

Навигационные рецепторы клеток: физиологическая роль и механизмы функционирования

**В.А. Ткачук, Е.В. Семина, К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева,
Н.И. Калинина, В.Д. Стамбольский, Е.В. Парфенова**

Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Адгезия, миграция и инвазия клеток играют важную роль в формировании тканей и органов в эмбриогенезе, поддержании архитектуры тканей во взрослом организме в норме и при патологии. Клетки мигрируют по градиенту хемоаттрактанта по траекториям, которые определяют навигационные рецепторы. Урокиназа (uPA), её рецептор (uPAR/CD87) и ингибиторы урокиназы (PAI) вовлечены в регуляцию клеточной адгезии и миграции, прежде всего как система, регулирующая протеолиз внеклеточного матрикса на поверхности клеток: связывание урокиназы с рецептором uPAR/CD87 обеспечивает локальную деградацию белков внеклеточного матрикса на лидирующем крае, что опосредует направленное движение клеток. Урокиназа синтезируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, эпителиальными клетками, фибробластами, моноцитами/макрофагами, а также клетками злокачественных опухолей различного происхождения. Экспрессия uPA регулируется различными факторами: воспалительными, цитокинами, факторами роста и опухолевыми промоторами. В структуре урокиназы выделяют три домена – N-концевой домен, подобный эпидермальному фактору роста (GFD), крингл-домен и C-концевой каталитический домен. Домен GFD ответственен за связывание урокиназы с её рецептором uPAR/CD87, крингл-домен урокиназы облегчает связывание GFD-домена с рецептором uPAR/CD87, а каталитический домен урокиназы

участвует в расщеплении плазминогена с образованием плазмина, который в свою очередь обеспечивает протеолиз внеклеточного матрикса. Плазмин, благодаря мультисубстратной специфичности, способен активировать ряд металлопротеиназ, которые в свою очередь расщепляют матриксные белки. Таким образом, урокиназа, модифицируя матриксное окружение клетки, оказывает влияние на её функциональное состояние.

Существует также множество данных, свидетельствующих о том, что помимо обеспечения внеклеточного протеолиза урокиназа при связывании с мембранными рецепторами вызывает активацию процессов внутриклеточной сигнализации, приводящих к перестройке цитоскелета и перераспределению адгезивных контактов, и тем самым оказывает влияние на адгезию и миграцию клеток независимо от своей протеолитической активности. Предполагается, что сигнальные эффекты урокиназы могут опосредовать рецептор урокиназы uPAR/CD87, являющийся гликозил-фосфатидилинозитол (ГФИ)-заякоренным белком, имеющий трёхдоменную структуру во внеклеточной части. Благодаря заякорению через ГФИ, рецептор урокиназы обладает высокой степенью подвижности в плазматической мембране, причём его локализация зависит от функционального состояния клетки. В покоящейся клетке рецептор uPAR/CD87 равномерно распределён по поверхности цитоплазматической мембраны, однако при миграции клетки

происходит кластеризация рецептора α PAR/CD87 на лидирующем крае, обеспечивая векторное ее перемещение по градиенту хемоаттрактанта. Рецептор урокиназы, как и многие ГФИ-заякоренные белки, локализован в “липидных плотках” – определенных участках плазматической мембраны, обогащенных гликофинголипидами и холестерином. Здесь же сконцентрированы многие сигнальные молекулы: Ca^{2+} -АТФаза, Ca^{2+} -каналы, белки семейства Src-киназ, протеинкиназа C, G-белки, кавеолин и др. ГФИ-рецепторы лишены трансмембранного и цитоплазматического доменов, а механизмы передачи сигнала от этих рецепторов на внутриклеточные сигнальные мишени остаются до конца не известными. Поскольку эти рецепторы не способны непосредственно контактировать с внутриклеточными сигнальными посредниками, очевидно, что должны существовать трансмембранные белки-адапторы, обеспечивающие сопряжение систем “принятия” и передачи сигнала. Существуют данные, свидетельствующие о том, что интегрины, кавеолин, витронектин, L-селектин могут являться белками-адапторами для рецептора урокиназы. Так, взаимодействие урокиназного рецептора с белком внеклеточного матрикса витронектином способствует внеклеточной адгезии, а взаимодействие рецептора с лейкоцитарным интегрином Mac-1 наоборот, активирует клеточную миграцию.

Крингл-домен урокиназы также вовлечён в индукцию внутриклеточной сигнализации, миграции и адгезии клеток. Было обнаружено, что крингл-домен взаимодействует с ростовым доменом урокиназы. Предполагается, что ростовой домен урокиназы закрывает эпитопы связывания на крингл-домене, но благодаря взаимодействию ростового домена с α PAR/CD87 происходит экспозиция крингл-домена, его связывание с интегринными, в результате происходит запуск внутриклеточной сигна-

лизации и миграции клеток. Помимо описанных сигнальных путей нами было обнаружено, что одноцепочечная урокиназа, взаимодействуя с нуклеолином, способна транслоцироваться в ядро. Под воздействием урокиназы в ядре происходит активация транскрипции гена гладкомышечного актина в фибробластах и запускаются процессы трансдифференцировки клеток из фибробластов в миофибробласты. Таким образом, урокиназа является важнейшим регулятором клеточной адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Свои эффекты урокиназа опосредует как через протеолитическую активность, так и за счёт активации внутриклеточной сигнализации и транскрипции генов.

В последнее время накапливаются данные о другом представителе ГФИ-заякоренных белков, который также способен активировать процессы внутриклеточной сигнализации, направленные на клеточную миграцию и пролиферацию. Это атипичный представитель кадгеринового суперсемейства T-кадгерин. “Классические” кадгерины представляют собой семейство трансмембранных рецепторов, опосредующих кальцийзависимую гомофильную адгезию во всех тканях и органах. “Классические” кадгерины содержат внеклеточную часть, состоящую из пяти кальцийсвязывающих доменов и ответственную за гомофильное узнавание, трансмембранные и цитоплазматические домены. “Классические” кадгерины обеспечивают формирование стабильных межклеточных адгезивных контактов за счет взаимодействия с компонентами актинового цитоскелета посредством белков катенинов и плакоглобинов. Внеклеточная часть T-кадгерина гомологична “классическим” кадгеринам и также состоит из пяти кадгериновых повторов, однако T-кадгерин лишён трансмембранного и цитоплазматического доменов, а заякорен на мембране через

ГФИ, где, как было сказано выше, сосредоточено большое количество белков сигнального каскада, что позволяет предположить участие Т-кадгерина в активации внутриклеточной сигнализации. Механизм внутриклеточной сигнализации через “классические” кадгеринины в целом установлен, тогда как вопрос о проведении сигнала от Т-кадгерина внутрь клетки остается открытым. Очевидно, что для ГФИ-заякоренного Т-кадгерина, как и для ГФИ-заякоренного рецептора урокиназы, должны существовать трансмембранные адаптеры, но пока о них мало что известно.

При изучении экспрессии Т-кадгерина в норме в различных органах и тканях было показано, что максимальная экспрессия Т-кадгерина наблюдается в сердечно-сосудистой системе (в кардиомиоцитах, эндотелии, гладкомышечных клетках и перicyтах) и в нервной системе. Т-кадгерин, по всей видимости, является навигационной молекулой, осуществляющей отрицательную навигацию роста аксонов к своим мишеням в процессе эмбриогенеза: растущие аксоны избегают на своем пути участков, где экспрессирован Т-кадгерин. Кроме того, в нашей лаборатории было показано, что в процессах неангиогенеза Т-кадгерин подавляет миграцию эндотелиальных клеток в результате гомофильного взаимодействия молекул Т-кадгерина на поверхности эндотелиальных клеток и клеток стромы, также экспрессирующей Т-кадгерин. Нами были получены данные о том, что экспрессия Т-кадгерина возрастает при атеросклеротических поражениях сосудов. Известно, что атеросклероз сопровождается накоплением липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и холестерина в сосудистой стенке, нарушением проницаемости эндотелия и стенозированием просвета сосуда. Было высказано предположение, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в сосудах при атеросклерозе не случайна, и возможно, это связано с негативным воз-

действием ЛНП на сосудистую стенку. Накопление ЛНП в клетках сосудов происходит через классический апоВ/Е-рецептор ЛНП, но тем не менее, ЛНП способны вызывать ряд “гормоноподобных” эффектов, в основе которых лежит активация систем внутриклеточной сигнализации. В отличие от хорошо изученного “метаболического” действия ЛНП, опосредуемого апоВ/Е-рецептором, механизмы “гормоноподобных” эффектов неизвестны, также неизвестен рецептор, сопряженный с системами вторичных посредников. Ранее в нашей лаборатории удалось обнаружить атипичный участок специфического связывания ЛНП на культивируемых гладкомышечных клетках сосудов, которым оказался Т-кадгерин. Связывание Т-кадгерина с ЛНП низкоаффинное, K_d связывания ЛНП с Т-кадгерином намного выше, чем с K_d связывания ЛНП с классическим рецептором: K_d апоВ/Е составляет 1-2 мкг/мл, а K_d Т-кадгерина находится в пределах 60 мкг/мл. При взаимодействии ЛНП с Т-кадгерином активируется фосфоинозитидный обмен, накапливается диацилглицерол в мембране, увеличивается концентрация внутриклеточного Ca^{2+} за счёт выхода кальция из ЭПР, а также активируется миграция клеток по градиенту ЛНП.

В настоящее время в нашей лаборатории исследуется роль Т-кадгерина в регуляции проницаемости эндотелия. В норме эндотелиальные клетки экспрессируют Т-кадгерин, однако при состояниях, связанных с нарушением проницаемости эндотелия, экспрессия Т-кадгерина возрастает. Мы предположили, что Т-кадгерин также участвует в регуляции проницаемости сосудов. Действительно, эктопическая гиперэкспрессия Т-кадгерина в эндотелиальных клетках сопровождается увеличением проницаемости монослоя этих клеток, а подавление нативной экспрессии Т-кадгерина наоборот, усиливает барьерную функцию эндотелия, снижая проницаемость их монослоя. В основе механизма регуляции

проницаемости лежит активация систем внутриклеточной сигнализации с участием RhoA/Rac1/Cdc42 ГТФаз: при гиперэкспрессии Т-кадгерина в эндотелии увеличивается содержание не только активированных форм ГТФаз, но также и их прямых нисходящих посредников: ROCK, PAK, LIMK. При этом активация этого сигнального пути приводит к перестройкам актинового и тубулинового цитоскелета: в клетках, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, возрастает полимеризация стресс-фирилл-актина и деполимеризация микротрубочек, а при подавлении нативной экспрессии Т-кадгерина наоборот, актин деполимеризуется, а микротрубочки полимеризуются. Кроме того, гиперэкспрессия Т-кадгерина также разрушает VE-кадгериновые адгезивные контакты: наблюдается формирование межклеточных щелей в зоне межклеточной адгезии в монослое эндотелиальных клеток, увеличивается тирозинное фосфорилирование внутриклеточного домена VE-кадгерина по участку связывания с бета-катенином. Фосфорилирование VE-кадгерина приводит к блокированию связывания VE-кадгерина с адаптерными белками (катенинами), разрушает связь катенинов с цитоскелетом клетки, и дестабилизирует адгезивные контакты. В результате происходит клат-

рин-зависимый эндоцитоз VE-кадгерина и его деградация в лизосомах.

Есть данные, свидетельствующие о том, что Т-кадгерин ассоциирован с молекулами $\beta 1$ -интегринов на мембранах клеток, так как показано прямое влияние экспрессии Т-кадгерина на количество и эндоцитоз $\beta 1$ -интегрина в клетках карциномы. Такое прямое влияние экспрессии Т-кадгерина на уровень $\beta 1$ -интегрина, возможно, регулирует инвазивность и метастазирование опухолевых клеток, так как потеря интегринов опухолевыми клетками коррелирует со степенью малигнизации и инвазии в трансформированных клетках. Существуют также отдельные данные о возможном участии интегринассоциированной киназы IL3 в проведении сигнала с Т-кадгерина внутрь клетки. Ключевыми сигнальными белками, участвующими в данном каскаде, являются киназы GSK3 β и Akt, при активации которых происходит стабилизация в-катенина, транслокация его в ядро, и активация генов Lef/Tcf и Cyclin D1, ответственных за пролиферацию в эндотелиальных клетках.

Таким образом, существуют белки, выполняющие навигационную функцию, сигнализация с участием которых регулирует процессы направленной миграции, а также пролиферации и дифференцировки.