

На правах рукописи

РУБИНА КСЕНИЯ АНДРЕЕВНА

**Т-КАДГЕРИН В ПРОЦЕССАХ РОСТА,
РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ И
ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ**

Специальность 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук**

Москва - 2015

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории постгеномных технологий в медицине Факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный консультант:

Ткачук Всеволод Арсеньевич

доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты:

Буравкова Людмила Борисовна,

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Ученый секретарь Института, заведующая лабораторией «Клеточной физиологии» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации - Института медико-биологических проблем РАН

Глушанкова Наталия Александровна,

доктор биологических наук, заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина"

Домарацкая Елена Ивановна,

доктор биологических наук, заведующая лабораторией Клеточных и молекулярных механизмов гистогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Защита диссертации состоится «20» октября 2015 года в 15.30 на заседании совета Д.501.001.52 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу 119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.12, Биологический факультет, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте биологического факультета www.bio.msu.ru.

Автореферат разослан «.....»

2015 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Калистратова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы исследования. Формирование, развитие и поддержание структуры и функции большинства органов и тканей напрямую зависит от их кровоснабжения. Во взрослом организме сосудистая система находится в состоянии равновесия, процессы роста или регрессии сосудов четко регулируются: формирование кровеносных сосудов *de novo* происходит при репарации и регенерации, при циклических изменениях в женской половой системе или при патологии. Сердечно-сосудистые и онкологические заболевания являются ведущими причинами заболеваемости и смертности во всем мире. В основе этих заболеваний лежит либо недостаточный, либо избыточный ангиогенез (Folkman, 2008; Carmeliet, 2003).

В современной биологической науке достаточно хорошо изучены морфогенетические процессы, происходящие в эмбриогенезе, однако существенно меньше известно о генетических и эпигенетических механизмах построения архитектуры и поддержания целостности органов и тканей во взрослом организме. Детальное изучение молекулярно-биологических, биохимических и клеточных механизмов этих процессов, безусловно, является актуальной задачей современной биологии и медицины. Помимо решения проблемы понимания фундаментальных основ организации и функционирования органов и тканей, существуют практические задачи регенеративной медицины, такие как восстановление структуры и функции при различных ишемических и дегенеративных заболеваниях. В основе многих регенеративных процессов лежит обеспечение кровоснабжением поврежденных тканей. Понимание регуляции основных процессов ангиогенеза необходимо для разработки современных подходов в регенеративной медицине. Эти же знания необходимы при разработке новых лекарств, направленных на блокирование процессов роста сосудов при избыточном или aberrантном ангиогенезе, которые выходят из-под физиологического контроля при различных заболеваниях (Folkman, 2008; Potente et al., 2011).

В последнее время помимо основных молекул, участвующих в процессах ангиогенеза, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, большое внимание уделяется изучению навигационных молекул, которые определяют направление роста вновь формирующихся сосудов. Помимо контролирования траектории роста сосудов в эмбриогенезе и регенерации, навигационные молекулы играют важную роль при патологическом ангиогенезе. Т-кадгерин является навигационной молекулой, для которой ранее было обнаружено участие в регуляции направленного роста аксонов. Во взрослом организме человека максимальная экспрессия Т-кадгерина выявляется в сердечно-сосудистой и нервной системах, повышение его экспрессии наблюдается при различных патологиях. Функция Т-кадгерина в сосудах до сих пор оставалась неизвестна. Изучение роли Т-кадгерина в процессах физиологического и патологического

ангиогенеза, ремоделирования сосудов важно для понимания фундаментальных механизмов морфогенетических процессов в эмбриогенезе и во взрослом организме, а также для решения современных задач регенеративной медицины.

Степень разработанности темы исследования. Сопоставление полученных результатов с мировым уровнем.

Т-кадгерин, впервые был обнаружен более 20 лет назад в эмбриональном мозге цыпленка (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991), в развивающейся нервной системе он функционирует как «молекула отталкивания». О роли Т-кадгерина в формировании сердечно-сосудистой системы в эмбриогенезе млекопитающих данных в литературе до сих пор не было. В настоящем исследовании впервые получены данные об экспрессии Т-кадгерина в развивающейся сердечно-сосудистой системе и головном мозге на стадии активного формирования органных структур и их васкуляризации.

Известно, что во взрослом организме человека максимальная экспрессия Т-кадгерина организме наблюдается не только в нервной, но и в сердечно-сосудистой системе (Ivanov et al., 2001; Kudrjashova et al., 2002). Мы предположили, что Т-кадгерин может участвовать в процессах ангиогенеза. Полученные нами данные на моделях *in vitro* и *in vivo*, позволяют утверждать, что Т-кадгерин является «молекулой отталкивания» и ингибирует процессы ангиогенеза на уровне миграции эндотелиальных клеток и формирования мелких сосудов и капилляров. В основе этих эффектов лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина (Rubina et al., 2007). Данные об участии Т-кадгерина в подавлении процессов ангиогенеза получены впервые.

В литературе существуют противоречивые данные о роли Т-кадгерина в опухолевой прогрессии (Sato et al., 1998; Maruyama et al., 2001; Zucchini et al., 2004; Adachi et al., 2006; Riou et al., 2006; Riener et al., 2008; Suehiro et al., 2008; Andreeva and Kutuzov, 2010). Полученные в настоящей работе данные на биопсийном материале предраковых состояний кожи, рака кожи и меланомы человека свидетельствуют о корреляции между снижением уровня экспрессии Т-кадгерина и малигнизацией новообразований кожи (Rubina et al., 2012; Rubina et al., 2013).

Для установления причинно-следственной связи между экспрессией Т-кадгерина и опухолевой прогрессией мы использовали модель роста агрессивной меланомы у мышей, метастазирующей в легкие. Полученные результаты подтверждают тот факт, что Т-кадгерин является антиангиогенной молекулой (Yurlova et al., 2010; Rubina et al., 2013).

Известно, что экспрессия Т-кадгерина повышается в сосудах при атеросклерозе и рестенозе (Ivanov et al., 2001, Kudrjashova et al., 2002). Физиологическая роль Т-кадгерина в этих процессах долгое время оставалась неизвестна. В настоящей работе установлено, что Т-кадгерин является рецептором ЛНП, опосредующим активацию внутриклеточной сигнализации

с участием $[Ca^{2+}]_{in}$ и миграцию клеток по градиенту ЛНП (Rubina et al., 2005).

Многие патологические состояния, в том числе атеросклероз, сопровождаются эндотелиальной дисфункцией, которая физиологически характеризуется нарушением межклеточных контактов и увеличением проницаемости эндотелия (Frey et al., 2009). В настоящей работе мы обнаружили, что Т-кадгерин является фактором, влияющим на барьерную функцию эндотелия и впервые раскрыли биохимические и молекулярно-биологические механизмы участия Т-кадгерина в регуляции проницаемости эндотелия.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования было изучение роли Т-кадгерина в процессах роста и функционирования кровеносных сосудов. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие экспериментальные задачи:

1. Выявить экспрессию мРНК и белка Т-кадгерина в головном мозге и сердце в раннем эмбриональном развитии у мыши.
2. Определить характер экспрессии Т-кадгерина в кератиноцитах и кровеносных сосудах новообразований кожи различной степени злокачественности, а также в кровеносных сосудах и опухолевых клетках меланомы человека.
3. Изучить влияние экспрессии Т-кадгерина на пролиферативную активность и уровень апоптоза в клетках мышинной меланомы B16F10 *in vitro*. Оценить влияние экспрессии Т-кадгерина на скорость роста первичных узлов мышинной меланомы и характер их васкуляризации *in vivo*. Сравнить клетки мышинной меланомы с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина по их способности к метастазированию и инвазии.
4. Оценить влияние экспрессии Т-кадгерина на уровень экспрессии ингибиторов и активаторов ангиогенеза, хемокинов и их рецепторов, факторов роста, молекул адгезии и протеаз в клетках мышинной меланомы *in vitro*.
5. Изучить влияние экспрессии Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы на их способность стимулировать неоангиогенез на модели хориоаллантаоисной мембраны куриного эмбриона.
6. Оценить влияние Т-кадгерина на васкуляризацию бляшек Матригеля у мышей при подкожном введении клеток с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина.
7. Изучить влияние Т-кадгерина на пролиферацию, адгезию, апоптоз, миграцию эндотелиальных клеток и формирование ими капилляро-подобных трубочек *in vitro*.
8. Изучить влияние гиперэкспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках на барьерную функцию эндотелия *in vitro*.
9. Выявить экспрессию Т-кадгерина в различных слоях нормальной аорты и в сосудах человека при атеросклерозе.

10. Изучить влияние гиперэкспрессии Т-кадгерина на характер связывания ЛНП с мембранами клеток, внутриклеточную сигнализацию и миграцию клеток по градиенту ЛНП.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенных исследований впервые получены данные о том, что Т-кадгерин участвует в регуляции процессов ангиогенеза.

Известно, что Т-кадгерин экспрессируется в развивающейся нервной системе у птиц и функционирует при этом как «молекула отталкивания». Данных об экспрессии Т-кадгерина у млекопитающих в эмбриогенезе в литературе до настоящей работы не было. Используя методы *in situ* гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией в работе впервые получены данные о начале экспрессии Т-кадгерина на уровне мРНК и белка в развивающемся головном мозге и в сердце в раннем эмбриональном развитии у мыши.

Полученные результаты внесли существенный вклад в расширение системы фундаментальных знаний о роли и функционировании навигационных рецепторов в процессах ангиогенеза в норме и при патологии. Использование различных экспериментальных подходов и моделей *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* позволило получить свидетельства того, что Т-кадгерин является навигационной молекулой, опосредующей негативное регулирование роста кровеносных сосудов. Т-кадгерин подавляет начальные этапы ангиогенеза, но не влияет на процессы созревания сосудов. В основе эффектов Т-кадгерина лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на контактирующих клетках.

Несмотря на обнаруженный нами антиангиогенный эффект Т-кадгерина как в физиологических условиях, так и при опухолевом росте, мы считаем, что Т-кадгерин не может считаться фактором опухолевой супрессии, поскольку при гиперэкспрессии Т-кадгерина опухолевые клетки способны активировать компенсаторные механизмы, способствующие повышению их выживаемости, миграции, инвазии и метастазированию.

При ангиогенезе помимо вновь формирующихся сосудов Т-кадгерин экспрессирован в зрелых стабильных сосудах взрослого организма. Его экспрессия повышается при таких патологических состояниях сосудов, при которых развивается эндотелиальная дисфункция. Впервые обнаружено, что Т-кадгерин влияет на проницаемость эндотелиального монослоя: гиперэкспрессия Т-кадгерина приводит к снижению барьерной функции эндотелия, а подавление Т-кадгерина – наоборот. Раскрыты биохимические и молекулярно-биологические механизмы участия Т-кадгерина в регуляции проницаемости эндотелия. Эффекты Т-кадгерина развиваются путем активацией малых Rho ГТФаз, их нисходящих сигнальных посредников ROCK-II, LIMK и PAK1, за счет перестройки актинового цитоскелета и микротрубочек, интернализации VE-кадгерина с поверхности мембраны и его деградации в лизосомах.

В заключительной части работы показано, что помимо гомофильного взаимодействия Т-кадгерин способен связывать ЛНП. Являясь специфическим низкоаффинным рецептором ЛНП, Т-кадгерин опосредует сигнальные эффекты ЛНП в клетках - повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} за счет его выход из эндоплазматического ретикула и активацию миграции клеток по градиенту ЛНП.

Методология исследования. В начале 90-х годов Т-кадгерин был клонирован из эмбрионального мозга цыпленка, где он функционирует как молекула «отталкивания» в развивающейся нервной системе. Позднее было обнаружено, что Т-кадгерин экспрессируется во взрослом организме человека в нервной и сердечно-сосудистой системе. Долгое время было неизвестно, экспрессируется ли Т-кадгерин в эмбриогенезе млекопитающих, а также какую роль он играет в сосудах во взрослом организме. Нами была выдвинута гипотеза о том, что, возможно, Т-кадгерин является навигационной молекулой не только в нервной системе, но и в сосудах, где он участвует в определении траектории их роста. Использование методов *in situ* гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией позволило нам выявить стадии, соответствующие началу экспрессии Т-кадгерина на уровне мРНК и белка в раннем эмбриональном развитии у мыши. Далее с использованием биохимических и молекулярно-биологических методов, физиологических и клеточно-биологических подходов к изучению Т-кадгерина в сосудах мы охарактеризовали функцию Т-кадгерина как навигационной молекулы, осуществляющей негативное регулирование роста сосудов как в процессах физиологического ангиогенеза на моделях *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, так и при опухолевом неоангиогенезе. В основе этих антиангиогенных эффектов лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на контактирующих клетках, что было продемонстрировано с использованием клеточных и органных культур, а также рекомбинантных доменов Т-кадгерина. Для выявления функции Т-кадгерина в зрелых сосудах изучали влияние гиперэкспрессии или подавления экспрессии Т-кадгерина (с помощью аденовирусных и лентивирусных конструкций) на проницаемость эндотелия. Было обнаружено, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках повышает проницаемость эндотелиального монослоя, а подавление Т-кадгерина – повышает барьерную функцию эндотелия. Использование методов клеточного фракционирования, электрофореза и иммуноблоттинга, иммунофлуоресцентного окрашивания в сочетании с конфокальной микроскопией позволило выявить основные белки-участники сигнального каскада, запускаемого с участием Т-кадгерина в эндотелиальных клетках (Rho белки, киназы ROCK-II, LIMK и PAK1), а также механизмы повышения проницаемости в виде эндоцитоза VE-кадгерина и перестройки цитоскелета. Эндотелиальная дисфункция часто сопутствует различным патологическим состояниям в сосудистой стенке. Методом

иммуногистохимического окрашивания было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина повышается в сосудах с атеросклеротическими поражениями, что коррелирует с накоплением липидов в сосудистой стенке. Анализ параметров специфического связывания меченных ЛНП с поверхностью клеток позволил получить результаты, свидетельствующие о том, что Т-кадгерин является рецептором ЛНП, который опосредует Ca^{2+} -сигнализацию и направленную миграцию клеток по градиенту концентрации ЛНП.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Основные результаты работы были представлены на всероссийских конференциях: Конгресс Российская Кардиология: от центра к регионам в Томске (2004), XX съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова в Москве (2007), Пятый съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова в Москве (2008), Всероссийская научная конференция с международным участием «Нанотехнологии в онкологии 2008» в Москве (2008), IV Всероссийская научная школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина», Москва (2011), V Всероссийская научная школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (2013); на международных конференциях: 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, USA (2004), XIV International Vascular Biology Meeting, Netherlands (2006), 20th IMSSC (International Medical Sciences Student congress), Turkey (2006), Third International Meeting on Angiogenesis, Netherlands (2007), Third International Meeting on Angiogenesis, Netherlands (2007), Annual meeting of The International society for cell and gene therapy of cancer, Ireland (2009), The 16th International Vascular Biology Meeting, USA (2010), 35th FEBS Congress «Molecules of life», Sweden (2010), 4th International Meeting on Angiogenesis, Netherlands (2011), International Vascular Biology Meeting, Germany (2012), 6th Annual World Cancer Congress, China. (2013).

Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями в рецензируемых научных журналах, показателями их цитируемости в системах Web of Science и Scopus (336). Получен патент РФ #2292395 (2007).

По теме диссертации опубликовано 47 печатных работ, которые достаточно полно отражают результаты научного исследования, в том числе **16** статей в российских и зарубежных реферируемых научных журналах, **6** глав в книгах и сборниках, тезисы **24** докладов на научно-практических конференциях и конгрессах и **1** патент на изобретение. Из них статей в российских журналах, соответствующих перечню ВАК РФ, опубликовано **11**, Web of Science – **10**, Scopus – **8**, что подтверждает полноту опубликования результатов диссертационного исследования. Достоверность полученных результатов подтверждается показателями цитируемости публикаций в системах РИНЦ, Web of Science, и Scopus - **356**; индекс Хирша – **7**.

Непосредственное участие **К.А. Рубиной** заключалось в планировании и организации исследований, методической разработке и постановке экспериментов, анализе результатов исследований, формулировке научных положений и выводов, написании статей. Соавторы указаны в публикациях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 405 страницах машинописного текста, содержит 138 рисунков, 7 таблиц. Состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Библиография включает 581 ссылку.

В результате выполнения диссертационной работы были сформулированы следующие **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

ПОЛОЖЕНИЕ 1: Экспрессия Т-кадгерина в головном мозге и сердечно-сосудистой системе выявляется в раннем эмбриональном развитии у мыши и коррелирует с процессами активного формирования органных структур и их васкуляризации. Т-кадгерин является навигационной молекулой, регулирующей процессы ангиогенеза. Экспрессия Т-кадгерина в клетках стромы подавляет прорастание в нее кровеносных сосудов. В основе эффектов Т-кадгерина лежит гомофильное взаимодействие, подавление миграции эндотелиальных клеток и формирования капилляро-подобных структур.

ПОЛОЖЕНИЕ 2: В постнатальный период Т-кадгерин участвует в регуляции барьерной функции эндотелия: экспрессия Т-кадгерина в клетках повышает проницаемость эндотелиального монослоя, а подавление Т-кадгерина - снижает. Регуляция проницаемости эндотелия Т-кадгерином осуществляется при участии Rho белков и киназ (ROCK-II, LIMK и PAK1) и сопровождается эндоцитозом VE- кадгерина, перестройкой актинового и тубулинового цитоскелета.

ПОЛОЖЕНИЕ 3: Т-кадгерин экспрессируется в интиме, меди и адвентиции нормальной аорты во всех слоях; экспрессия Т-кадгерина повышается при атеросклерозе в липидной полоске, нестабильной фиброатероме и при мягком кальцинозе. Т-кадгерин является рецептором ЛНП, опосредующим Ca^{2+} сигнализацию и направленную миграцию клеток по градиенту концентрации ЛНП.

ПОЛОЖЕНИЕ 4: При неопластических процессах наблюдается снижение уровня экспрессии Т-кадгерина, что коррелирует со степенью злокачественности таких новообразований кожи человека, как псориаз, кератоз, кератоакантома, базалиома, плоскоклеточный, метатипический рак и меланома. На модели опухолевого роста гематогенно метастазирующей в легкие меланомы у мышей показано, что экспрессия Т-кадгерина в

опухолевых клетках приводит к подавлению неоангиогенеза в первичном узле. Однако Т-кадгерин не может считаться опухолевым супрессором, поскольку клетки меланомы, экспрессирующие Т-кадгерин, «включают» гены, способствующие их большей выживаемости, миграции, инвазии и метастазированию.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культивирование клеток. В работе были использованы: первичная культура эндотелиальных клеток пуповины человека HUVEC 0-6 пассажа (Cambrex), первичная культура стромальных клеток из подкожной жировой клетчатки мыши, линия клеток мышинных фибробластов L929 (ATCC №CCL-1) и HIN3T3 (ATCC №CRL-1658), линия клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293 (ATCC №CRL-1573) и линия опухолевых клеток мышинной меланомы B16F10 (ATCC №CRL-6475). Для культивирования L929, HIN3T3 и HEK293 клеток использовали среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), с добавлением пенициллина (100 ед/мл), стрептомицина (0,1 мг/мл) и 10% фетальной бычьей сывороткой (Fetal Bovine Serum, FBS). Для культивирования клеток B16F10 использовали RPMI1640, содержащую пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (0,1 мг/мл), 10% FBS и 0,2 мМ L-глутамин. Клетки HUVEC культивировали в среде EGM-2 (CC-4176, Lonza Cambrex), с добавлением факторов роста (SingleQuots® Kit, Cambrex), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (0,1 мг/мл).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Антитела и реагенты. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки, криосрезы образцов тканей животных или человека, эмбрионы мыши фиксировали 4% раствором формальдегида и пермеабилizовали в 1% растворе детергента Тритон X-100 (Sigmaaldrich). Для блокирования неспецифического связывания образцы инкубировали в буфере ФСБ, содержащем 10% сыворотки донора вторых антител и 1% БСА. После промывок и инкубаций в растворе первых и вторых антител образцы заключали в реагент ProLong® Antifade, содержащий DAPI (Invitrogen) для визуализации ядер или Aqua POLY/MOUNT (Polysciences).

В работе использовали первые антитела, узнающие CD31 – маркер эндотелиальных клеток (BD), Т-кадгерин (ProSci), α -SMA альфа гладкомышечный актин (Epitomic), NG2 (Chemicon), CD90 маркер активированной стромы (BD), vWF маркер эндотелия (BD), VE-кадгерин (Abcam), фосфорилированный VE-кадгерин Y658 и Y731 (Abcam), N-кадгерин (SantaCruz), бета-катенин (Abcam), фосфорилированный бета-катенин T41(Abcam), катенин p120ctn (SantaCruz), клатрин (Abcam), киназу PAK1 (Abcam), фосфорилированную киназу PAK1 T212 (Abcam), киназу ROCK-II (SantaCruz), Src киназу (Abcam), фосфорилированную Src

Y418 (Abcam), киназу p38 (Sigmaaldrich), фосфорилированную киназу p38 T180+T202 (Abcam), киназу Erk1/2 (Abcam), белки плотных контактов ZO-1 (Invitrogen), окклюдин (Abcam), клаудин-5 (Invitrogen), кавеолин-1 (BD), EEA1- маркер для выявления мембранной фракции и фракции белков ранних эндосом (Abcam), LAMP1- маркер для выявления белков цитоплазмы, лизосомальный белок (Abcam), GAPDH (Sigmaaldrich, Santa Cruz), киназу LIMK1 (Cell Signaling Technology), Anti-acetylated α -тубулин (Sigmaaldrich), c-Мyc эпитоп (Santa Cruz), маркер меланоцитов (gp100) Ab-3 (Lab Vision- Neomarkers), PCNA антиген ядер (DakoCytomation). В качестве вторых антител для иммунофлуоресцентного окрашивания использовали флуоресцентно-меченные антитела (Molecular Probes), для иммуногистохимического окрашивания - антитела производства Jackson Immuno-Research Laboratories.

Для подавления эндоцитоза клетки преинкубировали с раствором диназора (dynasore, Sigmaaldrich). Для выявления лизосом использовали прижизненный краситель – маркер лизосом LysoTracker® RED (Invitrogen). Для подавления активации малых Rho ГТФаз использовали специфический ингибитором Y27632 (Sigmaaldrich). Также использовали: ацетилированные липопротеиды низкой плотности (ЛНП), конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor488 (Invitrogen); фаллоидин для окраски актиновых стресс фибрилл phalloidin AlexaFluor488 (Molecular Probes); реагенты для определения апоптоза и некроза клеток AnV-PE (Аннексин V – фикоэритрин, BD Biosciences) и 7-AAD (BD), соответственно.

Окрашивание визуализировали с использованием микроскопов Leica DM 6000 и Axiovert 200M. Документирование изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры AxioCam HRc и обработки в программе Axiovision (Zeiss) и LAS AF (Leica). Также использовали сканирующий лазерный конфокальный микроскоп (модель TCS SP5, Leica) с последующим анализом с помощью программного обеспечения LAS AF (Leica) и Photoshop (версия CS5, Adobe). Все изображения получали при одинаковых настройках интенсивности лазеров и времени экспозиции.

Трансфекция эукариотических клеток. Клетки трансфицировали полноразмерной кДНК для экспрессии Т-кадгерина человека, клонированной в плазмиду pcDNATM3.1 (Invitrogen, США) (Rubina et al., 2005). Трансфекцию проводили с использованием агента LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, США) с последующей селекцией на антибиотике G418 (Geneticin®, Invitrogen, США). Для ко-экспрессии Т-кадгерина и LIMK1 клетки ко-трансфицировали плазмидами pcDNA3.1/Т-кад и мус-LIMK1. Для подавления экспрессии Т-кадгерина РНК интерференцией (siRNA), HUVEC ко-трансфицировали интерферирующими РНК последовательностями (Dharmacon) (siRNA/Т-кад). В качестве контроля использовали плазмиды pcDNA3.1 (содержит фрагмент кДНК люциферазы в анти-смысловой ориентации) и/или pcDNA3.1/GFP.

Гиперэкспрессия Т-кадгерина с использованием вирусных конструкций. Для гиперэкспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках HUVEC была создана конструкция рSIH-H1-Т-кад на основе лентивирусного вектора рSIH1-H1-puro (System Bioscience) (Semina et al., 2014), а также использовали аденовирусную конструкцию, созданную на основе экспрессионной системы AdEasyTM (Quantum Biotechnologies). Уровень экспрессии белка после трансфекции и трансдукции подтверждали методом Вестерн блоттинга и денситометрическим анализом.

Электрофорез белков и вестерн блоттинг.

Белки экстрагировали в лизирующем буфере (Rubina et al., 2014). Концентрацию белка в лизате определяли методом Бредфорда (Bradford, 1976). Электрофорез проводили в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (SDS, Sodium Dodecyl Sulphate) с использованием буфера Лаеммли (Laemmli), плотность геля в экспериментах составляла 7,5%-14%. После переноса белков на мембрану (Millipore) для блокирования неспецифического связывания мембрану инкубировали в 5% растворе обезжиренного молока на ФСБ с добавлением 0,05% Tween 20 (Pierce). Мембрану последовательно инкубировали с первыми и вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена HRP (Jackson Immuno-Research Laboratories). Для вестерн блоттинга использовали реагенты производства Bio-Rad и Sigmaaldrich. Для проявления сигнала использовали систему ECLTM Western Blotting Detection Reagents и плёнку CL-XposureTM Film (всё от Amersham). Денситометрический анализ результатов проводили на приборе GS-800 Calibrated Densitometer (Bio Rad) с использованием программного обеспечения Quantity One 4.6 Software (Bio Rad).

Для выявления белков в различных клеточных компартментах клетки перед вестерн блоттингом разделяли на фракции. Субклеточные фракции (цитозольную, мембранную и ядерную) получали с использованием коммерческого набора QproteomeTM Cell Compartment kit (Qiagen).

Определение поверхностного связывания ^{125}I -ЛНП с клетками. ЛНП (р 1,019-1,023 г/мл) выделяли из свежей плазмы здоровых доноров методом препаративного ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaBr (Havel et al., 1955). Для йодирования ЛНП радиоактивным йодом ^{125}I по тирозиновым остаткам белков использовали монохлорид йода (Goldstein et al., 1985).

К клеткам добавляли по 1 мл среды, содержащей 0, 5, 10, 25, 50, 75 и 100 мкг/мл меченных ЛНП. Для определения неспецифического связывания добавляли 50-кратный избыток немеченых ЛНП. Среду, содержащую не связавшиеся ЛНП, аспирировали. Клетки лизировали раствором, содержащим 1% SDS и 0,1 М NaOH. Связанную с клетками радиоактивность определяли в лизатах с помощью γ -счетчика. Данные по специфическому

связыванию меченных ^{125}I -ЛНП с клетками, анализировали с помощью линейной и нелинейной регрессии с использованием программы Graph Pad Prism 4.0 для определения числа участков связывания (B_{max}) и константы диссоциации (K_d).

Определение изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в ответ на добавление ЛНП в среду культивирования клеток. Измерение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в клетках проводили методом флуоресцентной микроскопии с использованием двухволнового зонда FURA-2AM (Beck et al., 2004). Для возбуждения флуоресценции использовали волны длиной $\lambda_{\text{ex}} = 340$ и 380 нм, для эмиссии - фильтр, пропускающий 505 ± 10 нм.

Клетки инкубировали в присутствии ацетоксиметильного эфира высокоаффинного зонда Fura-2AM в концентрации 5 мкМ (Grynkewicz et al., 1985) и помещали в перфузионную камеру, в которую добавляли тестируемые агенты. Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ анализировали с помощью инвертированного микроскопа (Axiovert 200, Zeiss), видеокамеры (Cool Snapfx CCD camera, Roper Sci Inc.) и программного обеспечения AnalySys, позволяющего регистрировать изображение от нескольких клеток одновременно. Результаты обрабатывали с использованием статистических программ Graph Pad Prism 4.0 и Statistics 6.0.

Измерение проницаемости эндотелиального монослоя *in vitro*. Проницаемость эндотелиального монослоя определяли, используя системы Трансвелл (размер пор $0,4$ мкм, Transwell®, Corning) (Semina et al., 2009). Эндотелиальные клетки высаживали в верхнюю камеру и культивировали до достижения конфлюэнтного монослоя. В верхнюю камеру добавляли раствор FITC-декстрана (FITC-dextran, мол. масса 40 кДа, Sigmaaldrich). Через каждые 60 минут из нижней камеры отбирали аликвоты и измеряли интенсивность флуоресценции на приборе Envision® Multilabel Reader (Perkin Elmer) при длине волны 525 нм.

Анализ миграции клеток в камере Бойдена. Для подтверждения гомофильного механизма в основе эффектов Т-кадгерина анализировали миграцию клеток через мембрану с размером пор 8 мкм (Neuro Probe Inc.), покрытую рекомбинантными доменами Т-кадгерина (EC1 или EC5). Эффекты Т-кадгерина на миграцию клеток по градиенту ЛНП анализировали, высаживая клетки с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина в верхнюю камеру, в нижнюю добавляли ЛНП или ЛНП, преинкубированные с антителами против ЛНП. Мембрану с промигрировавшими клетками окрашивали Diff-Quik® Staining Kit (Dade Behring GmbH, Marburg, Germany), изображения анализировали в программе Image-J (National Institute of Health) или Scion Image software (Scion Corporation).

Метод измерения клеточного индекса. Оценку пролиферации клеток проводили с использованием системы xCELLigence (Roche) на планшетах E-plate (Roche). Планшеты с клетками (5×10^3 клеток на лунку) помещали в RTCA Station и анализировали динамику адгезии

и пролиферации клеток в режиме реального времени в течение 96 часов. Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.2.1 (Roche).

Метод изучения формирования капилляро-подобных структур в Матригеле. Для оценки влияния Т-кадгерина на формирование капилляро-подобных структур HUVES высевали в планшеты, покрытые Матригелем без факторов роста (Matrigel® BD Biosciences). Матригель предварительно покрывали раствором EC1 или EC5 доменов Т-кадгерина. Также использовали модель органной культуры сосудистого колечка крысы в Матригеле *ex vivo*. Кусочки грудной аорты крыс помещали в Матригель, предварительно смешанный с EC1 или EC5 доменами Т-кадгерина. Экспланты инкубировали в течение 14 дней, прижизненно регистрируя формирование капилляро-подобных структур.

Суммарную длину формирующихся капилляро-подобных структур оценивали, используя программу MetaMorph 5.0 (Universal Imaging).

Экспериментальные животные. Экспрессию Т-кадгерина в эмбриогенезе у мыши анализировали на эмбрионах, полученных от гибридов F1 линий CBA/C57Bl.

В экспериментах по изучению влияния Т-кадгерина на рост и метастазирование меланомы использовали мышей гибридной линии BDF1 (самцы).

Влияние Т-кадгерина на васкуляризацию имплантированного подкожно Матригеля проводили на бестимусных мышах линии NUDE.

Мезенхимные стромальные клетки жировой ткани (МСК-ЖТ) мыши выделяли из подкожного жира самцов линии CBA/C57BL.

Гибридизация эмбрионов мыши *in situ*. Для выявления экспрессии мРНК Т-кадгерина использовали плазмиду pFLCI (Imagenes, Germany) со встроенной EST (expressed sequence tag) последовательностью кДНК Т-кадгерина или контрольную плазмиду Bluescript KS со встроенной EST ДНК Krox20 (положительный контроль). EST последовательности были выбраны из электронной базы данных Gen Bank. Очистку и выделение плазмид проводили с помощью коммерческого набора EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Для линейаризации плазмидную ДНК обрабатывали рестриктазами: Bam HI (Fermentas) для Krox20 - Not I (Fermentas), и Bam HI для Т-кадгерина. Для синтеза РНК пробы прямой последовательности Т-кадгерина (отрицательный контроль) использовали Т7 РНК-полимеразу (Promega), для синтеза обратной РНК пробы Т-кадгерина и Krox 20 использовали Т3 РНК-полимеразу (Fermentas). Полученные РНК пробы очищали на колонке RNAspin Mini (GE Healthcare). *In situ* гибридизацию проводили на эмбрионах мыши E8.75, E9.5 и E10.5 стадий развития (Рубина и др., 2015). Для визуализации окрашивания использовали стереомикроскоп (Olympus SZX 16, камера AxioCam HRc, Zeiss) и программу Axio Vision 3.1.

Подкожная имплантация Матригеля мышам. Мышам линии NUDE под авертиновым наркозом подкожно вводили $1,7 \times 10^6$ клеток в 400 мкл холодного Матригеля (Matrigel® BD). Животных умерщвляли через 3, 7, 10 и 14 дней. Матригели извлекали и использовали для оценки содержания гемоглобина или для замораживания и последующего иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов Матригеля. Размер и плотность сосудов на криосрезах оценивали с помощью программного обеспечения MetaMorph (Universal Imaging) и ClickCounter.

Модель гематогенно метастазирующей в лёгкие меланомы у мышей *in vivo*. Анализировали параметры роста и характер васкуляризации первичного опухолевого узла, а также частоту метастазирования и легочный коэффициент (ЛК) у мышей. Мышам линии BDF1 подкожно вводили суспензию клеток меланомы B16F10 в количестве 1×10^6 клеток. Использовали клетки поликлональных культур и клонов меланомы с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина. По достижению опухоли размера 50 мм^3 мышей рандомизировали на 2 группы ($n = 11$). В первой группе опухоли удаляли хирургически на 10-й день после трансплантации, что приводило к метастазированию меланомы в легкие. Мышей из второй группы умерщвляли, когда размер опухоли достигал объема более 1000 мм^3 . Методом иммунофлуоресцентного окрашивания на криосрезах первичных узлов анализировали качественный и количественный состав прорастающих в опухоль сосудов, вклад стромального компонента в рост первичного узла, а также площадь очагов некроза.

Оценка уровня некроза и апоптоза клеток меланомы B16F10 *in vitro*. К клеткам добавляли раствор AnV-PE и раствор 7-AAD и анализировали количество некротических и апоптотических клеток с помощью проточной цитометрии на приборе FACS Canto II™ (BD Biosciences).

Оценка влияния среды культивирования от клеток клонов меланомы B16F10 на миграцию МСК-ЖТ. В эксперименте для анализа влияния секретируемых клетками меланомы факторов на миграцию МСК-ЖТ использовали систему Transwell® (Millipore) с мембраной (диаметр пор 8 мкм). Мембрану предварительно покрывали коллагеном I типа (Имтек, Россия). Клетки МСК-ЖТ сажали в концентрации 5×10^4 /мл в верхнюю камеру в среде RPMI1640 с 0,1% FBS. В нижнюю камеру высаживали клетки меланомы. В качестве контроля вместо меланомы использовали клетки NIH/3T3; в качестве положительного контроля - среду с 10% FBS. Клетки инкубировали 48 ч, промигрировавшие клетки МСК-ЖТ фиксировали, окрашивали гематоксилином Майера и подсчитывали.

Оценка инвазивного потенциала клеток B16F10 *in vitro*. Клетки мышинной меланомы в концентрации 3×10^5 /мл смешивали с Матригелем без факторов роста GFR Matrigel™ (Growth Factor Reduced Matrigel, BD) в соотношении 1:1 и серию капель по 2 мкл смеси полимеризовали

на чашках Петри. Затем на первую каплю Матригеля наносили 5 мкл Матригеля, содержащего факторы роста Matrigel™ (BD Biosciences) и полимеризовали. После этого чашки Петри заливали средой RPMI1640 с 10% FBS. Инвазивный потенциал клеток оценивали по способности клеток выползть из GFR Матригеля по градиенту хемоаттрактантов в Матригель с факторами роста и активно деградировать внеклеточный матрикс.

Анализ экспрессии генов в клетках клонов B16F10 in vitro. Выделение РНК из клонов клеток мышинной меланомы осуществляли с помощью коммерческого набора RNeasy Mini kit (Qiagen). Концентрацию и контроль качества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) с использованием программного обеспечения ND-1000 V 3.7.1 (Thermo Scientific). На матрице РНК в результате реакции обратной транскрипции синтезировали кДНК. Анализировали уровень экспрессии следующих генов: VEGF A, PDGF B, HGF, EGF, bFGF, uPAR, uPA, c-Met (рецептор HGF), MMP2, MMP9 и двух генов «домашнего хозяйства», GAPDH и β -актина. Специфические пары праймеры для анализа экспрессии генов были изготовлены фирмой Синтол (Россия).

Синтез кДНК и анализ профиля экспрессии генов с помощью наборов RT2 Profiler PCR Array. На матрице РНК с использованием RT2 First Strand Kit (SA Biosciences™) синтезировали кДНК согласно протоколу производителя. Для проведения реакции ПЦР использовали наборы реагентов RT2 Real-Time™ SYBR Green/Fluorescein PCR master mix (SA Biosciences™, США). Для анализа влияния экспрессии Т-кадгерина в клетках меланомы на изменение профиля экспрессии генов были использованы системы анализа RT2 Profiler PCR Array (SA Biosciences™), адаптированные для проведения ПЦР на приборе IQ5 (Bio Rad). Была проанализирована экспрессия генов внеклеточного матрикса, молекул адгезии, ангиогенных факторов и ингибиторов ангиогенеза, хемокинов и их рецепторов. Для нормализации использовали 5 генов «домашнего хозяйства»: B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH и β -актин.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. Данные представлены как mean $\pm$ SEM. Данные считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть 1. Выявление экспрессии Т-кадгерина в эмбриогенезе у мыши.

Экспрессию Т-кадгерина на ранних стадиях эмбрионального развития мыши выявляли, используя методы *in situ* гибридизации и иммуофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией.

Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном головном мозге мыши. мРНК Т-кадгерина обнаружена в формирующемся головном мозге, начиная со стадии E8.75 (рис.1): в

промежуточном и переднем мозге – во внутренней выстилке полости конечного мозга (telencephalon), в области глазных пузырей – в месте перехода промежуточного мозга в развивающиеся зрительные бугры. На стадии E9.5 экспрессия мРНК Т-кадгерина детектируется в переднем мозге, в утолщающейся обонятельной плакоде, в основании глазных пузырей, в области теменного изгиба, в месте перехода продолговатого мозга в спинной – в области затылочного изгиба. На стадии E10.5 экспрессия мРНК Т-кадгерина наблюдалась в среднем мозге, в формирующейся эпендимной крыше промежуточного мозга (диэнцефалон, *di*encephalon) и его латеральных областях. Специфическое окрашивание также было обнаружено в области сосудистого сплетения конечного мозга.

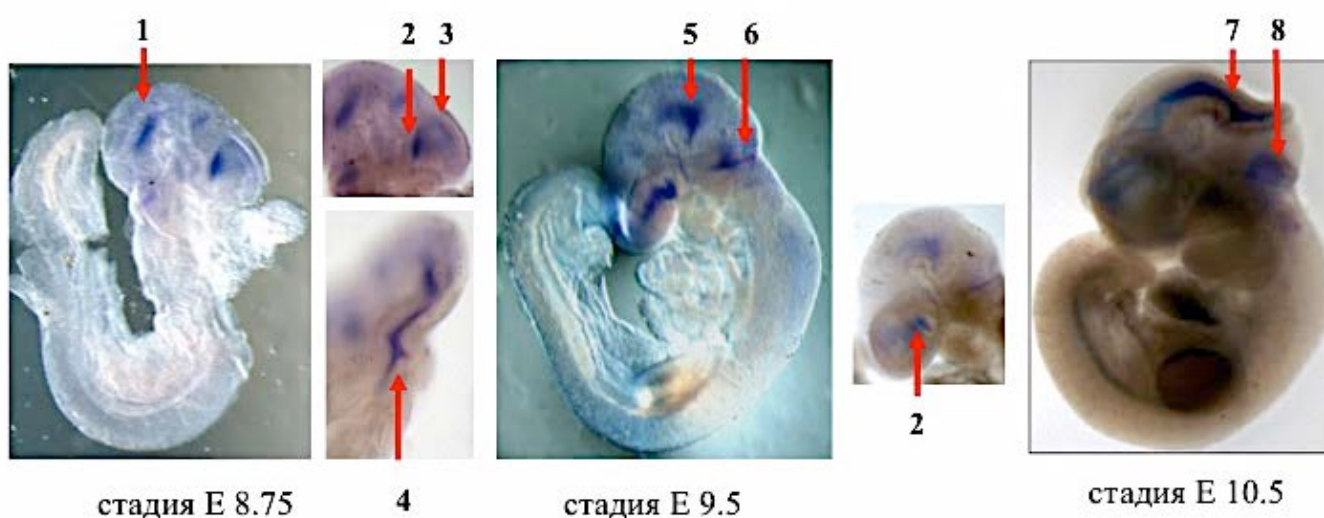


Рисунок 1. *In situ* гибридизация эмбрионов мыши на стадии E8.75. Экспрессия мРНК Т-кадгерина: 1 – в области среднего мозгового пузыря; 2 – в основании формирующегося глазного пузыря; 3 – во внутренней выстилке конечного мозга; 4 – в продолговатом мозге. 5, 6 – в области теменного и затылочного изгибов; 7, 8 - в крыше мозга в области затылочного изгиба. Увеличение в 3,2, 5 и 6 раз.

Экспрессия Т-кадгерина на уровне белка была выявлена, начиная со стадии E9.5, специфическое окрашивание наблюдалось в выстилках развивающегося головного мозга (рис. 2), в том числе в основании формирующихся глазных пузырей. Высокий уровень экспрессии Т-кадгерина во внутренней выстилке головного мозга отмечался, начиная со стадии E11.5: интенсивное специфическое окрашивание наблюдалось в области промежуточного мозга, формирующегося глазного бокала, а также в области среднего и заднего мозга.

Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном сердце. В эмбриональном сердце Т-кадгерин экспрессируется, начиная со стадии E11.5 (рис. 2). На стадиях E8.75, E9.5, E10.5 ни экспрессии мРНК Т-кадгерина, ни самого Т-кадгерина в формирующемся сердце обнаружено не было.

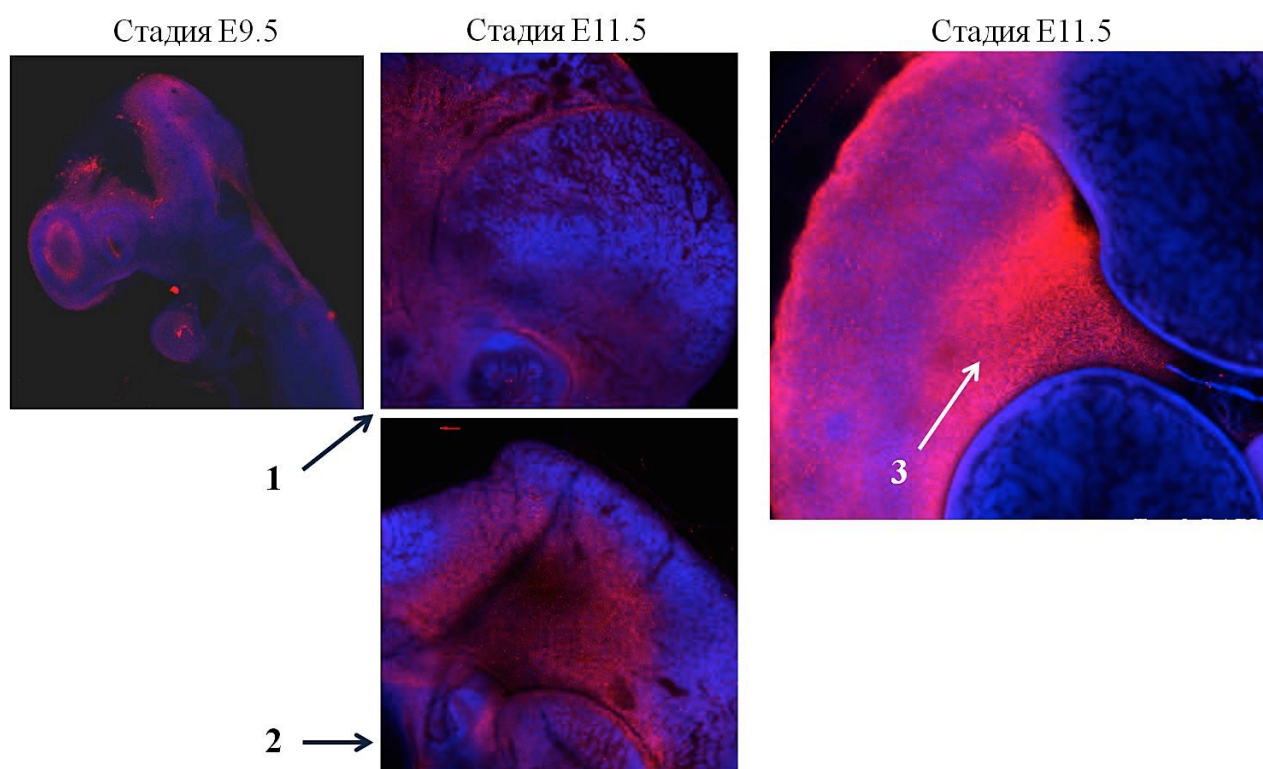


Рисунок. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши на стадиях E9.5 и E11.5. Специфическое окрашивание (красная флуоресценция) соответствует экспрессии Т-кадгерина в выстилках мозга и в сердце. 1 - экспрессия Т-кадгерина в области промежуточного мозга и формирующегося глазного бокала; 2 - в области среднего и заднего мозга; 3 - Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном сердце. Увеличение в 5 раз.

Полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия Т-кадгерина на уровне мРНК начинается со стадии E8.75 и выявляется в разных отделах эмбрионального головного мозга. Белок Т-кадгерин в эмбрионах детектируется, начиная со стадии E9.5. Максимальная интенсивность экспрессии Т-кадгерина выявляется во внутренней выстилке головного мозга, что предполагает возможное участие Т-кадгерина в формировании сосудистых сплетений в стенках желудочков в развивающемся мозге. Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном сердце, впервые выявленная на стадии E11.5, отражает, по всей видимости, активные процессы формирования и роста сердца и его отделов, а также его васкуляризации (Burggren and Keller, 1997).

Часть 2. Выявление роли Т-кадгерина в процессах ангиогенеза на моделях *in vivo* и *in vitro*.

Для подтверждения роли Т-кадгерина в процессах ангиогенеза, была использована модель имплантации Матригеля *in vivo*, которая предполагает подкожное введение мышам линии NUDE Матригеля, содержащего контрольные клетки - (Т-) Матригель, или клетки, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин - (Т+) Матригель. Бляшки Матригеля извлекали на 14 день

и оценивали степень их васкуляризации. На срезах Матригеля был проведен качественный и количественный анализ плотности сосудов, выявляемых в результате иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к CD31. Введение клеток, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин достоверно снижает количество прорастающих в Матригель сосудов (рис. 3А, Б, В).

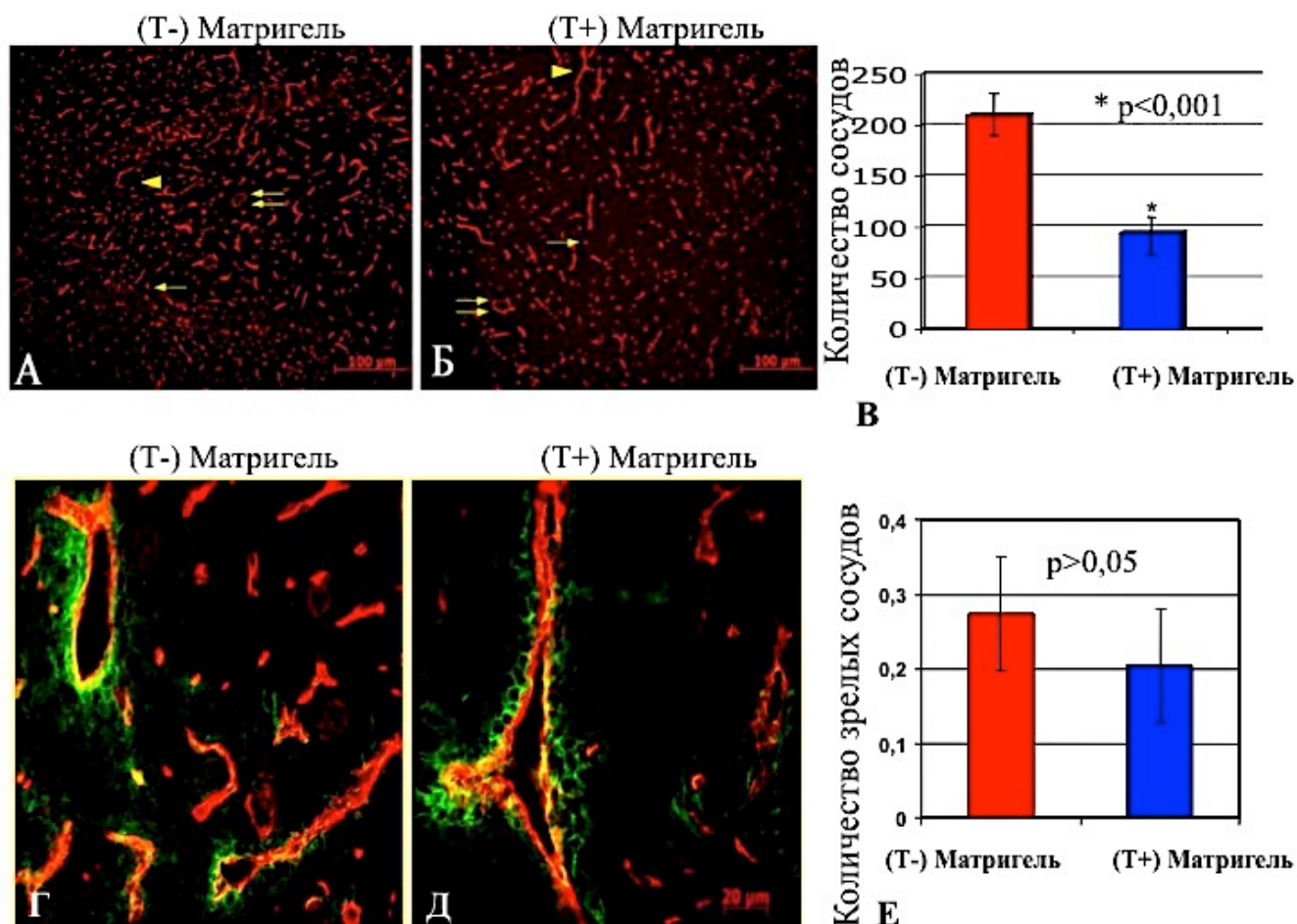


Рисунок 3. Васкуляризация Матригелей. А, Б – Иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов Матригелей антителами против маркера эндотелиальных клеток CD31. Крупные сосуды отмечены большими стрелками, мелкие сосуды – двойными стрелками, капилляры – маленькими стрелками. Масштабный отрезок – 100 мкм. В – Плотность сосудов подсчитывали по количеству CD31-позитивных структур в 4-5 полях зрения на трёх случайных срезах для каждой бляшки Матригеля. Г, Д – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против CD31 (красная флуоресценция) и NG2-антигена (маркера перицитов) (зеленая флуоресценция). Масштабный отрезок – 20 мкм. Е - Плотность зрелых сосудов оценивали по количеству двойных CD31/NG2 позитивных структур аналогичным образом.

Оценка плотности зрелых сосудов, выявляемых методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против CD31 в сочетании с антителами против α -гладкомышечного актина/NG2-антигена (маркера перицитов), показала, что разницы между (T-) и (T+) Матригелями нет, что означает, что Т-кадгерин не влияет на стабилизацию и созревание сосудов (рис. 3 Г, Д, Е).

Для выявления возможных механизмов ингибирующего влияния Т-кадгерина на прорастание сосудов были использованы модели ангиогенеза *in vitro* и *ex vivo*. Влияние Т-кадгерина на адгезию, пролиферацию, апоптоз, миграцию эндотелиальных клеток и формирование капилляро-подобных структур изучали с использованием рекомбинантных очищенных доменов Т-кадгерина (EC1 - аминотерминальный домен и EC5 – С-концевой домен).

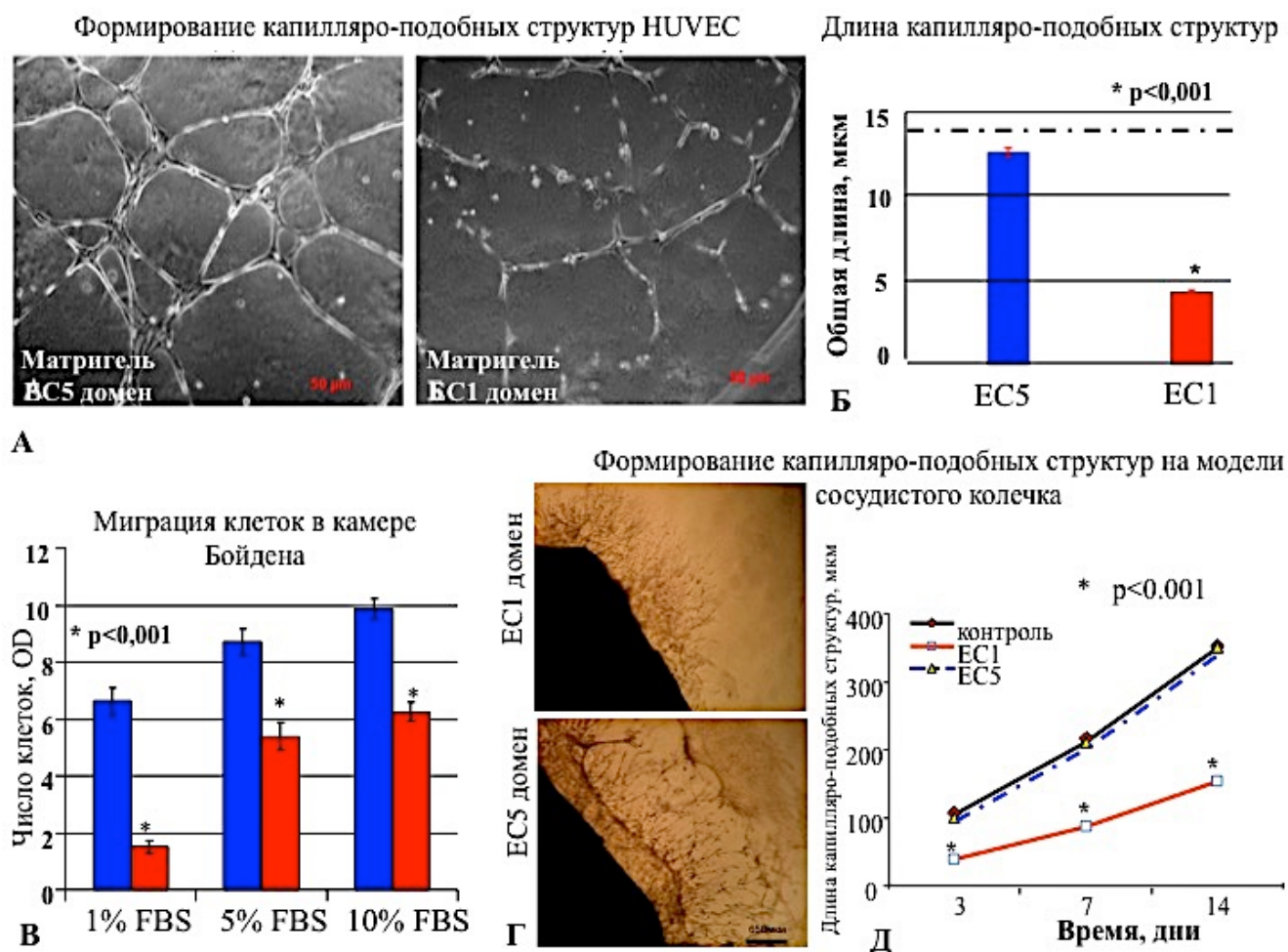


Рисунок 4. Влияние Т-кадгерина на ангиогенез на моделях *in vitro* и *ex vivo*. **А** – Формирование эндотелиальными клетками (HUVEC) капилляро-подобных структур на Матригеле, содержащем рекомбинантные домены Т-кадгерина (EC1 и EC5 домен (контроль)). Масштаб – 50 мкм. **Б** – Средняя длина капилляро-подобных структур, сформированных HUVEC на Матригеле. **В** - Влияние Т-кадгерина на миграцию HUVEC в камере Бойдена через мембрану, покрытую рекомбинантными доменами Т-кадгерина. EC1 домен (красный), EC5 домен (синий, контроль). **Г** - Формирование капилляро-подобных структур в Матригеле, содержащем рекомбинантные домены Т-кадгерина (EC1 и EC5 домены), на модели сосудистого колечка крысы *ex vivo*. Масштаб – 650 мкм. **Д** - Средняя длина капилляро-подобных структур, отрастающих от сосудистого колечка.

При иммобилизации EC1 домена на поверхности Матригеля регистрировали значительное снижение формирования трубочек эндотелиальными клетками по сравнению с контрольным EC5 доменом (рис. 4 А, Б). Аналогичные результаты по снижению формирования капилляро-подобных трубочек были получены на модели ангиогенеза сосудистого колечка крысы *ex vivo* (рис. 4 Г, Д). Анализ миграции эндотелиальных клеток в камере Бойдена через мембрану,

покрытую доменами Т-кадгерина, показал, что ЕС1 домен, участвующий в межклеточном узнавании, значительно подавляет миграцию по сравнению с контрольным ЕС5 доменом (рис. 4 В). Влияния Т-кадгерина на адгезию, пролиферацию и апоптоз эндотелиальных клеток выявлено не было. По-видимому, ЕС1 домен, обеспечивающий гомофильное узнавание, имитирует межклеточное взаимодействие между клетками, на поверхности которых экспрессируется Т-кадгерин, и подавляет процессы, связанные с миграцией эндотелиальных клеток и формированием капилляро-подобных трубочек, их роста и ветвления.

Часть 3. Т-кадгерин и опухолевая прогрессия.

Обнаруженная нами способность Т-кадгерина подавлять ангиогенез делает его привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Для выявления возможной роли Т-кадгерина в патогенезе опухолевых образований был проведён сравнительный анализ экспрессии Т-кадгерина в образцах нормальной кожи человека, кожи от пациентов с псориазом, кератоакантомой в стадии роста и стадии стабилизации, кератозом, поверхностными, нодулярными и инфильтрирующими формами базальноклеточного рака (базалиомы), плоскоклеточным раком (ПР) и метатипическим раком (МР). Криосрезы окрашивали антителами против Т-кадгерина и маркеров клеток сосудов.

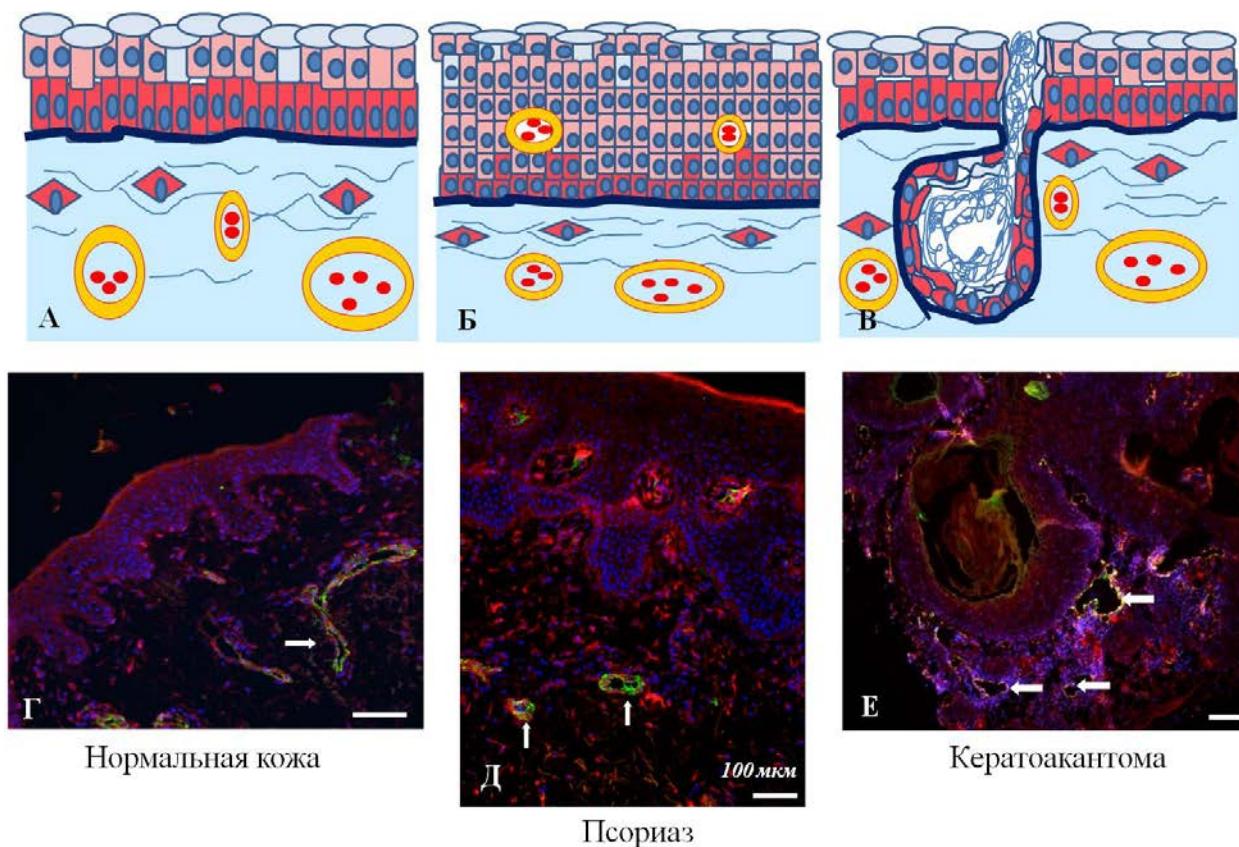


Рисунок 5. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание образцов нормальной кожи человека и доброкачественных новообразований с использованием антител к Т-кадгерину (красная флуоресценция) и vWF (зеленая флуоресценция) (Г, Д, Е). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштаб 100 мкм. На рисунках А, Б, В представлена схема, показывающая экспрессию Т-кадгерина в базальном слое эпидермиса кожи (красный цвет) и в клетках стромы, умеренную экспрессию Т-кадгерина в супрабазальных слоях (розовый цвет), и экспрессию Т-кадгерина во всех vWF-экспрессирующих сосудах (жёлтый цвет).

Обнаруженное первоначальное снижение экспрессии Т-кадгерина в кератиноцитах и кровеносных сосудах в предраковых новообразованиях кожи, а в последующем прогрессирующее снижение вплоть до полного исчезновения Т-кадгерина в опухолевых клетках и в сосудах при раках кожи и меланоме коррелирует со степенью злокачественности новообразований. Потеря экспрессии классических маркеров эндотелиальных клеток (vWF) и гетерогенность в экспрессии Т-кадгерина в опухолевых сосудах коррелируют с гистологическими признаками и инвазивным фенотипом более агрессивных опухолей, таких как базалиома, МР, ПР и меланома. Возможно, высокий уровень экспрессии Т-кадгерина в клетках нормальной кожи и доброкачественных опухолях по принципу контактного торможения предотвращает избыточный рост сосудов, которые также экспрессируют Т-кадгерин. Опухолевая трансформация сопровождается нарушением экспрессии Т-кадгерина не только в клетках опухоли, но и в клетках сосудов, что вызывает aberrантную васкуляризацию опухолевых узлов и окружающей стромы.

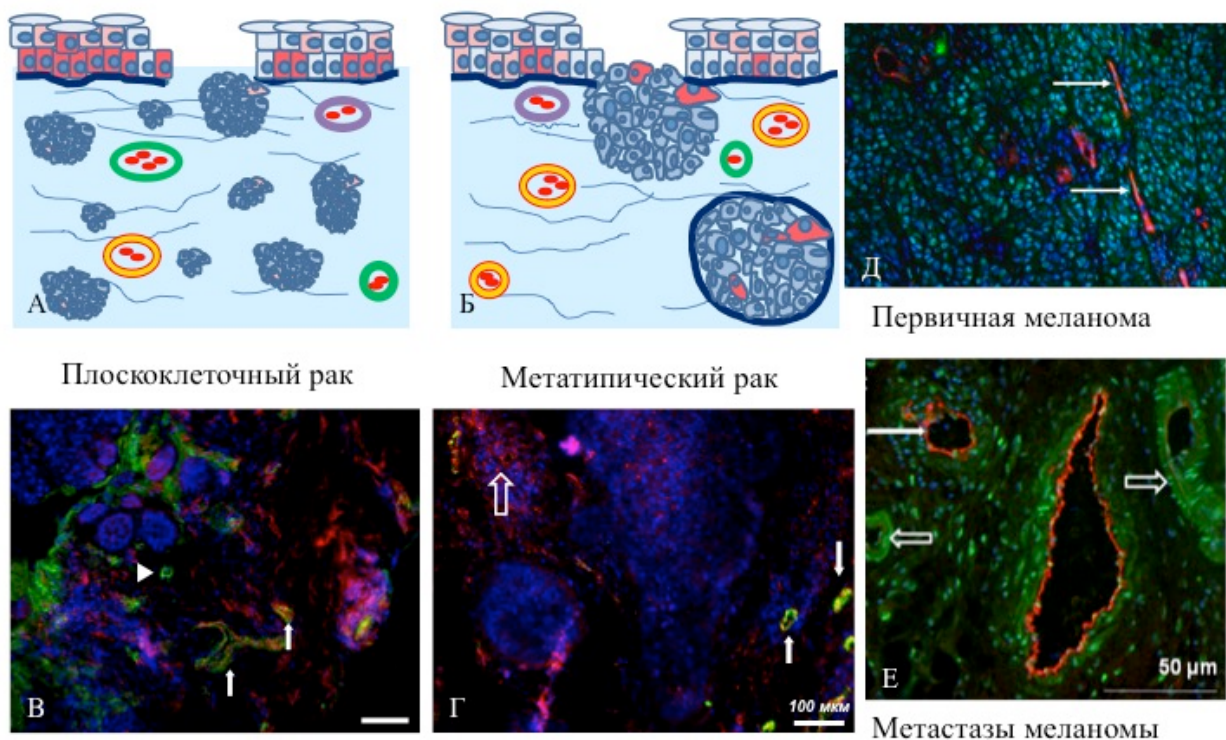


Рисунок 6. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание образцов рака кожи человека с использованием антител к Т-кадгерину (красная флуоресценция) и vWF (зеленая флуоресценция). **В** - плоскоклеточный рак (ПР), **Г** - метатипический рак (МР). На рисунках **А** и **Б** представлена схема, демонстрирующая практически полную потерю экспрессии Т-кадгерина опухолевыми клетками в образцах ПР и МР (отсутствие красного цвета в опухолевых узлах). Сосуды, ко-экспрессирующие Т-кадгерин и CD31 показаны жёлтым, сосуды, не экспрессирующие Т-кадгерин, - зелёным. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание образцов меланомы человека (**Д**) с метастазами (**Е**) с использованием антител к Т-кадгерину (зеленая флуоресценция) и vWF (красная флуоресценция). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). В первичных узлах меланомы наблюдается гетерогенная экспрессия Т-кадгерина в опухолевых клетках и в сосудах. На рисунке **Д** стрелки указывают на сосуды, экспрессирующие Т-кадгерин (желтая флуоресценция). В метастазах меланомы присутствуют vWF-позитивные сосуды, как экспрессирующие Т-кадгерин (толстые стрелки на **Е**), так и не экспрессирующие Т-кадгерин (тонкие стрелки на **Е**). Масштаб на рисунках **В** и **Г** 100 мкм, на **Д** и **Е** - 50 мкм.

Часть 4. Влияние Т-кадгерина на опухолевую прогрессию на модели меланомы B16F10 в BDF1 мышах.

Для оценки потенциальной роли Т-кадгерина в опухолевой прогрессии, мы использовали известную модель мышинной меланомы B16F10, метастазирующей в легкие (Teicher and Andrews, 2004). В результате стабильной трансфекции, клонирования и селекции были получены клоны клеток меланомы с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина (Т+, Т++ и Т-). Клетки вводили мышам подкожно и анализировали параметры роста первичного узла (размер первичного узла, его васкуляризацию и вклад стромального компонента в рост первичного узла), а также оценивали частоту метастазирования. Анализ кинетики роста опухолей после подкожного введения показал, что наиболее быстрый рост первичного узла наблюдался при введении клеток меланомы, экспрессирующих Т-кадгерин (рис. 7 А). Достоверное увеличение скорости роста наблюдалось и при формировании первичных узлов клетками поликлональной меланомы, гиперэкспрессирующей Т-кадгерин, по сравнению с контролем. Анализ пролиферации клеток клонов меланомы *in vitro* методом измерения клеточного индекса в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence (рис 7 В) показал, что экспрессия Т-кадгерина приводит к увеличению их пролиферативной активности. Достоверного различия в уровне некроза и апоптоза между клонами меланомы *in vitro* обнаружено не было.

При окраске гематоксилином криосрезов первичных узлов были обнаружены обширные области некротических поражений, площадь которых была достоверно больше в опухолях, экспрессирующих Т-кадгерин (рис. 7 Г). Мы предположили, что это обусловлено недостаточной васкуляризацией быстро растущих первичных узлов. На криосрезках было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к CD31 и подсчет сосудов. Количество сосудов среднего диаметра и капилляров на срезах первичных узлов, образованных Т-кадгерин экспрессирующими клетками, было достоверно меньше, чем в контроле.

Поскольку известно, что мезенхимные стромальные клетки могут участвовать процессах канцерогенеза, был проанализирован вклад стромального компонента в формирование

первичного узла *in vivo* путем окрашивания криосрезов на маркер активированной стромы CD90 (рис. 8 А). CD90-позитивные области занимали достоверно большую площадь в случае меланомы, экспрессирующей Т-кадгерин, чем в контроле (рис. 8 Б).

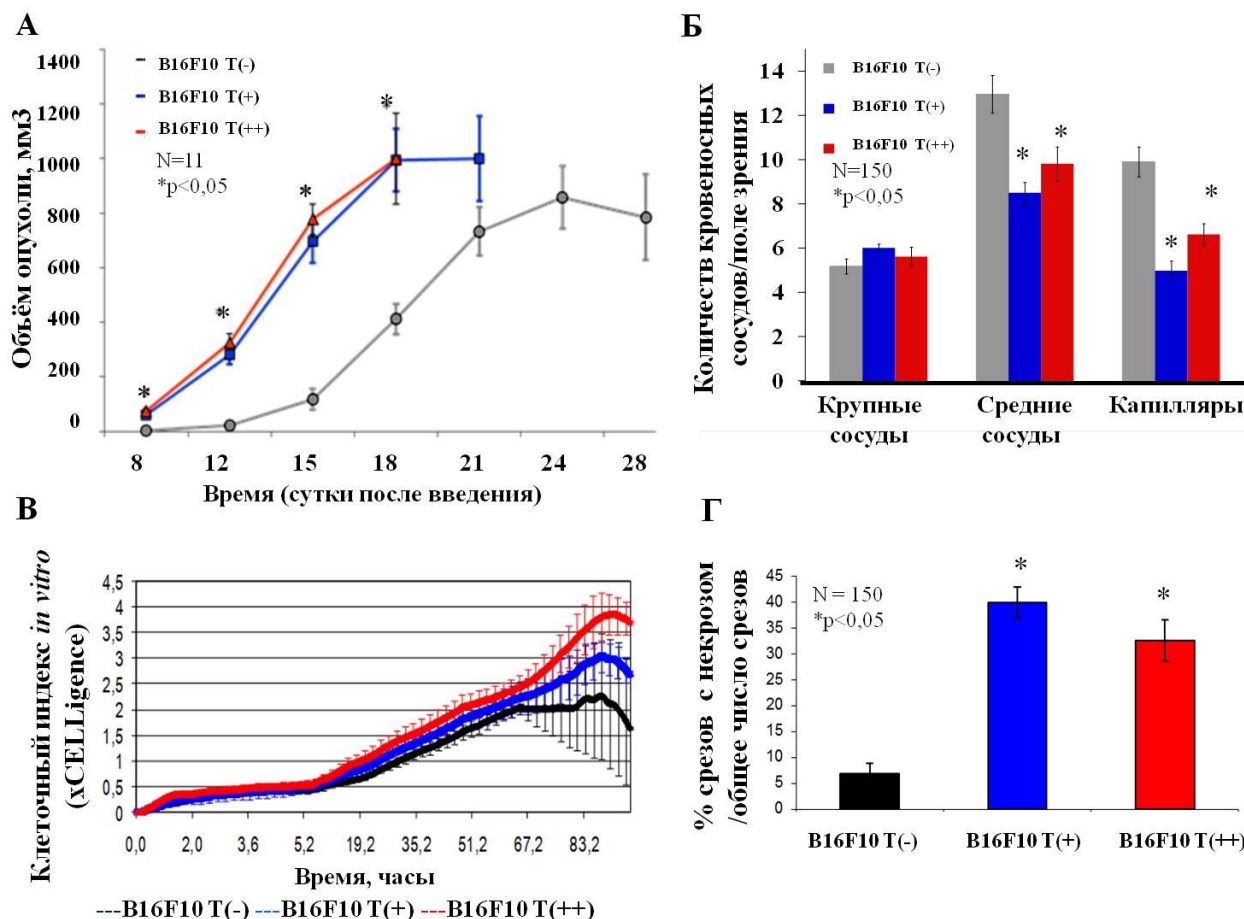


Рисунок 7. Динамика роста первичных узлов, образованных клонами клеток мышинной меланомы (А). B16F10 T(-) - контрольный клон, B16F10 T(+)- клон со средним уровнем экспрессии Т-кадгерина; B16F10 T(++)- клон с высокой экспрессией Т-кадгерина. Васкуляризация первичных узлов меланомы сосудами различного диаметра (Б). Частота встречаемости очагов некроза на криосрезах первичных узлов меланомы (Г). Кривые роста клонов меланомы *in vitro*, полученные на приборе xCELLigence в течение 96 часов (В).

Исследование влияния среды роста от клеток клонов мышинной меланомы на миграцию МСК-ЖТ в системе Transwell®, показало, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина стимулирующий эффект среды культивирования от клеток меланомы на миграцию МСК-ЖТ увеличивается в 1,4 раза по сравнению с контролем (рис 8 В).

Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы приводит к увеличению скорости роста первичного узла, но подавляет процессы васкуляризации меланомы. Паракринная активность клеток меланомы, экспрессирующих Т-кадгерин, активирует окружающую строму и стимулирует миграцию мезенхимных стромальных клеток.

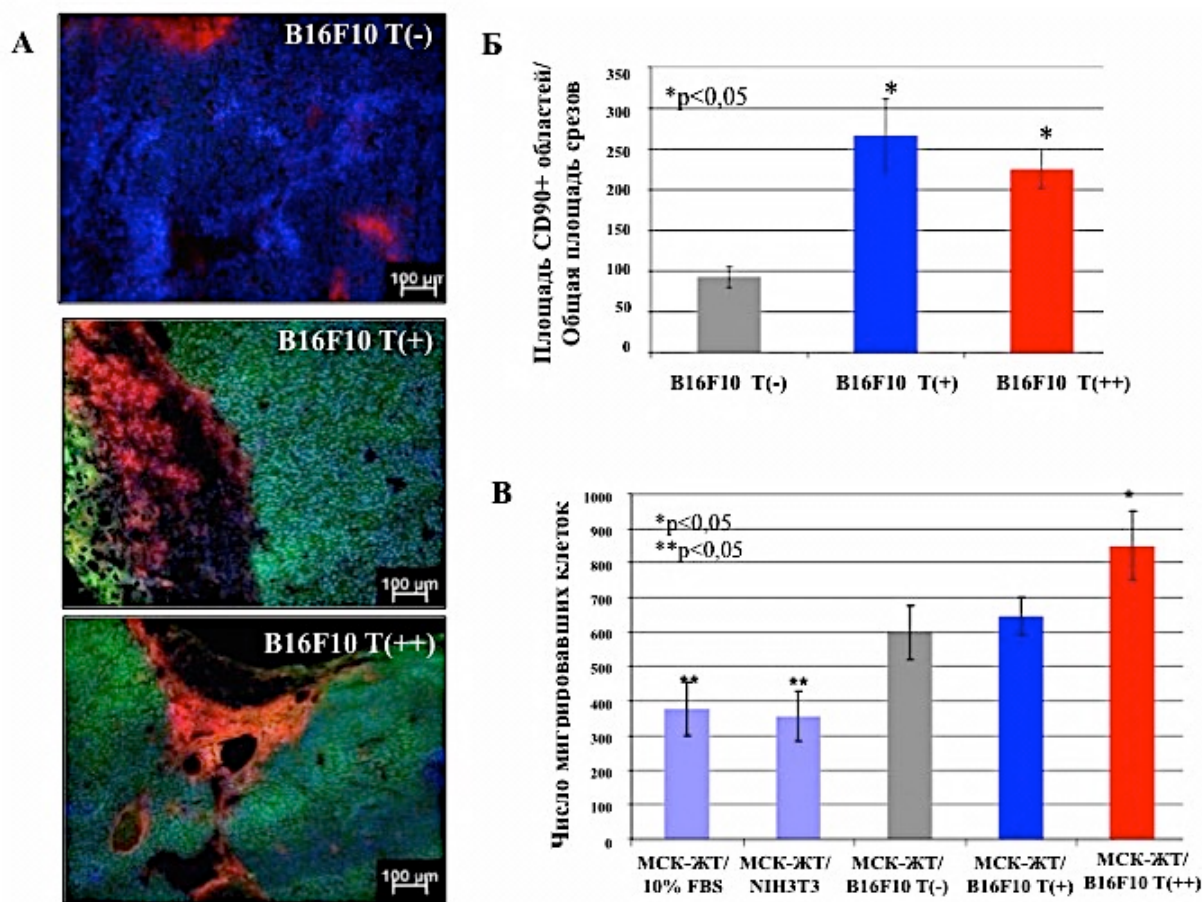


Рисунок 8. Иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов первичных узлов мышинной меланомы антителами к CD90 (А). B16F10 T(-) - контрольный клон, B16F10 T(+) - клон со средним уровнем экспрессии Т-кадгерина; B16F10 T(+++) - клон с высокой экспрессией Т-кадгерина. Масштаб – 100 мкм. Площадь CD90 позитивных областей на срезах первичных опухолевых узлов меланомы у мышей (Б). Влияние кондиционированной среды роста от клеток клонов меланомы на миграцию МСК-ЖТ. * - достоверные различия по отношению к контрольному клону клеток, ** - достоверные различия по отношению к клонам меланомы.

В качестве параметров метастазирования оценивали частоту метастазирования (отношение числа мышей с метастазами к общему числу анализируемых мышей) и лёгочный коэффициент (отношение средней массы лёгких в опытной группе к средней массе лёгких здоровых мышей). В группе мышей, которым были введены клетки меланомы с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина, частота метастазирования и показатель лёгочного коэффициента были значительно выше, чем в контроле.

Исследование влияния Т-кадгерина на инвазивный потенциал клеток меланомы *in vitro* проводили на модели двух капель Матригеля (рис. 9 А). Поскольку, по нашим данным, инвазия клеток меланомы из GFR Матригеля в полный Матригель сопровождается не только миграцией клеток, но и протеолитической деградацией внеклеточного матрикса, что приводит к размыванию границы между двумя Матригелями и изменению размеров капли, мы оценивали

размеры внутренней капли после 48 часов инкубации и число клеток, инвазировавших во внешний Матригель (рис. 9А, Б).

В Матригелях с клетками меланомы, гиперэкспрессирующими Т-кадгерин, размеры капель были достоверно больше, чем в контроле, а количество клеток, инвазировавших из GFR Матригеля в Матригель с факторами роста, было достоверно выше (рис. 9 В).

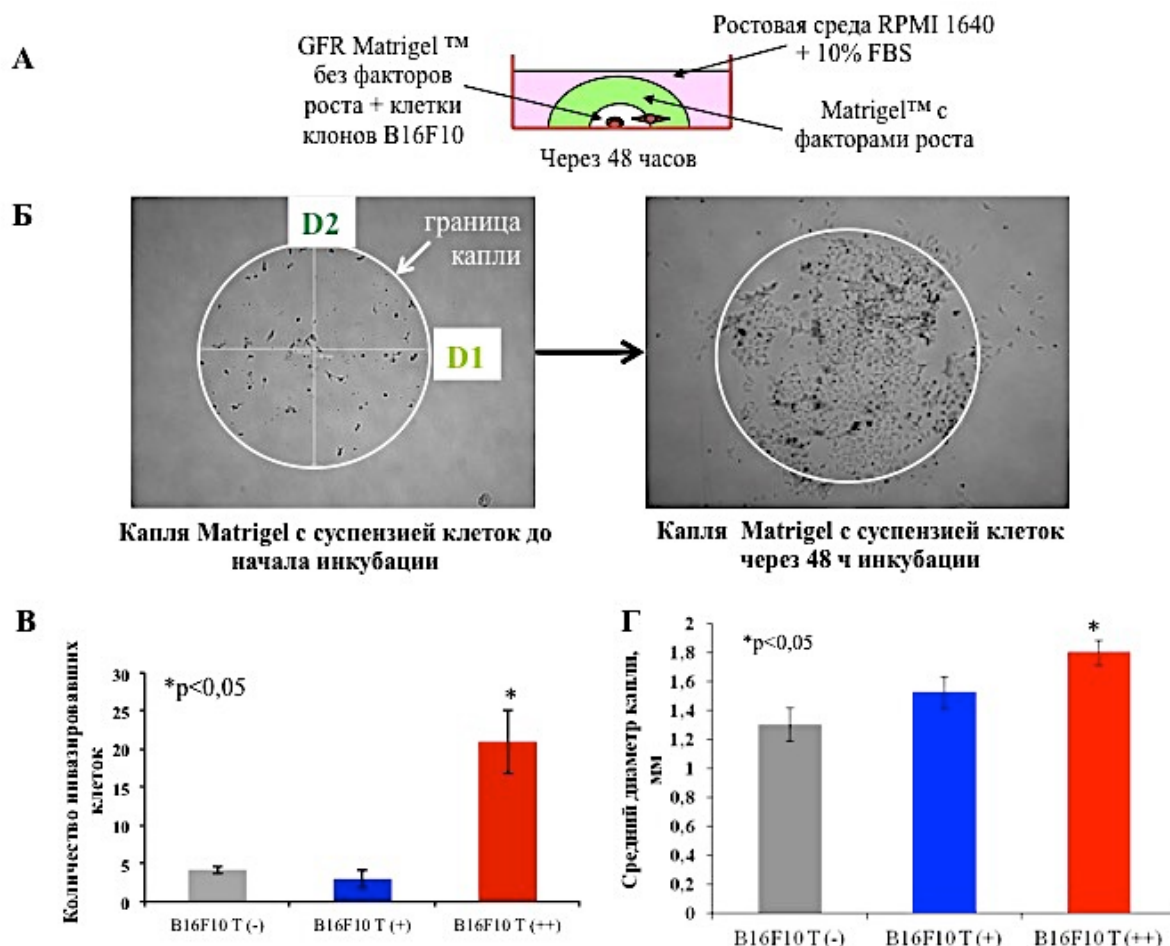


Рисунок 9. Изучение инвазивного потенциала клеток меланомы в Матригеле. Схема эксперимента (А), фазово-контрастное изображение капли с клетками до начала эксперимента и через 48 часов (Б). GFR Matrigel (growth factor reduced) – Матригель без факторов роста, содержащий клетки меланомы; Matrigel – Матригель, содержащий факторы роста. Количество клеток меланомы, инвазировавших в полный Матригель через 48 часов (В). Анализ диаметров капель Матригеля (Г). D1 – диаметр капли по горизонтали; D2- диаметр капли по вертикали.

Исследование влияния Т-кадгерина на экспрессию цитокинов, факторов роста и матриксных металлопротеиназ в клетках меланомы проводили методом ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR) и с использованием коммерческих наборов RT² Profiler PCR Array. По данным RT-PCR экспрессия таких факторов, как VEGF A, PDGF B, EGF, bFGF, HGF, урокиназы и ее рецептора, MMP2, MMP9 при увеличении экспрессии Т-кадгерина не изменяется. Экспрессии мРНК EGF, HGF и MMP 2 в клонах меланомы обнаружено не было.

Цитокиновый профиль, экспрессию белков внеклеточного матрикса и молекул адгезии, ангиогенных факторов и ингибиторов ангиогенеза, хемокинов и их рецепторов исследовали с использованием RT² Profiler PCR Array. Было обнаружено, что в клетках меланомы, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, происходит увеличение экспрессии ингибиторов ангиогенеза (CXCL10, angiopoietin 2, heparanase, и Foxf1a) и подавление экспрессии стимуляторов ангиогенеза (TGF α и Tie-1). Экспрессия ингибиторов, таких как хромогранина (chromogranin A) и проколлагена (procollagen type XVIII alpha 1) выявлялась исключительно в клетках, экспрессирующих Т-кадгерин. Кроме того, в клетках меланомы при экспрессии Т-кадгерина отмечалось значительное увеличение содержания мРНК с-Met, рецептора HGF, (данные RT-PCR) и ряда хемокинов (RT² Profiler PCR Array), ответственных за привлечение мезенхимных стромальных клеток и клеток иммунной системы (CXCR7, CXCL10, CCL5, CXCL11, CCRL1, CCL7). Экспрессия генов CCL7, Gdf 5 и интерлейкина 8 α была выявлена только в клонах меланомы, экспрессирующих Т-кадгерин, в то время как мРНК интерлейкинов 16, 4 и Il8rb детектировалась исключительно в контрольном клоне. Анализ экспрессии молекул внеклеточного матрикса и молекул адгезии показал, что при экспрессии Т-кадгерина происходит значительное увеличение содержания мРНК Е-кадгерина и проонкогенных интегринов (integrin α 5, integrin α V, integrin α E, integrin β), компонентов матрикса (procollagen I α 1, fibronectin 1) и MMP14, способствующих инвазии и метастазированию меланомы. Экспрессия PECAM1 (CD31), Adamts 2 и laminin α 3 детектировалась только в Т-кадгерин экспрессирующих клетках. Данные ПЦР анализа и результаты, полученные с использованием коммерческого набора RT² Profiler PCR Array, были частично подтверждены методом вестерн блоттинга в сочетании с денситометрией, а также иммунофлуоресцентным окрашиванием с использованием конфокальной микроскопии.

Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы приводит к подавлению неоангиогенеза в первичном узле у мышей. Однако Т-кадгерин не может считаться опухолевым супрессором, поскольку клетки меланомы, экспрессирующие Т-кадгерин, начинают экспрессировать гены, способствующие их большей выживаемости, миграции, инвазии и метастазированию.

Часть 5. Экспрессия Т-кадгерина в сосудах при атеросклерозе.

Т-кадгерин является важным участником процессов как физиологического ангиогенеза, так и опухолевого неоангиогенеза. Т-кадгерин экспрессируется на ранних этапах эмбрионального развития, однако, наибольшая экспрессия Т-кадгерина детектируется во взрослом организме в крупных стабильных сосудах (в аорте, сонных артериях, подвздошных, почечных артерий) и сердце (Ivanov et al., 2001). Известно, что экспрессия Т-кадгерина

повышается при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях (Ivanov et al., 2001; Kudrjashova et al., 2002). Для выявления возможной функции Т-кадгерина в сосудах во взрослом организме было проведено двойное иммуногистохимическое окрашивание антителами к Т-кадгерину и антителами к α -SMA или CD31 на криосрезам аутопсийного материала. Были исследованы образцы аорты здоровых доноров и больных атеросклерозом, а именно, образцы липидной полосы, нестабильной фиброатеромы и мягкого кальциноза. Окрашивание криосрезов ткани в здоровых сосудах выявило экспрессию Т-кадгерина во всех слоях стенки аорты, в интиме аорты в эндотелиальных клетках, а в медиі - в части ГМК и в *vasa vasorum*. Во всех исследованных образцах атеросклеротических поражений сосудов отмечалось значительное увеличение экспрессии Т-кадгерина. Кроме того, было обнаружено увеличение количества CD31-позитивных клеток в субэндотелиальном слое и в медиі при атеросклерозе, что, возможно, отражает миграцию прогениторных/стволовых клеток в бляшку.

Повышенный уровень липопротеидов низкой плотности (ЛНП) в плазме крови служит фактором риска развития атеросклероза, так как приводит к накоплению липидов в сосудистой стенке (Goldstein et al., 1985). Ранее был обнаружен атипичный участок специфического связывания ЛНП на культивируемых ГМК сосудов (Bochkov et al., 1994). Используя мембраны ГМК медиі аорты человека, был выделен, очищен и охарактеризован белок p105/p130, который по данным сиквенирования соответствовал последовательности Т-кадгерина. Однако было не ясно, является ли Т-кадгерин рецептором ЛНП, и какое это имеет физиологическое значение.

Анализ специфического связывания меченных ^{125}I -ЛНП с мембранами линейных клеток (рис. 10 А) показал, что гиперэкспрессия Т-кадгерина приводит к увеличению числа низкоаффинных участков связывания (B_{max}) (примерно на 40%) по сравнению с контролем без достоверного изменения константы связывания (K_d). Эти данные свидетельствуют о том, что ЛНП является специфическим лигандом Т-кадгерина (рис. 10 В). Для ответа на вопрос, имеет ли связывание Т-кадгерина с ЛНП какое-либо физиологическое значение, измеряли концентрацию кальция в клетках в ответ на добавление ЛНП в среду культивирования. Клетки предварительно инкубировали с кальциевым зондом Fura-2AM, затем в среду добавляли раствор ЛНП (в конечной концентрации 60 мкг/мл, что соответствует K_d низкоаффинного участка связывания), и измеряли концентрацию $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, исходя из интенсивности флуоресценции зонда. При добавлении ЛНП в среду культивирования клеток L929 наблюдается повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, при этом амплитуда кальциевого ответа в клетках, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, в 2 раза превышает аналогичный ответ в контроле (рис. 10 Г и Д). Изучение влияния гиперэкспрессии Т-кадгерина на миграционную активность клеток в ответ на добавление ЛНП в качестве хемоаттрактанта проводили в камере Бойдена. В верхнюю камеру вносили контрольные клетки или клетки L929, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин, а в

нижнюю камеру добавляли ЛНП. Гиперэкспрессия Т-кадгерина сама по себе увеличивала способность клеток к миграции по сравнению с контролем. Миграция Т-кадгерин гиперэкспрессирующих клеток по градиенту ЛНП была значительно выше, чем контроле (рис. 10 Е). Предварительное инкубирование ЛНП с антителами против ЛНП (ЛНП+Fab) блокировало стимулирующий эффект ЛНП на миграцию клеток. Аналогичные результаты были получены для линии НЕК293.

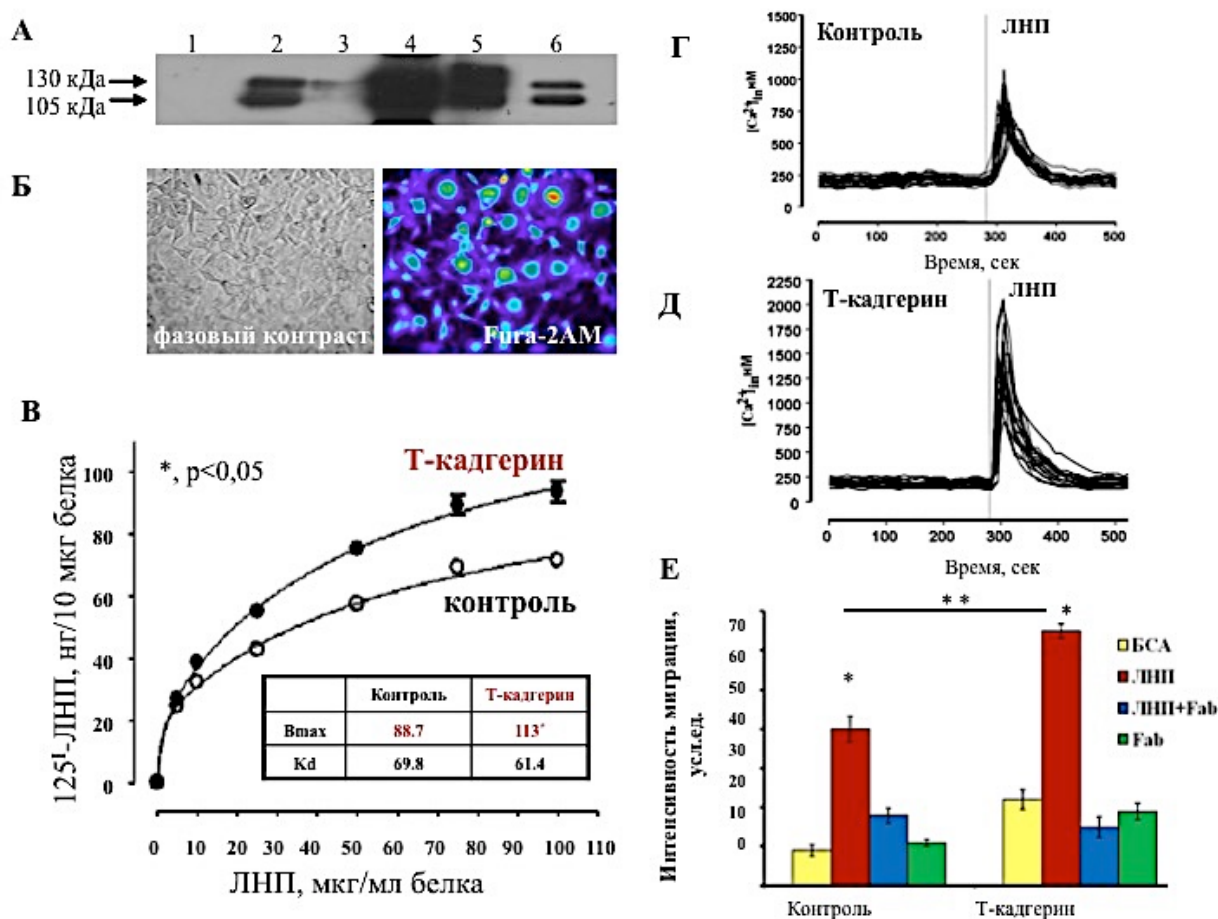


Рисунок 10. Т-кадгерин – рецептор ЛНП, опосредующий активацию внутриклеточной сигнализации и миграцию клеток по градиенту ЛНП. (А). Анализ экспрессии Т-кадгерина после трансфекции клеток плазмидой, содержащей ген человеческого Т-кадгерина в клонах клеточных линий НЕК293 и L929. 1 Дорожка – контрольный клон НЕК293; 2 дорожка – клон клеток L929, гиперэкспрессирующий Т-кадгерин; 3 дорожка – контрольный клон клеток L929; 4,5 дорожки - клоны клеток НЕК293, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин; 6 дорожка – положительный контроль клетки HUVEC, нативно экспрессирующие Т-кадгерин. Изотерма связывания 125I-ЛНП с мембранами НЕК293 клеток (В). Фазово-контрастное изображение клеток L929 до начала эксперимента по измерению [Ca²⁺]_{in} и их флуоресцентное изображение после инкубации с двух волновым зондом Fura-2AM (Б). Изменение концентрации внутриклеточного кальция в ответ на введение ЛНП в среду культивирования в клетках линии L929 (одновременная запись в 22 клетках) в контрольных клетках (Г) и гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (Д). Гиперэкспрессия Т-кадгерина усиливает миграцию L929 клеток в ответ на введение ЛНП в камеру Бойдена (Е). В нижнюю камеру добавляли ЛНП в качестве хемоаттрактанта; ЛНП, преинкубированные с антителами против ЛНП, (ЛНП+Fab); Fab - антитела против ЛНП, БСА - негативный контроль. *,** p<0,05.

Таким образом, полученные результаты по изучению влияния ЛПН на $[Ca^{2+}]_{in}$ в клетках, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, а также по изучению влияния ЛПН на миграционную активность этих клеток, подтверждают предположение о том, что Т-кадгерин является низкоаффинным рецептором ЛПН, опосредующим сигнальные эффекты ЛПН в клетках и стимулирующим клеточную миграцию.

Часть 6. Т-кадгерин и проницаемость сосудов. Сигнальные эффекты Т-кадгерина.

Активация/дисфункция эндотелия является характерной особенностью многих патологических состояний, таких как, например, атеросклероз, и сопровождается нарушением межклеточных взаимодействий и, как следствие, увеличением проницаемости эндотелия (Freu et al., 2009). Для оценки влияния экспрессии Т-кадгерина на барьерную функцию эндотелия измеряли проницаемость эндотелиального монослоя HUVEC для молекул FITC-декстрана в системе Трансвелл *in vitro*. В эксперименте использовали созданные вирусные конструкции для гиперэкспрессии Т-кадгерина (Т-кад), и подавления нативной экспрессии Т-кадгерина (si-Т-кад). Было обнаружено, что гиперэкспрессия Т-кадгерина увеличивает проницаемость эндотелия, в то время как подавление экспрессии, наоборот, уменьшает (рис. 11 А). Известно, что для обеспечения барьерной функции эндотелия необходима мембранная локализация и функциональная активность VE-кадгерина, основного белка адгезивных контактов (Komarova and Malik, 2010). Локализацию VE-кадгерина в зоне межклеточных контактов и цитоплазме анализировали методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против Т-кадгерина и VE-кадгерина в сочетании с конфокальной микроскопией (рис. 11 В). Было обнаружено, что для гиперэкспрессирующих Т-кадгерин клеток характерно наравномерное окрашивание VE-кадгерина, что обусловлено нарушением организации VE-кадгерин содержащих адгезивных контактов. Исчезновение VE-кадгерина из зон межклеточных контактов сопровождается образованием щелей между клетками (Т-кад) (стрелки на рис. 11 В), в то время как подавление экспрессии Т-кадгерина (si-Т-кад) наоборот, наблюдается утолщение зоны VE-кадгериновых контактов. Экспрессия Т-кадгерина не влияет на экспрессию и/или локализацию N-кадгерина и на уровень экспрессии белков плотных контактов (окклюдин, клаудин-5 и ZO-1).

Известно, что фосфорилирование VE-кадгерина по тирозиновым остаткам приводит к разборке межклеточных контактов (Dejana et al., 2008). Было обнаружено, что гиперэкспрессия Т-кадгерина приводит к избирательному фосфорилированию VE-кадгерина по Y731 остатку тирозина цитоплазматического домена, но не влияет на фосфорилирование по Y658. В si-Т-кад клетках, имеющих сниженную экспрессию Т-кадгерина, уровень фосфорилирования по Y731 тирозину снижается, а по Y658 не изменяется (рис. 11 Б). Нами были получены результаты, свидетельствующие о том, что под влиянием гиперэкспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных

клетках происходит клатрин-зависимый эндоцитоз VE-кадгерина и его последующая деградация в лизосомах (рис. 11 Г).

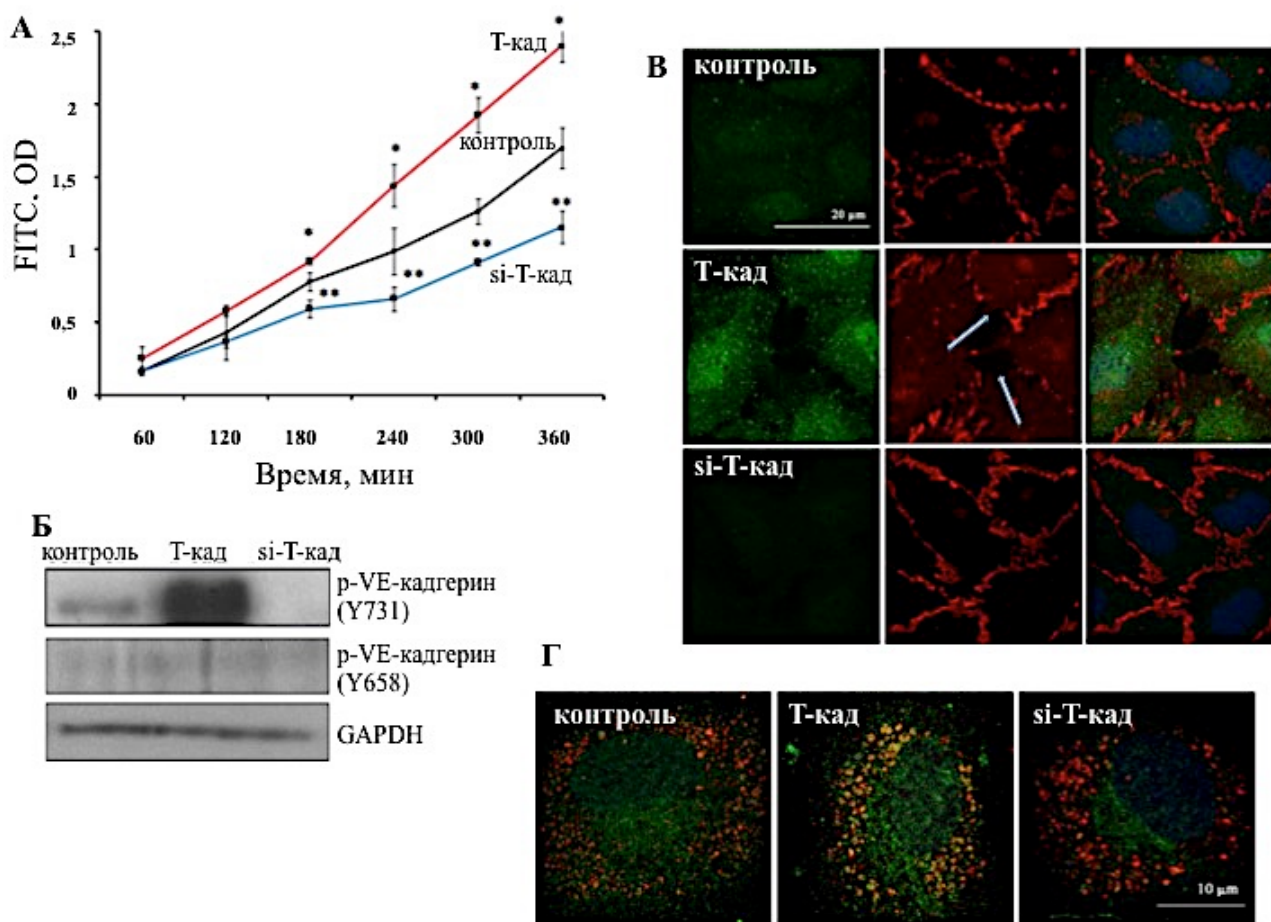


Рисунок 11. Влияние экспрессии Т-кадгерина на проницаемость эндотелиального монослоя (А). FITC-декстран вносили в верхнюю камеру трансвелл. Образцы аликвот из нижней камеры отбирали каждые 60 мин и измеряли флуоресценцию FITC при длине волны 525 нм. HUVEC, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин (Т-кад), контрольные клетки (контроль) и клетки после подавления экспрессии Т-кадгерина (si-T-кад). Гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает увеличение фосфорилирования VE-кадгерина по тирозину Y731, но не по Y658, подавление экспрессии - наоборот (Б). Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток антителами против Т-кадгерина (зеленая флуоресценция) и VE-кадгерина (красная флуоресценция) (В). Стрелками указаны щели в зоне VE-кадгериновых адгезивных контактов. Ядра клеток окрашены DAPI (синяя флуоресценция) Масштаб - 20 мкм. Гиперэкспрессия Т-кадгерина в эндотелиальных клетках вызывает накопление VE-кадгерина в лизосомах (Г). Эндотелиальные клетки преинкубировали с лизосомальным красителем LysoTracker RED® (красная флуоресценция), затем окрашивали антителами против VE-кадгерина (зелёная флуоресценция). Жёлтая флуоресценция соответствует ко-локализации VE-кадгерина и лизосомального красителя. Масштаб 10 мкм.

Rho ГТФазы (RhoA, Rac1, и Cdc42) являются ключевыми регуляторами барьерной функции эндотелия, контролирующими уровень фосфорилирования белков кадгеринового комплекса, формирование актиновых стресс-фибрилл и регуляцию активности актомиозинового комплекса (Hall, 1998, Ponimashkin et al., 2002). Гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает активацию RhoA, Rac1 и Cdc42, в то время как в контрольных клетках и клетках со сниженным уровнем экспрессии Т-кадгерина (si-T-кад) подобных эффектов обнаружено не

было. С помощью вестерн блоттинга и ингибиторного анализа было продемонстрировано, что гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает активацию прямых мишеней Rho ГТФаз: PAK1 и ROCK, а также LIMK1 киназы, что приводит к реорганизации актинового цитоскелета и микротрубочек. Последующий анализ с помощью конфокального микроскопа и ингибиторного анализа подтвердил, что активация сигнального каскада с участием RhoA, Rac1 и Cdc42 приводит к активации адаптерных белков и вызывает сборку стресс-фибрилл актина.

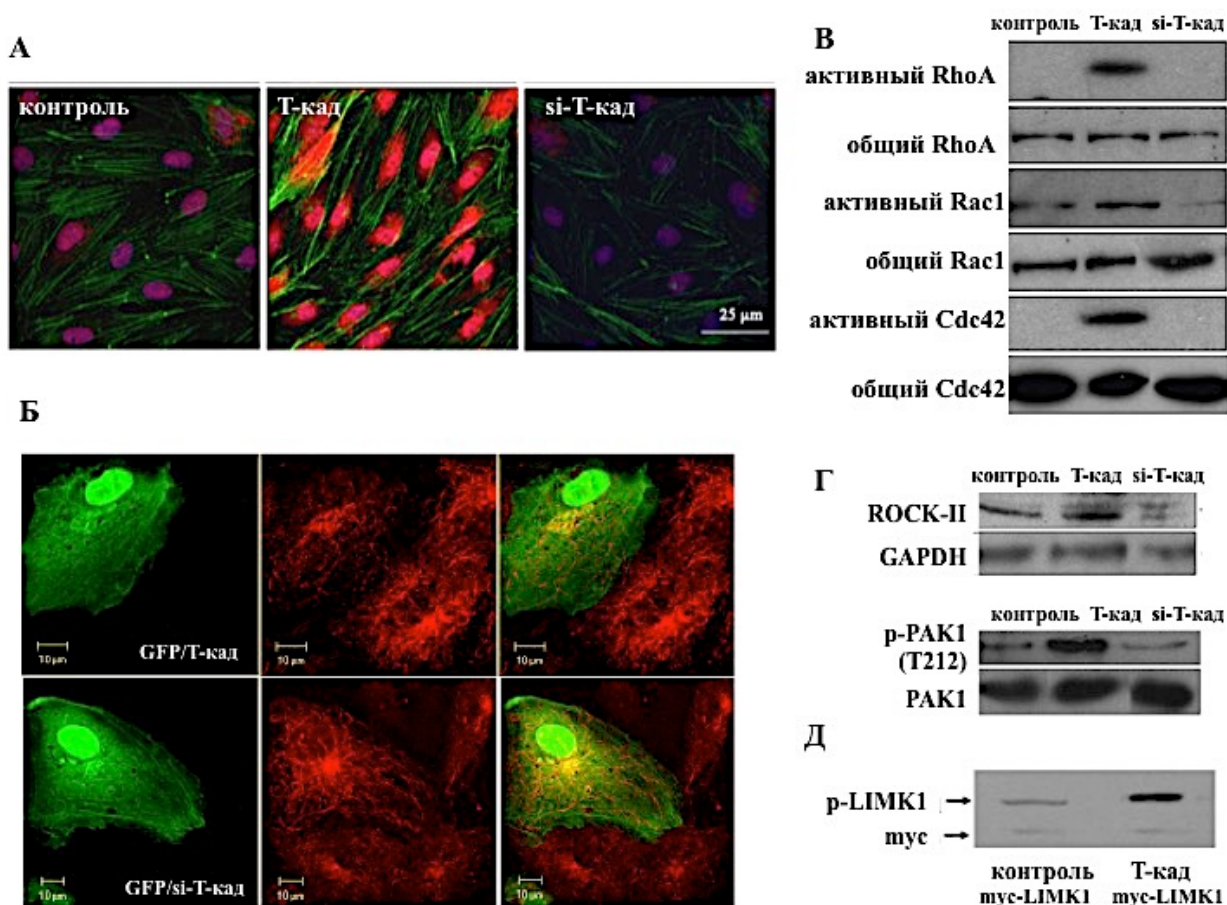


Рисунок 12. Влияние экспрессии Т-кадгерина на активацию внутриклеточной сигнализации и перестройку цитоскелета. Контрольные клетки (контроль), Т-кадгерин гиперэкспрессирующие клетки (Т-кад) и клетки после подавления экспрессии Т-кадгерина (si-T-кад). Гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает изменение формы клетки и увеличивает сборку стресс-фибрилл актина (А). Клетки окрашивали антителами против ROCK-II (красная флуоресценция) и фаллоидином для выявления актиновых стресс-фибрилл (зелёная флуоресценция). Ядра клеток докрашены DAPI. Масштаб 25 мкм. Гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает разборку микротрубочек, а подавление экспрессии Т-кадгерина стабилизирует микротрубочки (Б). HUVEC ко-трансфицировали плазмидами pcDNA3.1/T-кад (для гиперэкспрессии Т-кадгерина) и pcDNA3.1/GFP (зеленая флуоресценция), или siRNA/T-кад (для подавления экспрессии Т-кадгерина) и pcDNA3.1/GFP (зеленая флуоресценция). Иммунофлуоресцентное окрашивание HUVEC антителами против α -тубулина (красная флуоресценция). Масштаб 10 мкм. Гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает активацию малых Rho ГТФаз в эндотелиальных клетках – Rac1, Cdc42, RhoA (В). Гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает активацию нисходящих мишеней Rho ГТФаз - ROCK-II и PAK1 (Г). Гиперэкспрессия Т-кадгерина вызывает фосфорилирование и активацию LIMK1 киназы (Д).

Таким образом, представленные данные указывают на то, что гиперэкспрессия Т-кадгерина снижает барьерную функцию эндотелия за счет клатрин-опосредованного эндоцитоза основного белка адгезивных контактов VE-кадгерина с его последующей деградацией в лизосомах. В основе механизма интернализации VE-кадгерина лежит Rho-зависимое фосфорилирование цитоплазматического домена VE-кадгерина по тирозину в 731 положении. Активация Rho ГТФаз приводит также к активации нисходящих сигнальных посредников ROCK-II, LIMK и PAK1, вызывает сборку актиновых стресс-фибрилл и деполимеризацию микротрубочек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены свидетельства того, что Т-кадгерин участвует в процессах регуляции роста сосудов. До исследований, проведенных в настоящей работе, о Т-кадгерине было известно, что он экспрессируется в развивающейся нервной системе цыпленка, где он функционирует как навигационная «молекула отталкивания» для растущих аксонов. На моделях ангиогенеза *in vivo* и *in vitro* получены данные, позволяющие утверждать, что Т-кадгерин является «молекулой отталкивания» и ингибирует ангиогенез на уровне подавления миграции эндотелиальных клеток и формирования мелких сосудов и капилляров. В основе такого подавления лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина. Участие Т-кадгерина в процессах ангиогенеза обнаружено впервые.

В литературе существуют противоречивые данные о роли Т-кадгерина в опухолевом росте и метастазировании. Анализ экспрессии Т-кадгерина и маркеров сосудистых клеток, проведенный в настоящей работе на биопсийном материале предраковых состояний кожи, рака кожи и меланомы человека, свидетельствуют о частичной или полной потере экспрессии Т-кадгерина в клетках неопластических образований и об изменении экспрессии стандартных маркеров сосудов.

На модели гематогенно метастазирующей в лёгкие меланомы у мышей получены результаты подтверждающие тот факт, что Т-кадгерин является антиангиогенной молекулой и подавляет васкуляризацию первичного опухолевого узла. В тоже время, гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы активируют компенсаторные механизмы, способствующие их большей выживаемости, миграции и инвазии раковых клеток. Клетки меланомы начинают секретировать хемокины, молекулы адгезии, протеазы и факторы роста, способствующие привлечению мезенхимных стромальных клеток, что способствует опухолевому росту и метастазированию. Эти данные не позволяют считать Т-кадгерин опухолевым «супрессором».

При атеросклерозе экспрессия Т-кадгерина в сосудистых клетках увеличивается. Известно, что высокий уровень ЛНП в крови коррелирует с накоплением липидов в сосудистой

стенке и прогрессированием атеросклероза. Физиологическая роль Т-кадгерина в сосудах при этом долгое время оставалась неизвестна. В настоящей работе впервые показано, что Т-кадгерин является рецептором ЛНП, опосредующим активацию внутриклеточной сигнализации с участием $[Ca^{2+}]_{in}$ и миграцию клеток по градиенту ЛНП.

Многие патологические состояния, в том числе и атеросклероз, сопровождаются эндотелиальной дисфункцией, для которой характерно нарушение барьерной функции эндотелия. Мы обнаружили, что Т-кадгерин участвует в регуляции проницаемости эндотелиального монослоя и установили молекулярные механизмы развития этих эффектов. В эндотелии Т-кадгерин вызывает активацию малых Rho ГТФаз, их нисходящих сигнальных посредников ROCK-II, LIMK и PAK1, перестройку актинового цитоскелета и микротрубочек, интернализацию VE-кадгерина с поверхности мембраны и его деградацию в лизосомах.

Таким образом, Т-кадгерин является многофункциональной молекулой. Гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на контактирующих клетках лежит в основе регуляции процессов ангиогенеза. В зрелых сосудах Т-кадгерин функционирует как сигнальная молекула, регулирующая проницаемость эндотелиального монослоя. Т-кадгерин является рецептором ЛНП, опосредующим их сигнальные эффекты в сосудистой стенке и миграцию клеток по градиенту ЛНП, что может приводить к ремоделированию кровеносных сосудов.

Перспективы исследований и дальнейшая разработка темы:

В настоящем исследовании впервые получены данные об экспрессии Т-кадгерина в сердечно-сосудистой системе и головном мозге в эмбриогенезе у мыши, что указывает на целесообразность изучения роли Т-кадгерина в морфогенезе формирующихся структур сердца и мозга, а также их васкуляризации.

Прогрессирование атеросклероза сопровождается увеличением экспрессии Т-кадгерина в сосудистых клетках. Обнаруженное увеличение количества CD31/Т-кадгерин двойных позитивных клеток в субэндотелиальном слое и в медиі позволяет предполагать, что эти клетки, являются активированными резидентными клетками-предшественниками сосудистой стенки или прогениторными клетками, мигрировавшими из костного мозга. Изучение роли Т-кадгерина в направленной миграции стволовых/прогениторных клеток является перспективным с точки зрения изучения механизмов регенерации и морфогенеза и роли навигационных молекул в этих процессах.

Недавно появились данные о том, что Т-кадгерин способен специфически связываться не только с ЛНП, но и с высокомолекулярными комплексами адипонектина. Именно высокомолекулярные комплексы адипонектина обладают защитным антиатерогенным

действием в сосудистой стенке и кардиопротективным в миокарде. Существование этих двух лигандов позволяет предположить конкуренцию между ними за связывание с Т-кадгерином. Использование трансгенных животных и животных моделей сердечно-сосудистых заболеваний позволит выяснить роль Т-кадгерина в функционировании системы кровообращения и развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. В эмбриогенезе у мыши экспрессия мРНК и белка Т-кадгерина в головном мозге и в сердечно-сосудистой системе коррелирует с процессами активного формирования и роста сосудов.

2. Снижение уровня экспрессии Т-кадгерина коррелирует с малигнизацией таких новообразований кожи человека, как псориаз, кератоз, кератоакантома, базалиома, плоскоклеточный и метатипический рак и меланома.

3. Экспрессия Т-кадгерина в опухолевых клетках приводит к подавлению неоангиогенеза в первичном узле меланомы у мышей. Однако Т-кадгерин не может считаться опухолевым супрессором, поскольку клетки меланомы, экспрессирующие Т-кадгерин, «включают» гены, способствующие их большей выживаемости, миграции, инвазии и метастазированию.

4. Т-кадгерин является навигационной молекулой не только в нервной системе, но и в кровеносных сосудах. Экспрессия Т-кадгерина в клетках стромы подавляет прорастание в нее кровеносных сосудов. В основе эффектов Т-кадгерина лежит гомофильное взаимодействие, подавление миграции эндотелиальных клеток и формирования капилляро-подобных структур.

5. Т-кадгерин участвует в регуляции барьерной функции эндотелия: экспрессия Т-кадгерина в клетках повышает проницаемость эндотелиального монослоя, а подавление Т-кадгерина - снижает. Регуляция проницаемости эндотелия Т-кадгерином осуществляется при участии Rho белков (RhoA, Cdc42, Rac1), ROCK-II, LIMK и PAK1, LIM киназ, и сопровождается эндоцитозом VE-кадгерина, перестройкой как актинового, так и тубулинового цитоскелета.

6. Т-кадгерин экспрессируется в интиме, меди и адвентиции нормальной аорты во всех слоях; его экспрессия повышается при атеросклерозе в липидной полоске, нестабильной фиброатероме и при мягком кальцинозе. При атеросклерозе отмечается увеличение количества двойных позитивных по CD31 и Т-кадгерину клеток в субэндотелиальном слое и в меди сосудов.

7. Т-кадгерин может участвовать в ремоделировании кровеносных сосудов при развитии атеросклероза, так как является рецептором ЛНП, опосредующим Ca^{2+} сигнализацию и направленную миграцию клеток по градиенту концентрации ЛНП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, соответствующих перечню ВАК РФ:

1. Рубина, К.А., Ткачук, В.А. Т-кадгерин как антиадгезивная молекула и возможный рецептор липопротеидов низкой плотности в клетках кровеносных сосудов. // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова – 2004 – Vol. 90. – №8. – Р. 968-986.
2. Ткачук, В.А., Стамбольский, Д.В., Рубина, К.А., Семина, Е.В., Сторожевых, Т.П., Черенков, В.А., Иванов, Д.Б., Войно-Ясенецкая, Т.А., Парфенова, Е.В. Т-кадгерин новый рецептор липопротеидов плазмы крови, влияющий на клеточную миграцию // Технологии живых систем – 2005 – Т.2. – №1-2. – С. 27-36.
3. Рубина, К.А., Калинина, Н.И., Парфенова, Е.В., Ткачук, В.А. Т-кадгерин как рецептор, участвующий в регуляции ангиогенеза и ремоделировании кровеносных сосудов // Биологические мембраны – 2007 – Т.24. – №1. – С. 65-72.
4. Рубина, К.А., Калинина, Н.И., Семина, Е.В., Потехина, А.В., Ефименко, А.Ю., Ратнер Е.И., Ткачук В.А. Роль Т-кадгерина в регуляции роста кровеносных сосудов. // Кардиологический вестник – 2007 – Т.2. – №2. – С. 15-24.
5. Семина, Е.В., Рубина, К.А., Руткевич, П.Н., Войно-Ясенецкая, Т.А., Парфенова, Е.В., Ткачук, В.А. Т-кадгерин активирует Rac1 и Cdc42 ГТФазы и влияет на проницаемость эндотелия // Биохимия - 2009 – Т. 74. - № 4. - С. 448-458.
6. Рубина, К.А., Калинина, Н.И., Ефименко, А.Ю., Лопатина, Т.В., Мелихова, В.С., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. Механизм стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде с помощью стромальных клеток жировой ткани // Кардиология – 2010 – Т.50. - №2. - С. 51-61.
7. Ефименко, А.Ю., Старостина, Е.Е., Рубина, К.А., Калинина, Н.И., Парфенова, Е.В. Влияние гипоксии и воспалительных факторов на жизнеспособность и ангиогенную активность мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга // Цитология – 2010 – Т.52. – №2. – С. 144-154.
8. Юрлова, Е.В., Рубина, К.А., Сысоева, В.Ю., Шаронов, Г.В., Семина, Е.В., Парфенова, Е.В., Ткачук, В.А. Т-кадгерин подавляет пролиферацию мышинной меланомы B16F10 in vitro и опухолевый ангиогенез на модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона // Онтогенез – 2010 – Т. 41. – № 4. – С. 261-270.
9. Калинина, Н.И., Сысоева, В.Ю., Рубина, К.А., Парфенова, Е.В., Ткачук В.А. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta naturae – 2011 – Т.3. – №4 (11). – С. 32-39.
10. Рубина, К.А., Сысоева, В.Ю., Семина, Е.В., Юрлова, Е.И., Молочков, В.А., Хлебникова, А.Н., Седова, Т.Г. Особенности экспрессии Т-кадгерина в кератиноцитах и сосудах эпителиальных опухолей кожи // Российский журнал кожных и венерических болезней – 2013 – №1. – С. 9 – 14.
11. Рубина, К. А., Смутова, В. А., Семенова, М. Л., Поляков, А. А., Gerety, S., Wilkinson, D., Суркова, Е. И., Семина, Е. В., Сысоева, В. Ю., Ткачук, В. А. Выявление экспрессии Т-кадгерина в эмбриогенезе у мыши // Acta naturae - 2015 - Vol.7 - №2. - Р.93-101.

Статьи в международных научных системах Web of Science и Scopus:

1. Rubina K., Talovskaya E., Cherenkov V., Ivanov D., Stambolsky D., Storozhevych T., Pinelis V., Shevelev A., Parfyonova E., Resink T., Erne P., Tkachuk V. LDL induces intracellular signalling and cell migration via atypical LDL-binding protein T-cadherin // *Molecular and cellular biochemistry* - 2005. – Vol. 273. – №1-2. – P. 33-41.
2. Rubina K., Kalinina N., Potekhina A., Efimenko A., Semina E., Poliakov A., Wilkinson D., Parfyonova E., Tkachuk V. T-cadherin suppressed angiogenesis in vivo by inhibiting migration of endothelial cells // *Angiogenesis*. - 2007. - Vol. 10. - № 3. - P. 183-195.
3. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Parfyonova E. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation // *Tissue Engineering - Part A* - 2009. - Vol. 15. - №8. - P. 2039-2050.
4. Ткачук В.А., Семина Е.В., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И., Стамбольский В.Д., Парфенова Е.В. Навигационные рецепторы клеток: физиологическая роль и механизмы функционирования // *Фізіологічний журнал* – 2011. – Т.57. – №5. – С. 80-83.
5. Semina E.V., Rubina K.A., Sysoeva V.Y., Rutkevich P.N., Kashirina N.M., Tkachuk V.A. Novel mechanism regulating endothelial permeability via T-cadherin-dependent VE-cadherin phosphorylation and clathrin-mediated endocytosis. // *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014. Vol. 387, № 1-2. P. 39-53.

Главы в книгах и сборниках:

1. Rubina K., Kalinina N., Parfyonova E., Tkachuk V. Cadherin signaling in vascular cells: T-cadherin is a new player // In: “Signal Transduction Research Trends”, Nova Science Publishers, Inc, United States - 2007. - P. 95-129.
2. Калинина Н.И., Ефименко А.Ю., Лопатина Т.В., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Стимуляция роста кровеносных сосудов и нервных волокон с помощью стромальных клеток жировой ткани // В сборнике: «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения» под ред. Акад. Ткачука В. Литтерра, Москва - 2009. - С. 74-90.
3. Rubina K., Sysoeva V., Semina E., Yurlova E., Khlebnikova A., Molochkov V., Tkachuk V. 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 // In: “Tumor Angiogenesis”, Ed. by S. Ran, InTech, Rijeka – 2012. – Vol. 2. – P. 135-166.
4. Сысоева В.Ю., Калинина Н.И., Рубина К.А. Современные представления о стволовых клетках // В сборнике: «Актуальные проблемы биологии: сборник статей №2» под ред. Морзунова И. Москва, Дрофа – 2012. – Т. 2. – С. 145-159.
5. Rubina K., Sysoeva V., Semina E., Yurlova E., Khlebnikova A., Molochkov V., Tkachuk V. 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. // In: “Research directions in tumor angiogenesis”, Ed. by J. Chai, InTech, Rijeka – 2013. – P. 143-174.
6. Семина Е.В., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И. Современные методы лабораторных исследований в регенеративной медицине. Ижевский институт компьютерных исследований, Ижевск. – 2014. – 107 с.

Основные тезисы докладов на научных конференциях:

1. Rubina K.A., Semina E.V., Stambolsky D.V., Philippova M.I., Ivanov D.P., Resnik T., Erne P., Storozhevikh T., Pinelis V.G., Parfyonova Y.V., Tkachuk V.A. T-cadherin is an atypical LDL receptor: LDL binding causes intracellular signaling and cell migration // 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2004.
2. Таловская Е.В., Черенков В., Гурченко И., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Пинелис В.Г., Сторожевых Т.П., Ткачук В.А. Связывание липопротеидов низкой плотности с Т-кадгерином вызывает повышение внутриклеточного кальция // Российская Кардиология: от центра к регионам. Материалы Конгресса, Томск – 2004. – P. 468-469.
3. Talovskaya E., Rubina K., Cherenkov V., Storozhevikh T., Pinelis V., Parfyonova Y., Tkachuk V. T-cadherin is an atypical LDL-receptor: LDL binding causes // FEBS Journal – 2005. – Vol. 272. – P. 272.
4. Rubina K.A., Kalinina N.I., Bochkov V.N., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin as an antiadhesive and guidance molecule interacting with low density lipoproteins // Ann EAS Conference, 2005.
5. Rubina K.A., Kalinina N.I., Potehina A.V., Efimenko A.Yu., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin - a novel inhibitor of angiogenesis // 17th European Students Conference, Berkin, Germany. - 2006.
6. Rubina K.A., Kalinina N.I., Efimenko A.Yu., Potehina A.V., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin negatively regulates angiogenesis in vivo // XIV International Vascular Biology Meeting, Noordwijkerhout, Netherlands. - 2006.
7. Talovskaya E., Gorovoy M., Rubina K., Tkachuk V., Voyno-Yasenetskaya T. T-cadherin regulates microtubules, Rho family proteins // Vascular Pharmacology – 2006. – Vol. 45. – № 3. – P. 82-83.
8. Rubina K.A., Калинина Н.И. Kalinina N.I., Potehina A.V., Efimenko A.Yu., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin negatively regulates angiogenesis in vivo // 20th IMSSC (International Medical Sciences Student congress), Istanbul, Turkey. – 2006.
9. Rubina K.A., Tsokolaeva Z.I., Melikhova V., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Stromal Vascular Cells stabilize vessel-like structures in vitro through cell-cell contacts and secreted angiogenic factors // Third International Meeting on Angiogenesis. VU University Medical Center, Amsterdam, Netherlands. – 2007.
10. Tsokolaeva Z.I., Rubina K.A., Melikhova V. Adipose tissue stromal cells in vitro angiogenesis inducers // IFATS International federation of adipose therapeutics and science, Fifth Annual Meeting. – 2007.
11. Парфенова Е.В., Трактюев Д.О., Цоколаева З.И., Калинина Н.И., March K.L., Ткачук В.А. Стромальные клетки жировой ткани – ангиогенные свойства и терапевтический потенциал // XX съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова, Издательский дом «Русский врач» Москва. - 2007.
12. Rubina K.A., Kalinina N.I., Potehina A.V., Efimenko A., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin attenuates angiogenesis via downregulation of ECs migration and vascular network formation // Third International Meeting on Angiogenesis. VU University Medical Center, Amsterdam, Netherlands. – 2007.
13. Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Yurlova E.I., Semina E.V., Andronova E.V., Treshalina H. M., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin expression in murine melanoma suppresses neovascularization in chorioallantoic membrane model // Third International Meeting on Angiogenesis. VU University Medical Center, Amsterdam, Netherlands. – 2007.
14. Юрлова Е.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А. Исследование роли Т-кадгерина в опухолевом ангиогенезе на модели хорио-аллантадной мембраны куриного зародыша и росте опухоли in vitro // V конференция молодых учёных России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», Москва, Россия. – 2008.
15. Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Калинина Н.И., Чаусская И.Ю., Дробышев А.Ю., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Разработка методики выделения, культивирования и криоконсервации аутологических культивируемых мезенхимальных стромальных клеток человека // Пятый съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Москва, Россия. – 2008.
16. Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И., Юрлова Е.И., Потехина А.В., Ефименко А.Ю., Андронova Н.В., Трещалина Е.М., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Подавление опухолевого ангиогенеза с использованием плазмидного вектора, содержащего кДНК для экспрессии Т-кадгерина // Всероссийская научная конференция с международным участием “Нанотехнологии в онкологии 2008”. Москва, Россия. – 2008.
17. Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Yurlova E.I. Semina E.V., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin overexpression suppresses proliferation and increase differentiation of murine melanoma cells in culture // Annual meeting of The International society for cell and gene therapy of cancer. Cork, Ireland. – 2009.
18. Semina E., Parfyonova E., Sysoeva V., Rubina K., Tkachuk V. Expression of T-cadherin increases phosphorylation and clathrin-dependent internalization of VE- in endothelial cells // The 16th International Vascular Biology Meeting. Los Angeles. USA – 2010. – Vol. 16. - P. 20-23.
19. Yurlova E., Rubina K., Sysoeva V., Semina E., Parfyonova Y., Tkachuk V. T-cadherin overexpression in culture of murine melanoma cells suppresses proliferation // FEBS Journal – 2010. – Vol. 277. – P. 163-163.

20. Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Yurlova E.I., Smina E.V., Parfyonova Ye.V., Tkachik V.A., T-cadherin overexpression in culture of murine melanoma cells suppresses proliferation // 35th FEBS Congress "Molecules of life", Gothenburg, Sweden. – 2010.
21. Ткачук В.А., Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Rubina K.A., Парфенова Е.В. Физиологические механизмы регуляции секреторной активности и миграции мезенхимных стволовых клеток // IV Всероссийская научная школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина», Москва, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Медицинский центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия. – 2011.
22. Semina E., Rubina K., Sysoeva V., Tkachuk V. Novel mechanism regulating vascular permeability via T-cadherin dependent VE-cadherin phosphorylation and clathrin-mediated endocytosis // International Vascular Biology Meeting, Wiesbaden, Germany. P. 465. – 2012.
23. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В. Секреторная активность мезенхимных стволовых клеток в регенерации тканей // V Всероссийская научная школа-конференция "Стволовые клетки и регенеративная медицина", Москва, Россия. – 2013.
24. Rubina K. A T-cadherin: role in melanoma growth, angiogenesis and stromal recruitment // BIT's 6th Annual World Cancer Congress. Xi'an, China. - 2013. P. 103.

Патент

2007 Способ локального подавления ангиогенеза в ткани-мишени. Авторы: Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Рубина К.А., Калинина Н.И. #2292395, 27 января.

Список сокращений

bFGF - основной фактор роста фибробластов
 c-Met – MET, hepatocyte growth factor receptor (HGFR), рецептор фактора роста гепатоцитов
 DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол, маркер ядерной ДНК
 DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium, среда Игла, модифицированная Дульбекко
 EGF - Epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста
 EST - expressed sequence tag
 FBS – fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка
 FGF - фактор роста фибробластов
 FITC –декстран- флуоресцеинизотиоцианат-декстран
 GFP- green fluorescent protein, зелёный флуоресцирующий белок
 GFR Матригель - Матригель без факторов роста
 GPI – Glycophosphatidylinositol, гликозилфосфатидилинозитол
 HGF- hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов
 HUVEC – human vein umbilical endothelial cell
 IL-8- интерлейкин-8
 MCP-1 -белок, вызывающий хемотаксис моноцитов
 M-CSF- гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
 MMP – Matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа
 NUDE - линия бестимусных мышей
 OD – optical density, оптическая плотность
 PCR - polymerase chain reaction, ПЦР - полимеразная цепная реакция

PDGF - platelet derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста

RT-PCR – real time polymerase chain reaction, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

SDF1 – Stromal cell-derived factor-1, хемокин подсемейства CXC

shRNA- короткие шпилечные РНК олигонуклеотиды

si-Т-кад – подавление экспрессии Т-кадгерина РНК интерференцией

TGF-beta 1- трансформирующий фактор роста-бета 1

TNF α - фактор некроза опухолей

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

АК – актинический кератоз

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГМК – гладкомышечные клетки

КА - кератоакантома

кДНК – копия ДНК

ЛК - легочный коэффициент

ЛНП - липопротеиды низкой плотности

МР – метатипический рак

МСК-ЖТ - мезенхимные стромальные клетки жировой ткани

МТ - микротрубочки

ПР – плоскоклеточный рак

ФСБ – фосфатно-солевой буфер