм. Далее для последующих измерений пробы отбирали каждые 60 мин. Эксперимент проводили в четырех параллелях и повторяли 5 раз. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $p < 0,001$.

Иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток. Клетки HUVEC 2-го пассажа культивировали до образования монослоя в планшете CultureSlide™ («Beckton Dickinson», США) и переводили на бессывороточную среду EGM-2 за 4 ч до начала эксперимента. При окрашивании HUVEC антителами к α -тубулину проводили дополнительную инкубацию в растворе 2 мкМ таксола для стабилизации микротрубочек. Клетки фиксировали в растворе 0,1% глутарового альдегида, содержавшего 0,1 М каодилят натрия. После серии промывок в буфере Хэнкса клетки инкубировали в 0,25% растворе Triton X-100. Далее клетки последовательно инкубировали в 10%-ном растворе сыворотки донора вторых антител в течение 30 мин для блокирования неспецифического связывания, затем в растворе первых антител и вторых антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa-Fluor594 или AlexaFluor488. После отмывки клетки на стеклах заключали в среду Mounting Medium Vectashield™ («Vector Laboratories Inc», США). Визуализацию окрашивания и анализ изображения проводили с использованием ин-

вертированного конфокального микроскопа (Zeiss Axiovert LSM 200M) с цифровой камерой AxioCam HRC, программ LSM Image Browser («Zeiss», Германия), MetaMorph 5.0 («Universal Imaging», США) и Scion Image 4.0 («Scion Corporation», США).

Метод измерения активности SRE. Для анализа влияния экспрессии Т-кадгерина на активацию Rho GTPаз использовали клетки NIH3T3, не экспрессирующие Т-кадгерин. Клетки NIH3T3 котрансфицировали плазмидами pcDNA3.1/T-cad (для гиперэкспрессии Т-кадгерина), SRE.L (для оценки активации SRE) и pCMV-b-Gal (для нормирования на уровень трансфекции). Известно, что при активации Rho GTPаз в цитоплазме (RhoA, Rac1 и Cdc42) происходит активация SRE-комплекса в ядре [17]. Трансфекция плазмидой SRE.L, у которой под одним промотором находятся ген SRE и ген люциферазы, позволяет, измеряя уровень активности люциферазы, оценивать уровень активации Rho GTPаз. Контрольные клетки котрансфицировали плазмидами pcDNA3.1, SRE.L и pCMV-b-Gal. В качестве положительного контроля использовали клетки, котрансфицированные плазмидами pcDNA3.1/T-cad, SRE.L, pCMV-b-Gal, p114RhoGEF (плазида, несущая ген постоянно активного фактора обмена нуклеотидов, ответственного за активацию Rho GTPаз). Для подавления Т-кадгерин опосредованной активации SRE клетки NIH3T3 котрансфицировали плазмидами pcDNA3.1/T-cad, SRE.L, pCMV-b-Gal и одной из плазмид, содержавшей доминантно-негативную конструкцию для инактивации Rho GTPаз (RhoN19, Rac1N17 и Cdc42N19 для RhoA, Rac1 и Cdc42 соответственно). Через 24 ч после трансфекции клетки депривировали в течение 4 ч, лизировали, и в полученных лизатах определяли уровень активности люциферазы и б-галактозидазы согласно инструкции производителя («Promega», США). Эксперимент проводили в пяти параллелях и повторяли 5 раз. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $p < 0,01$.

Метод выделения активных Rho GTPаз («Pull-down assay»). Для выделения активных форм Rho GTPаз использовали метод сефарозного осаждения GST (Glutathione S-Transferase)-pull down assay с последующим иммуноблоттингом осажденных белков, описанный ранее [18]. Метод «GST-pull down» основан на иммобилизации глутатион-S-трансферазосодержащих белков (GST-белки) на глутатион-сефарозу. В данном случае использовали белки, являющиеся эффекторами GTPаз Rho и способные связывать активные GTP-содержащие Rho GTPазы. В лаборатории доктора Шварца на основе экспрес-

сионного вектора pGEX-2T были созданы две плазмиды, содержащие ПАК-связывающий домен (PBD) для активных GTPаз Rac1 и Cdc42, и Rho-связывающий домен (RBD) для связывания активной GTPазы RhoA [29]. При последующей трансформации *E. coli* штамм DH5 соответствующими плазмидами были выделены и очищены GST-белки, содержащие PBD (GST-RBD) и RBD (GST-PBD) домены. Иммунизацию GST-белков на глутатион-сефарозу («Amersham», США) проводили при 4° в течение ночи. Клетки NIH3T3 трансфицировали плазмидами pcDNA3.1, pcDNA3.1/T-cad, а также плазмидами, экспрессирующими активные формы Rho-GTPаз (RhoV12, RacV12, Cdc42V12) для положительного контроля. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в лизирующем буфере (50 мМ Tris (pH 7,4), 1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 500 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, ингибиторы протеаз), и лизаты инкубировали с GST-RBD- или GST-PBD-сефарозой при 4° в течение 60 мин. После осаждения сефарозы методом центрифугирования, осадки инкубировали в стандартном лизирующем буфере Лэммли для отделения сефарозы. Активные GTPазы RhoA, Rac1 и Cdc42 определяли методом электрофореза в 14%-ном ПААГ с последующим иммуноблоттингом с использованием специфичных для каждой GTPазы моноклональных антител. Содержание общих GTPаз определяли в лизате, приготовленном обычным способом. Представлены результаты трех независимых экспериментов.

Гиперэкспрессия Т-кадгерина в эндотелиальных клетках с использованием аденовирусной трансдукции. Для гиперэкспрессии Т-кадгерина в HUVEC использовали конструкции, созданные нами на основе экспрессионной системы AdEasy™ («Quantum Biotechnologies», США). Полученная аденовирусная конструкция позволяла с высокой эффективностью гиперэкспрессировать Т-кадгерин в HUVEC. Гиперэкспрессию Т-кадгерина в трансдуцированных HUVEC оценивали методом иммунофлуоресцентного окрашивания и иммуноблоттинга с использованием антител против Т-кадгерина человека. В экспериментах использовали клетки HUVEC 2-го пассажа, трансдуцированные вирусом, кодирующим кДНК Т-кадгерина человека (pAd-T-cad) или контрольным вирусом (pAd).

Подавление экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках методом siRNA с использованием лентивирусной трансдукции. Для подавления экспрессии Т-кадгерина в HUVEC методом siRNA использовали лентивирусный вектор pSIH1-H1-CopGFP («System Bioscience», США), предназначенный для экспрессии коротких

шпилечных РНК (shRNA, short hairpin RNA) и несущий ген *GFP* в качестве маркера трансдукции. Последовательность GGTGAGTGTCT-TAGCATAT, расположенная в 3'-нетранслируемой области мРНК Т-кадгерина человека и способная служить эффективной мишенью РНК-интерференции, была отобрана при помощи тест-системы ООО «Фирма Мона» (Россия). Лентивирусная конструкция pSIH1-H1-CopGFP-shRNA/T-cad, кодирующая шпилечную РНК, направленную против мРНК Т-кадгерина (shRNA/T-cad), была упакована в VSV-G («System Bioscience») псевдотипированные лентивирусные частицы и использована для заражения клеток HUVEC. В качестве контрольной конструкции использовали вектор pSIH1-H1-CopGFP-shRNA/Luc, кодирующий shRNA против люциферазы (shRNA/Luc). Подавление экспрессии Т-кадгерина подтверждали методом иммуноблоттинга. Данные нормировали по содержанию α -GAPDH в клетке.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Результаты на графиках представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Различия считались достоверными при уровне значимости меньше 0,05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Т-кадгерин влияет на проницаемость эндотелиального монослоя. Для оценки влияния Т-кадгерина на проницаемость эндотелия *in vitro* использовали метод измерения проницаемости клеточного монослоя для молекул FITC-декстрана. В HUVEC подавляли эндогенную экспрессию Т-кадгерина методом siRNA. Лентивирусную конструкцию, кодирующую shRNA против мРНК Т-кадгерина (shRNA/T-cad), а также контрольную конструкцию (shRNA/Luc), кодирующую shRNA против мРНК люциферазы, упаковывали в псевдовirusные частицы, которыми трансдуцировали HUVEC. Подавление экспрессии Т-кадгерина (как зрелой формы, M_r 95 кДа, так и предшественника, M_r 130 кДа) через 72 ч подтверждали методом иммуноблоттинга. Экспрессия Т-кадгерина в HUVEC, трансдуцированных контрольной конструкцией shRNA/Luc, не изменялась по сравнению с нативными HUVEC (рис. 1, а). После трансдукции HUVEC культивировали до образования монослоя, затем в верхнюю камеру ячеек трансвелл вносили раствор FITC-декстрана. Каждые 60 мин из нижней камеры отбирали аликвоту среды и измеряли интенсивность флуоресценции FITC.

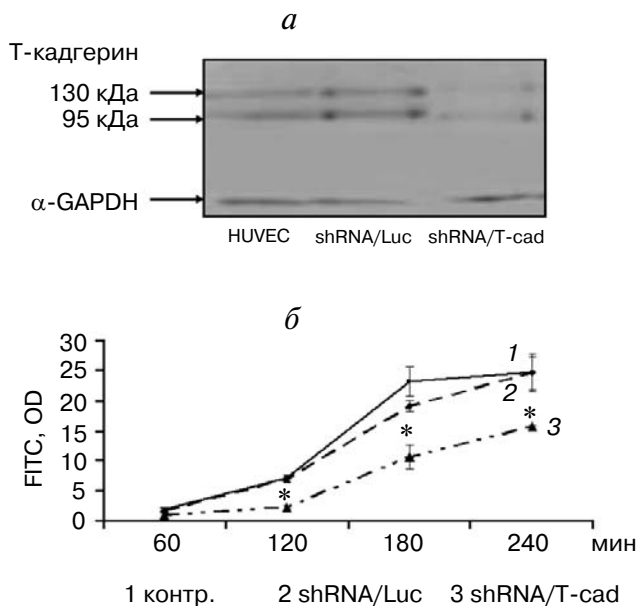


Рис. 1. Влияние Т-кадгерина на проницаемость эндотелия. *a* — Анализ экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках методом иммуноблоттинга. 130 кДа — предшественник Т-кадгерина, 95 кДа — зрелый Т-кадгерин; *б* — измерение проницаемости монослоя эндотелиальных клеток по интенсивности флуоресценции FITC-декстрана (FITC). shRNA/T-cad — HUVEC, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, подавляющей экспрессию Т-кадгерина; shRNA/Luc — HUVEC, трансдуцированные контрольной конструкцией. Контроль — не трансдуцированные HUVEC, $p < 0,001$

Через 2 ч проницаемость эндотелиального монослоя, в клетках которого экспрессия Т-кадгерина была подавлена (shRNA/T-cad), оказывалась на 30% ниже, чем в контролях (shRNA/Luc и контр.) (рис. 1, б). Достоверные различия в проницаемости эндотелиального монослоя наблюдались на протяжении всего эксперимента, и через 4 ч разница составляла 40%.

Мы предположили, что возможным механизмом снижения проницаемости эндотелиального монослоя при подавлении экспрессии Т-кадгерина является изменение экспрессии и/или локализации белков, обеспечивающих прочную межклеточную адгезию в эндотелиальных клетках: VE-кадгерина и β -катенина, поскольку известно, что нарушение локализации этих белков приводит к разрушению прочной межклеточной адгезии и увеличению проницаемости эндотелиального монослоя [16, 19].

Т-кадгерин изменяет экспрессию β -катенина, но не VE-кадгерина. Для проверки этого предположения мы использовали HUVEC, в которых с помощью лентивирусной трансдукции подавляли эндогенную экспрессию Т-кадгерина. Лока-

лизацию и уровень экспрессии VE-кадгерина и β -катенина анализировали методом иммунофлуоресцентного окрашивания в сочетании с конфокальной микроскопией (рис. 2, *a*, см. цветную вклейку), а также методом иммуноблоттинга. Полуколичественная оценка уровней интенсивности флуоресценции показала (рис. 2, *a*, б), что наблюдаются достоверные различия в интенсивности окрашивания антителами к β -катенину в контрольных (shRNA/Luc) и опытных клетках (shRNA/T-cad), что отражает увеличение содержания β -катенина в ядре и цитоплазме клеток, экспрессия Т-кадгерина в которых была подавлена. Эти данные были подтверждены методом иммуноблоттинга (рис. 2, в): в лизатах, полученных из HUVEC, экспрессия Т-кадгерина в которых была подавлена (shRNA/T-cad), количество белка β -катенина было больше, чем в контрольных клетках (shRNA/Luc). Данные были нормированы по количеству общего белка. Таким образом, подавление экспрессии Т-кадгерина (shRNA/T-cad) вызывает увеличение содержания β -катенина в HUVEC.

В то же время достоверных различий в уровне экспрессии и локализации VE-кадгерина в контрольных HUVEC (shRNA/Luc) и в HUVEC при подавлении экспрессии Т-кадгерина (shRNA/T-cad) обнаружено не было, хотя при полуколичественном анализе интенсивности флуоресценции при окрашивании антителами против VE-кадгерина отмечалась некоторая тенденция к увеличению его содержания в зоне адгезивных контактов ($p > 0,05$, данные не приведены).

Т-кадгерин активирует GTPазы Rac1 и Cdc42, но не влияет на активность RhoA. Известно, что одним из возможных путей регуляции проницаемости эндотелиального барьера является активация GTPаз Rho (RhoA, Rac1 и Cdc42), что, в свою очередь, влияет на плотность межклеточных адгезивных контактов, состояние цитоскелета и активность акто-миозинового комплекса [20, 21]. Поскольку были получены результаты, свидетельствующие о влиянии Т-кадгерина на проницаемость эндотелиального монослоя, мы предположили, что Т-кадгерин может опосредовать свое действие через активацию Rho GTPаз. Для проверки этой гипотезы мы использовали метод измерения SRE-активности, отражающей активацию Rho GTPаз, а также оценивали уровень активации Rho GTPаз, выделяя активные формы Rho GTPаз. Экспрессию Т-кадгерина подтверждали методом иммуноблоттинга, который показал, что в контрольных клетках экспрессия Т-кадгерина отсутствовала (рис. 3, *a*).

Для выявления Т-кадгериноопосредованной активации SRE NIH3T3-клетки котрансфици-

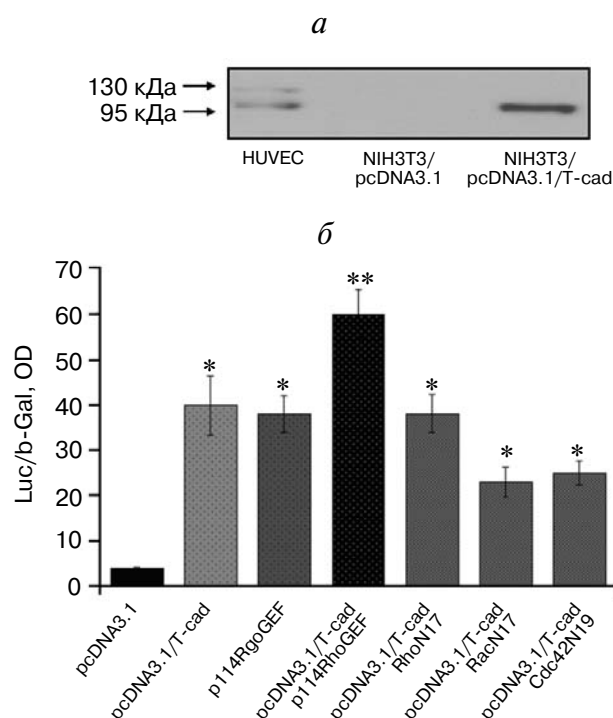


Рис. 3. Т-кадгерин активирует SRE. *a* — Анализ экспрессии Т-кадгерина методом иммуноблоттинга в NIH3T3 клетках, трансфицированных плазмидой pcDNA3.1/T-cad и контрольной плазмидой pcDNA3.1. *б* — Влияние гиперэкспрессии Т-кадгерина в клетках NIH3T3 (pcDNA3.1/T-cad) на активацию SRE и активность Rho GTPаз; положительный контроль (p114RhoGEF), доминантно-негативные конструкторы RacN17, Cdc42N19 и RhoN17, $p < 0,01$

ровали плазмидами pcDNA3.1/T-cad, SRE.L и pCMV-b-Gal (pcDNA3.1/T-cad на рис. 3, б); контрольные клетки котрансфицировали плазмидами pcDNA3.1, SRE.L и pCMV-b-Gal (pcDNA3.1). Активация SRE при экспрессии Т-кадгерина в клетках была сопоставима с положительным контролем (p114RhoGEF) (рис. 3, б); при коэкспрессии плазмид, несущих гены Т-кадгерина и p114RhoGEF наблюдался аддитивный эффект, при котором степень активации SRE была в 1,57 раз больше, чем при экспрессии каждой из этих плазмид по отдельности.

Как известно, на активность SRE влияют все Rho-белки: RhoA, Rac1 и Cdc42 [21]. Для выявления роли Т-кадгерина в активации каждой из этих GTPаз мы использовали плазмиды, несущие доминантно-негативные конструкторы, RhoN17, RacN17 и Cdc42N19, специфически подавляющие активность RhoA, Rac1 и Cdc42 соответственно. При коэкспрессии Т-кадгерина и RacN17, а также Т-кадгерина и Cdc42N19 детектировалось частичное подавление активации

SRE по сравнению с экспрессией только Т-кадгерина. Однако при коэкспрессии плазмид, несущих гены RhoN17 и Т-кадгерина, активация SRE соответствовала уровню активации SRE при экспрессии одного Т-кадгерина, и была сравнима с положительным контролем (p114RhoGEF).

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что экспрессия Т-кадгерина в NIH3T3 клетках опосредует активацию SRE, что свидетельствует об участии Т-кадгерина во внутриклеточной сигнализации с участием Rho GTPаз, а также, что экспрессия Т-кадгерина вызывает активацию Rac1 и Cdc42, но не влияет на RhoA-сигнальный путь.

Для дальнейшего доказательства специфичности наблюдаемых эффектов Т-кадгерина на активацию Rac1 и Cdc42 мы выделяли активные формы Rho GTPаз, используя лизаты клеток NIH3T3 после трансфекции плазмидой, содержащей Т-кадгерин (pcDNA3.1/T-cad), или контрольной плазмидой (pcDNA3.1) методом осаждения с использованием сефарозы. В качестве положительного контроля клетки трансфицировали плазмидами, несущими гены постоянно активных форм Rho GTPаз: RhoV12, RacV12 и Cdc42V12. При выделении активных форм Rho GTPаз было обнаружено (рис. 4), что экспрессия Т-кадгерина активирует Rac1 и Cdc42 до уровня, сопоставимого с положительным контролем (RacV12 и Cdc42V12) (рис. 4, а, б), в то время как активации RhoA не наблюдается (рис. 4, в). При этом общее содержание белков Rac1, Cdc42 и RhoA при экспрессии Т-кадгерина в NIH3T3 клетках остается неизменным, что подтверждается данными иммуноблоттинга. Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что экспрессия Т-кадгерина в NIH3T3-клетках вызывает активацию Rac1 и Cdc42 GTPазы, но не влияет на активность RhoA.

Т-кадгерин фосфорилирует LIMK1 и влияет на организацию микротрубочек в HUVEC. LIMK1 является важным элементом сигнальных путей с участием Rho GTPаз, регулирующим организацию микротрубочек и актинового цитоскелета и влияющим на проницаемость эндотелиального монослоя [22–24]. В эндотелиальных клетках LIMK1 в неактивной форме колокализуется с микротрубочками. При фосфорилировании (активации) LIMK1 происходит диссоциация комплекса LIMK1-микротрубочки, разборка микротрубочек, формирование стресс-фибрилл, что приводит к сокращению эндотелиальных клеток и увеличению проницаемости эндотелиального барьера [24].

Для того чтобы оценить влияние Т-кадгерина на активность LIMK1, использовали клетки NIH3T3, котрансфицированные плазмидами

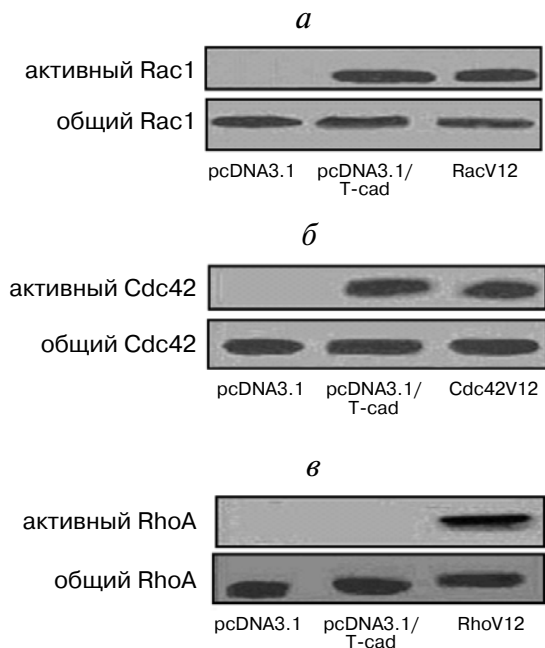


Рис. 4. Выделение активных форм Rho GTPаз методом осаждения с использованием Сефарозы. *а* — Rac1, *б* — Cdc42, *в* — RhoA

pcDNA3.1/T-cad для экспрессии Т-кадгерина (или pcDNA3.1 в контроле) и плазмидой мус-LIMK1 для усиления экспрессии LIMK1-киназы. Активность LIMK1 оценивали методом иммуноблоттинга. Было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина в NIH3T3-клетках приводит к увеличению содержания фосфорилированной формы LIMK1 в Т-кадгеринэкспрессирующих клетках по сравнению с контрольными, в то время как общее количество LIMK1, измеренное по содержанию белка с-Мус, остается неизменным (рис. 5, *а*, см. цветную вклейку).

Изучая влияние Т-кадгерина на микротрубочковый цитоскелет в HUVEC, использовали две клеточные модели: для гиперэкспрессии Т-кадгерина HUVEC трансфицировали плазмидой pcDNA3.1/T-cad, для подавления нативной экспрессии Т-кадгерина использовали метод siRNA короткими РНК олигонуклеотидами (siRNA/T-cad). Подавление экспрессии Т-кадгерина в HUVEC оценивали методом иммуноблоттинга. Через 48 ч при использовании siRNA/T-cad в дозировке 100 нМ наблюдалось практически полное подавление экспрессии Т-кадгерина, причем как зрелой формы (M_r 95 кДа), так и его предшественника (M_r 130 кДа) (рис. 5, *б*).

Влияние Т-кадгерина на микротрубочковый цитоскелет в HUVEC оценивали методом имму-

нофлуоресцентного окрашивания микротрубочек с использованием антител против α -тубулина. Для усиления нативной экспрессии Т-кадгерина HUVEC котрансфицировали плазмидами pcDNA3.1/T-cad и pcDNA3.1/GFP. Интенсивность окрашивания антителами к α -тубулину в GFP-экспрессирующих HUVEC оценивали в условиях временной трансфекции. Для подавления экспрессии Т-кадгерина HUVEC одновременно трансфицировали плазмидой pcDNA3.1/GFP и siRNA/T-cad в количестве 100 нМ. При транзитной трансфекции культуры клеток млекопитающих в одну трансфицированную клетку попадает сразу много молекул плазмидной ДНК — вплоть до 100 000 штук. Поэтому в случае котрансфекции смесью плазмид практически в любой трансфицированной клетке оказывается смесь исходных плазмид, причем в той же пропорции [28]. При анализе результатов иммунофлуоресцентного окрашивания HUVEC, полученных с использованием конфокальной микроскопии, было обнаружено, что Т-кадгерин влияет на организацию микротрубочек: гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает разборку микротрубочек, а подавление экспрессии Т-кадгерина вызывает противоположный эффект — полимеризацию микротрубочек. На рис. 5, *в*, на верхней панели представлен характерный паттерн окрашивания: в трансфицированной клетке экспрессируется GFP (зеленая флуоресценция) и гиперэкспрессируется Т-кадгерин, при этом интенсивность окрашивания антителами на α -тубулин (красная флуоресценция) и количество микротрубочек в этой клетке меньше, чем в окружающих нетрансфицированных клетках. Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции с использованием программы MetaMorph показал, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина интенсивность окрашивания антителами к α -тубулину оказывалась достоверно ниже, чем в контроле (рис. 5, *г*, слева, $p < 0,05$). На нижней панели рис. 5, *в* представлены HUVEC, в одной из которых экспрессия Т-кадгерина была подавлена с использованием siRNA/T-cad (зеленая флуоресценция GFP). Интенсивность окрашивания антителами на α -тубулин (красная флуоресценция) и количество микротрубочек в этой клетке больше, чем в окружающих нетрансфицированных клетках. Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции с использованием программы MetaMorph показал, что при подавлении экспрессии Т-кадгерина интенсивность окрашивания антителами к α -тубулину оказывалась достоверно выше, чем в контроле (рис. 5, *г*, справа, $p < 0,05$).

Т-кадгерин влияет на сборку актиновых стресс-фибрилл в HUVEC. Известно, что прони-

проходимость эндотелиального монослоя напрямую зависит от состояния актинового цитоскелета — полимеризация актиновых стресс-фибрилл вызывает активацию акто-миозинового комплекса, клеточное сокращение, снижение прочности межклеточных контактов и увеличение проницаемости эндотелиального монослоя [24]. Для оценки влияния Т-кадгерина на актиновый цитоскелет в HUVEC Т-кадгерин гиперэкспрессировали с помощью аденовирусной трансдукции или подавляли экспрессию Т-кадгерина с использованием лентивирусной трансдукции. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием флуоресцентно-меченного фаллоидина, выявляющего филаменты актина, было обнаружено, что гиперэкспрессия Т-кадгерина (pAd-T-cad) в HUVEC усиливает полимеризацию актина и формирование стресс-фибрилл по сравнению с контрольными клетками (pAd) (рис. 6, а, см. цветную вклейку), а подавление экспрессии Т-кадгерина (shRNA/T-cad), наоборот, уменьшает количество актиновых стресс-фибрилл по сравнению с контролем (shRNA/Luc) (рис 6, б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия Т-кадгерина влияет на проницаемость эндотелиального монослоя, при этом гиперэкспрессия Т-кадгерина приводит к активации Rac1- и Cdc42-сигнальных путей, фосфорилированию LIMK1-киназы, деполимеризации микротрубочек и сборке актиновых стресс фибрилл, а подавление экспрессии Т-кадгерина вызывает полимеризацию микротрубочек, разборку актиновых стресс фибрилл и снижение проницаемости эндотелиального монослоя.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основной функцией эндотелиальных клеток является обеспечение избирательной проницаемости сосудистой стенки, ограничивающей свободный обмен между кровью и окружающими тканями. Известно, что вазоактивные вещества, такие как тромбин и гистамин, вызывают увеличение проницаемости эндотелиального монослоя, как *in vivo*, так и *in vitro*, за счет активации внутриклеточной сигнализации с участием Rho GTPаз, что приводит к формированию актиновых стресс-фибрилл, фосфорилированию легких цепей миозина, активации акто-миозинового сокращения в эндотелиальных клетках и нарушению организации или функции плотных и адгезивных межклеточных контактов [16, 20, 21, 23].

В нашей работе для выяснения возможной роли Т-кадгерина в регуляции барьерной функ-

ции эндотелия мы использовали метод siRNA, и обнаружили, что подавление экспрессии Т-кадгерина в HUVEC вызывает достоверное снижение проницаемости эндотелиального монослоя *in vitro*. Мы предположили, что снижение проницаемости эндотелиального монослоя при подавлении экспрессии Т-кадгерина в HUVEC может быть связано с активацией внутриклеточной сигнализации с участием Rho GTPаз. Rho GTPазы — сигнальные молекулы, регулирующие многие процессы в клетке, такие как динамические изменения цитоскелета, адгезия и подвижность клеток, проницаемость эндотелиального барьера и целостность межклеточных контактов, а также транскрипцию генов и пролиферацию клеток [22, 23]. Для проверки гипотезы об участии Rho GTPаз в Т-кадгеринопосредованной сигнализации мы использовали клеточную модель — линию фибробластов NIH3T3, не экспрессирующую Т-кадгерин, и измеряли активность SRE до и после экспрессии Т-кадгерина в этих клетках. Поскольку известно, что при активации Rho-белков (RhoA, Rac1 и Cdc42) в цитоплазме происходит активация SRE-комплекса в ядре [17], изменение уровня активности SRE позволяет судить об активации Rho GTPаз. Полученные данные свидетельствуют об активации SRE в клетках NIH3T3 при экспрессии Т-кадгерина, что указывает на активацию Rho GTPаз. Для оценки специфического влияния Т-кадгерина на активность каждой из Rho GTPаз мы выделяли активные формы Rac1, Cdc42 и RhoA и обнаружили, что экспрессия Т-кадгерина в клетках NIH3T3 вызывает активацию Rac1 и Cdc42, но не влияет на RhoA-сигнальный путь. Данные литературы об участии Rac1, Cdc42 и RhoA в регуляции проницаемости эндотелиального монослоя противоречивы. С одной стороны, в ряде работ было показано, что определенный уровень активности Rac1 необходим для поддержания стабильной межклеточной адгезии, опосредованной плотными и кадгеринсодержащими адгезивными контактами [23]. С другой стороны, известно, что активация Rac1, хотя и предотвращает сборку актиновых стресс фибрилл, но может также вызывать нарушение межклеточной адгезии в монослое эндотелиальных клеток [19, 23]. Активация RhoA в эндотелиальных клетках вызывает формирование актиновых стресс фибрилл, акто-миозиновое сокращение и разборку кадгериновых контактов [23]. Но в то же время, есть данные, указывающие на то, что активации RhoA с использованием бактериальных токсинов или постоянно активной формы RhoA (RhoAV14) оказывается недостаточно для эффективного разрушения межклеточных контак-

тов, что свидетельствует о существовании дополнительных сигнальных путей, регулирующих проницаемость эндотелия [24]. Относительно того, какую роль играет Cdc42 в регуляции проницаемости эндотелиального барьера, также нет ясности, хотя ряд данных литературы указывает на то, что изменение активности Cdc42 не влияет на барьерную функцию эндотелия [23]. Возможно, что активация специфических GTPаз и дальнейшая внутриклеточная сигнализация зависит от типа клеток, условий эксперимента, от того, находятся ли клетки в состоянии плотного монослоя или в процессе формирования новых контактов, а также от того, анализируются в эксперименте процессы клеточной адгезии или формирования межклеточных контактов. Так, при адгезии HUVEC, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, на субстрате, содержащем рекомбинантный Т-кадгерин, происходит активация внутриклеточных сигнальных путей с участием Rho/ROCK и Rac1 GTPаз, которые приводят к изменению организации цитоскелета, клеточного фенотипа и откреплению клеток от подложки [12]. В то же время в нашей работе мы обнаружили, что экспрессия Т-кадгерина вызывает активацию Rac1 и Cdc42, но не влияет на RhoA-сигнальный путь.

Известно, что прочность эндотелиального барьера напрямую зависит от состояния цитоскелета эндотелиальных клеток: деполимеризация микротрубочек сопровождается полимеризацией актина и формированием стресс-фибрилл, что вызывает увеличение проницаемости эндотелиального барьера [22, 23, 25–27]. В эндотелиальных клетках существует общий механизм регуляции полимеризации актина и деполимеризации микротрубочек: серин-треониновая киназа LIMK1 является важным связующим звеном между Rho GTPазами, активным цитоскелетом и микротрубочками [22–24]. LIMK1 в неактивной форме колокализуется с микротрубочками. При фосфорилировании LIMK1, которое приводит к ее активации, происходит диссоциация комплекса LIMK1–микротрубочки, разборка микротрубочек, стабилизация актина и формирование стресс-фибрилл. Эти изменения в организации цитоскелета в эндотелиальных клетках сопровождаются изменениями клеточного фенотипа, клеточным сокращением и увеличением проницаемости эндотелиального барьера [25]. В настоящей работе, используя линейные клетки NIH3T3, мы впервые показали, что экспрессия Т-кадгерина приводит к активации LIMK1. Эти результаты коррелируют с данными, полученными нами на HUVEC. При гиперэкспрессии Т-кадгерина в HUVEC усиливается формирование актиновых стресс-фибрилл

и происходит деполимеризация микротрубочек, а подавление экспрессии Т-кадгерина, наоборот, вызывает, уменьшение количества актиновых стресс-фибрилл, увеличение полимеризации микротрубочек и снижение проницаемости эндотелиального монослоя. Результаты, полученные нами при изучении влияния экспрессии Т-кадгерина на микротрубочки, актиновые стресс-фибриллы и регуляцию проницаемости эндотелия, согласуются с данными работ А. Верина с соавт., в которых было показано, что прочность эндотелиального монослоя напрямую зависит от состояния микротрубочкового и актинового цитоскелета эндотелиальных клеток, что имеет важное физиологическое значение для функционирования сосудов [26, 27].

Для дальнейшего выявления механизмов влияния Т-кадгерина на проницаемость эндотелиального монослоя мы анализировали экспрессию и локализацию белков, обеспечивающих прочную межклеточную адгезию в эндотелиальных клетках – VE-кадгерина и β -катенина. Известно, что VE-кадгерин является специфичным белком адгезивных контактов в эндотелиальных клетках и через белковые взаимодействия с катенинами обеспечивает связь с актиновым цитоскелетом [16]. Разрушение VE-кадгерин- β -катенинового комплекса за счет фосфорилирования белков, входящих в состав комплекса, или за счет нарушения их локализации в местах межклеточных контактов приводит к нарушению межклеточной адгезии и увеличению проницаемости эндотелиального монослоя [16, 19]. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что при подавлении экспрессии Т-кадгерина в HUVEC, которое сопровождается снижением проницаемости эндотелиального монослоя для молекул FITC-декстрана, наблюдается достоверное увеличение содержания белка β -катенина в ядре и цитоплазме клеток. Вероятно, при подавлении экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках активируются пути внутриклеточной сигнализации с участием β -катенина. Предположение об участии β -катенина в Т-кадгеринопосредованной сигнализации коррелирует с данными, полученными в лаборатории под руководством доктора Резинк, и свидетельствующими о том, что гиперэкспрессия Т-кадгерина, хотя и не изменяет общее содержание β -катенина в эндотелиальных клетках, тем не менее приводит к увеличению содержания активного β -катенина и накоплению β -катенина в ядре, где он взаимодействует с Lef/Tcf факторами транскрипции и вызывает активацию экспрессии генов, ответственных за пролиферацию клеток и регуляцию клеточного цикла [13].

Несмотря на изменение содержания β -катенина в HUVES при подавлении экспрессии Т-кадгерина, мы не обнаружили достоверных различий в содержании и локализации VE-кадгерина. Возможно, что в плотной культуре эндотелиальных клеток изменение проницаемости монослоя регулируется не за счет изменения локализации VE-кадгерина в зоне контактов на поверхности мембраны, а за счет изменения функциональной активности этих контактов. Это предположение подтверждается данными, полученными при изучении влияния активации Rho/Rac белков на локализацию и созревание межклеточных контактов при формировании эндотелиального и эпителиального монослоя клеток [20]. Оказалось, что в отличие от E-кадгерина в эпителиальных клетках, Rho/Rac-белки не влияют на локализацию VE-кадгерина в эндотелиальных клетках, хотя активация Rho/Rac-белков вызывает перестройки цитоскелета. В то же время нельзя исключить, что изменение проницаемости эндотелиального монослоя при подавлении экспрессии Т-кадгерина происходит за счет изменения организации плотных контактов.

Таким образом, суммируя полученные в настоящей работе результаты на схеме (рис. 7, см. цветную вклейку), можно сделать вывод о том, что Т-кадгерин участвует в активации систем внутриклеточной сигнализации. Гиперэкспрессия Т-кадгерина активирует Rac1 и Cdc42 GTPазы, но не влияет на активность Rho, а также усиливает фосфорилирование LIMK1 киназы, которая вызывает перестройки актинового и микротрубочкового цитоскелета, что, в свою очередь, влияет на проницаемость эндотелиального монослоя.

Работа выполнена при финансовой поддержке: 1. Гранта Wellcome Trust грант # 075154, Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы», лот № 8 шифр 2008-2-1.2-06-10, по теме: «Разработка метода подавления ангиогенеза путем экспрессии на поверхности клеток навигационного рецептора Т-кадгерина и других поверхностных рецепторов, блокирующих прорастание сосудов в опухолях» (Государственный контракт № 02.512.11.2222).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foty, R.A., and Steinberg, M.S. (2004) *Intern. J. Dev. Biol.*, **48**, 397–409.
2. George, S.J., and Beeching, C.A. (2006) *Atherosclerosis*, **188**, 1–11.
3. Vestal, D.J., and Ranscht, B. (1992) *JCB*, **119**, 451–461.
4. Philippova, M.P., Bochkov, V.N., Stambolsky, D.V., Tkachuk, V.A., and Resink, T. (1998) *FEBS Lett.*, **129**, 201–210.
5. Rubina, K.A., and Tkachuk, V.A. (2004) *Russian Journal of Physiol.*, **90**, 968–986.
6. Rubina, K., Talovskaya, E., Cherenkov, V., Ivanov, D., Stambolsky, D., Storozhevsky, T., Pinelis, V., Shevelev, A., Parfyonova, Y., Resink, T., Erne, P., and Tkachuk, V. (2005) *Mol. Cell Biochem.*, **273** (1–2), 33–41.
7. Ivanov, D., Philippova, M., Allenspach, R., Erne, P., and Resink, T. (2004) *Cardiovasc. Res.*, **64**, 132–143.
8. Fredette, B.J., and Ranscht, B. (1994) *Journal of Neuroscience*, **14**, 7331–7346.
9. Fredette, B.J., Miller, J., and Ranscht, B. (1996) *Development*, **122**, 3163–3171.
10. Rubina, K., Kalinina, N., Potekhina, A., Efimenko, A., Semina, E., Poliakov, A., Wilkinson, D.G., Parfyonova, Y., and Tkachuk, V. (2007) *Angiogenesis*, **10** (3), 183–195.
11. Wyder, L., Vitaliti, A., Schneider, H., Hebbard, L.W., Moritz, D.R., Wittmer, M., Ajmo, M., and Klemen, R. (2000) *Cancer Res.*, **60**, 4682–4688.
12. Philippova, M., Ivanov, D., Allenspach, I., Takuwa, Y., Erne, P., and Resink, T. (2005) *FASEB J.*, **19**(6), 588–590.
13. Ivanov, D., Philippova, M., Tkachuk, V., Erne, P., and Resink, T. (2004) *Exp. Cell Res.*, **293**, 207–218.
14. Kudrjashova, E., Bashtrikov, P., Bochkov, V., Parfyonova, Y., Tkachuk, V., Antropova, J., Iljinskaya, O., Tararak, E., Erne, P., Ivanov, D., Philippova, M., and Resink, T.J. (2002) *Histochem. Cell Biol.*, **118**, 281–290.
15. Philippova, M., Ivanov, D., Tkachuk, V., Erne, P., and Resink, T.J. (2003) *Histochem. Cell Biol.*, **120** (5), 353–360.
16. Hordijk, P., Anthony, E., Mul, F., Rientsma, R., Oomen, L., and Roos, D. (1999) *Journal of Cell Science*, **112**, 1915–1923.
17. Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995) *Cell*, **81**, 1159–1170.
18. Liu, G., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2005) *JBC*, **280** (47), 39042–39049.
19. Braga, V.M., Del Maschio, A., Machesky, L., and Dejana, E. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**(1), 9–22.
20. Essler, M., Amano, M., Kruse, H.-J., Kaibuchi, K., Weber, P., and Aepfelbacher, M. (1998) *JBC*, **273** (34), 21867–21874.
21. Ponimashkin, E.G., Profirovich, J., Vaskunaite, R., Ritcher, D.W., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2002) *JBC*, **277** (23), 20812–20819.
22. Bishop, A.L., and Hall, A. (2000) *Biochem. J.*, **348**, 241–255.
23. Wojciak-Stothard, B., Ridley, A.J. (2003) *Vascular Pharmacology*, **39**, 187–199.
24. Vouret-Craviari, V., Bourcier, C., Boutler, E., and van Obberghen-Schilling, E. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 2475–2484.
25. Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovich, J., Minshall, J., Neamu, R., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2005) *JBC*, **280** (28), 26533–26542.
26. Birukova, A., Smurova, K., Birukov, K., Usatyuk, P., Liu, F., Kaibuchi, K., Ricks-Cord, A. et al. (2004) *J. Cell. Physiol.*, **201**, 55–70.

27. Bogatcheva, N., Adyshev, D., Mambetsariev, B., Moldobaeva, and Verin, A. (2007) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **292**, 487–499.
28. Batard, P., Jordan, M., and Wurm, F. (2007) *Gene*, **270**, 61–68.
29. Ponimashkin, E., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, W., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2002) *JBC.*, **277** (23), 20812–20819.

T-CADHERIN ACTIVATES RAC1 AND CDC42 AND CHANGES ENDOTHELIAL PERMEABILITY

**E. V. Semina¹, K. A. Rubina², P. N. Rutkevich¹,
T. A. Voyno-Yasenetskaya³, Y. V. Parfyonova¹, V. A. Tkachuk²**

¹ *Institute of Experimental Cardiology, Cardiology
Research Center, 3rd Cherepkovskaya ul., 15a,
Moscow 121552, Russia; fax (495)414-6712*

² *Faculty of Fundamental Medicine, M. V. Lomonosov
Moscow State University, Moscow 117192, Russia;
fax: (495)932-9904, E-mail: rkzeniya@mail.ru*

³ *Department of Pharmacology, University
of Illinois at Chicago, Chicago, USA;
fax: (312)996-1225*

Received October 2, 2008

Revision received November 20, 2008

In the present study we show that plasmid expression of T-cadherin induces intracellular signaling in NIH3T3 fibroblasts: activation of Rac1 and Cdc42 ($p < 0.01$), but not RhoA. We created adenovirus constructs for T-cadherin overexpression in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and lentivirus constructs for down-regulation of endogenous T-cadherin expression in HUVEC. In HUVEC cells T-cadherin overexpression induced microtubule disassembly and polymerization of actin stress fibers. Down-regulation of T-cadherin expression in HUVEC cells had an opposite effect resulting in microtubule polymerization and actin stress fiber disassembly.

Key words: T-cadherin, Rho GTPases, endothelial cell permeability, microtubules, actin