

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Балацкая Мария Николаевна

**Т-кадгерин как рецептор липопротеидов низкой плотности и
высокомолекулярной формы адипонектина: исследования
внутриклеточной сигнализации и белок-белковых взаимодействий**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины
Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители –

Ткачук Всеволод Арсеньевич
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН

Шаронов Георгий Владимирович
кандидат физико-математических наук

Официальные оппоненты –

Авдонин Павел Владимирович
доктор биологических наук, профессор
заведующий лабораторией физиологии
рецепторов и сигнальных систем
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Институт биологии развития им. Н.К.
Кольцова Российской академии наук»

Белоусов Всеволод Вадимович
доктор биологических наук, профессор РАН
заведующий лабораторией молекулярных
технологий Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки «Институт
биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук»

Орлов Сергей Николаевич
доктор биологических наук, профессор
заведующий лабораторией Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «26» апреля 2018 г. в ___ часов на заседании
Диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного
университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские
горы, д. 1, строение 24, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на
сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/32241428

Автореферат разослан « ____ » марта 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Увеличение концентрации липопротеидов низкой плотности (ЛНП) в крови является известным фактором риска развития атеросклероза, который ежегодно приводит к инвалидизации и смерти миллионов людей. ЛНП действуют на клетки сосудов как за счёт накопления внутри них путём эндоцитоза (*Goldstein and Brown 1977*), так и за счёт запуска внутриклеточной сигнализации (*Buhler et al., 1991*). ЛНП в гладкомышечных (ГМК), эндотелиальных клетках, фибробластах запускает быструю (секунды-минуты) гормоноподобную внутриклеточную сигнализацию: фосфоинозитидный каскад, увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме $[Ca^{2+}]_{in}$ и активацию протеинкиназы C, что приводит к пролиферации и миграции (*Buhler et al., 1991; Bochkov et al., 1992; Bochkov et al., 1993; Orlov et al., 1993; Resink et al., 1993; Bjorkerud and Bjorkerud 1994; Bochkov et al., 1994; Drobnik et al., 1995; Kipmen-Korgun et al., 2005; Rubina et al., 2005; Ткачук В.А. и др. 2005*). Доказано, что сигнальные эффекты запускаются не через переносчик ЛНП (рецептор липопротеидов низкой плотности, LDLR), а через T-кадгерин (*Tkachuk et al., 1998; Kipmen-Korgun et al., 2005; Rubina et al., 2005*).

У T-кадгерина есть внеклеточные кадгериновые домены (extracellular cadherin, EC1-EC5), гомологичные классическим кадгеринам, но отсутствуют трансмембранный и внутриклеточный домены. На мембране он заякорен при помощи гликозилфосфатидилинозитного (ГФИ) остатка (рис. 1) (*Ranscht and Dours-Zimmermann 1991*).

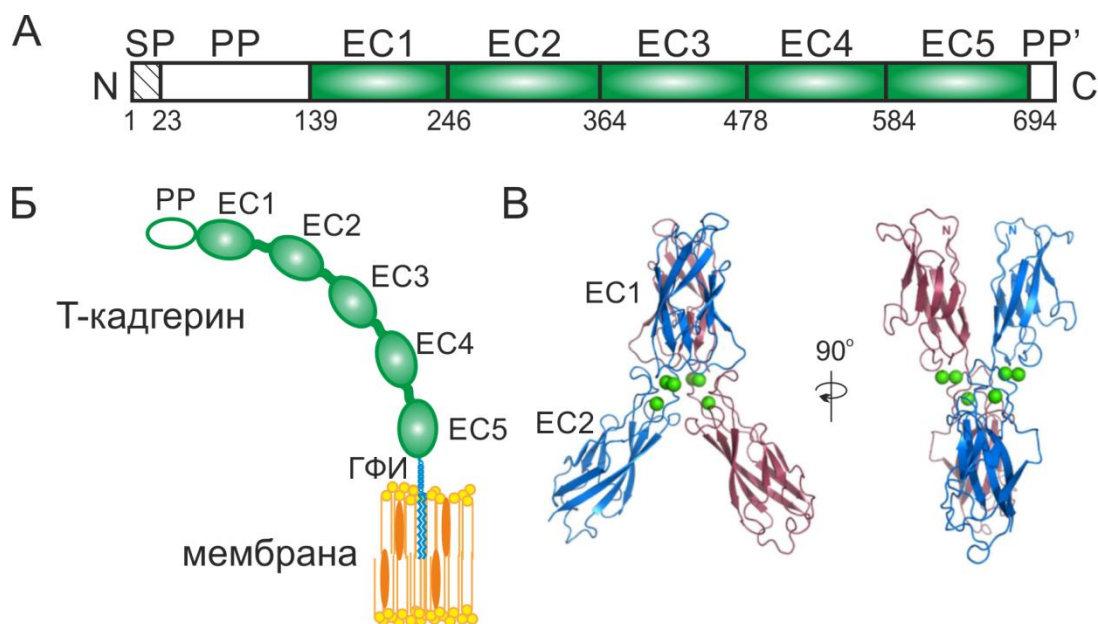


Рисунок 1. Структурные особенности Т-кадгерина [29]. А. Доменная организация препробелка Т-кадгерина. SP – сигнальный пептид, PP – пропептид, EC1-EC5 – внеклеточные кадгериновые домены (зелёные), PP' – пропептид, который заменяется на ГФИ-якорь. Числами обозначены первые аминокислотные остатки доменов. Б. Схематическое изображение структуры Т-кадгерина на поверхности мембраны. Обозначения те же, ГФИ – ГФИ-якорь (синий) на мембране (жёлто-оранжевая). В. Структура X-димера (из (Ciatto *et al.*, 2010)) первых двух доменов (EC1 и EC2) со связанными ионами кальция (зелёные).

Классические кадгеринины обеспечивают межклеточное взаимодействие, образуя олигомеры за счёт связывания EC1 одной молекулы с EC2 другой при взаимодействии в *цис*-конформации (обе молекулы расположены на одной клетке) и за счёт EC1-EC1 взаимодействия в *транс*-конформации (молекулы – на разных клетках) (Harrison *et al.*, 2011). Т-кадгерин отличается тем, что его EC1 стабилен в мономерной форме (не образует EC1-EC1), а EC1-EC2 образуют X-димер (рис.1, В), который для классических кадгеринов является лишь переходной формой при образовании структурно иного димера (Ciatto *et al.*, 2010). При гиперэкспрессии Т-кадгерина *in vitro* он также может обеспечивать адгезию клеток, но ЛНП её подавляет (Resink *et al.*, 1999), благодаря образованию более стабильного комплекса Т-кадгерин-ЛНП ($K_{D \text{ dimer}} = 41 \text{ мкМ}$ (Ciatto *et al.*, 2010), $K_{D \text{ LDL}} = 0,1 \text{ мкМ}$ (Tkachuk *et al.*, 1994)).

Неясно, как Т-кадгерин запускает внутриклеточную сигнализацию при взаимодействии с ЛНП, не имея внутриклеточного домена, и какую роль в

этом играет ГФИ-якорь. ГФИ-якорь, вероятно, способствует локализации Т-кадгерина в липидных рафтах (*Philippova et al., 1998*). Липидно-белковый состав рафтов, их время жизни, форма и функциональное значение могут значительно отличаться. Выделяют два основных типа рафтов: планарные рафты и кавеолы. ГФИ-заякоренные белки чаще обнаруживаются в планарных рафтах, более того, димеры ГФИ-заякоренных белков могут вызывать образование липидного рафта в липидном бислое, что ведет к связыванию липидированных белков с внутренней стороны мембраны и запуску внутриклеточной сигнализации (*Suzuki et al., 2007; Suzuki et al., 2012*).

В 2004 году было обнаружено, что у Т-кадгерина есть другой лиганд – высокомолекулярная форма адипонектина (Адипо), гормона жировой ткани, – который в отличие от ЛНП, защищает от патологий сердечно-сосудистую систему (*Hug et al., 2004*). Т-кадгерин связывается с Адипо на поверхности клеток сердца, аорты и скелетных мышц, без него Адипо не связывается с этими тканями, что приводит к возрастанию концентрации гормона в крови в 5 раз (*Denzel et al., 2010; Matsuda et al., 2014; Fujishima et al., 2017*). Взаимодействие Т-кадгерина с Адипо необходимо для реализации защитных механизмов при моделировании различных сердечно-сосудистых патологий (*Denzel et al., 2010; Parker-Duffen et al., 2013; Fujishima et al., 2017*).

Экспрессия Т-кадгерина высока в сердечно-сосудистой системе (*Ivanov et al., 2001*) и в крови постоянно присутствуют и ЛНП, и Адипо, поэтому описанные взаимодействия могут происходить и на одних и тех же клетках сосудов. Однако неизвестно, в чем причина различий действия ЛНП и Адипо через Т-кадгерин: димеризуется ли Т-кадгерин при связывании с лигандами и обязательно ли это приводит к запуску внутриклеточной сигнализации. В настоящей работе для ответа на эти вопросы были применены известные и разработаны оригинальные подходы с использованием оптических методов, позволяющие изучать лиганд-рецепторные взаимодействия, а также кинетику димеризации рецепторов на мембране живых клеток и $[Ca^{2+}]_{in}$ -ответа.

Изучение этих молекулярных механизмов позволит лучше понять фундаментальные основы передачи сигнала ГФИ-заякоренными рецепторами и возможность использования T-кадгерина в качестве фармакологической мишени.

Цель исследования:

Найти отличие влияния липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина на T-кадгерин-опосредованную внутриклеточную сигнализацию и на димеризацию T-кадгерина как возможную причину различной физиологической активности этих лигандов.

Задачи исследования:

1. Исследовать роль T-кадгерина в запуске внутриклеточной кальциевой сигнализации при действии липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина.
2. Разработать метод флуоресцентного мечения T-кадгерина на плазматической мембране живых клеток, не нарушающий его физиологическую активность.
3. Разработать метод измерения и анализа Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET), позволяющий регистрировать димеризацию T-кадгерина.
4. С помощью разработанного метода изучить влияние липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина на димеризацию T-кадгерина, а также временные характеристики этого процесса.

Научная новизна и практическая значимость исследования

Впервые проведено исследование совместного влияния липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина на внутриклеточную сигнализацию. Обнаружено подавление адипонектином индуцируемой липопротеидами $[Ca^{2+}]$ сигнализации, которое может лежать в основе известного феномена защиты сосудов и сердца (в тканях, в которых локализован T-кадгерин) адипонектином.

Для изучения первичных этапов лиганд-зависимой сигнализации был разработан метод флуоресцентного мечения Т-кадгерина путём клонирования короткого пептидного тэга (12 аминокислотных остатков) в последовательность белка после продомена, с последующей модификацией данного тэга флуоресцентным зондом с помощью фермента. В отличие от флуоресцентного мечения антителами и химер с флуоресцентными белками разработанный метод сохраняет активность и локализацию Т-кадгерина в клетке. С помощью данного метода мы измерили гомодимеризацию Т-кадгерина на мембране живых клеток и показали увеличение числа димеров при действии лигандов, причём кинетика формирования этих димеров при действии липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина значительно различалась. Этот метод представляет перспективным для изучения других ГФИ-заякоренных белков, которые имеют сигнальные последовательности с С- и N-конца и значительное количество посттрансляционных модификаций, что затрудняет создание физиологически активных химерных конструкций. Отработанный метод кинетических измерений FRET на живых клетках при помощи проточной цитометрии и конфокальной микроскопии применим к изучению и других мембранных белков.

Результаты данной работы способствуют пониманию молекулярных механизмов запуска внутриклеточной сигнализации Т-кадгерина, что может представлять интерес при разработке новых лекарственных препаратов.

Личный вклад автора в проведённое исследование заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении экспериментальных процедур (включая моделирование структуры белка на основе гомологичных последовательностей, препаративное ультрацентрифугирование, иммуноблотинг, клонирование, культивирование клеток, флуоресцентную микроскопию и проточную цитометрию), анализе и оформлении полученных результатов,

представлении результатов на научных мероприятиях и подготовке публикаций в научные журналы.

Апробация диссертации. Результаты были представлены на следующих научных мероприятиях: «Кардиология в свете новых достижений медицинской науки» 2012; «Seeing is Believing – Imaging the Processes of Life» 2013; «Extracellular vesicles – mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis» 2015; «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» 2017; «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» 2017; 2-nd ADFLIM School 2017; The 42nd FEBS Congress 2017. Также результаты работы обсуждались на семинарах кафедры биохимии и молекулярной медицины, НИЛ генных и клеточных технологий, лаборатории постгеномных технологий в медицине ФФМ МГУ в 2010-2017 гг, семинарах лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН в 2015, 2017 гг.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из списка обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка научных работ и списка литературы, состоящего из 254 источников. Объём диссертации 118 страниц, 31 рисунок и 3 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Действие ЛНП и адипонектина на $[Ca^{2+}]_{in}$ в гладкомышечных клетках человека. Ранее было показано, что ЛНП в ГМК запускает внутриклеточный сигнальный путь IP_3 - Ca^{2+} через T-кадгерин (Бочков 2005). Для настоящего исследования были выделены ГМК человека, которые экспрессировали специфический альфа-гладкомышечный актин (рис. 2). T-кадгерин в этих клетках локализован в одной или нескольких ограниченных областях мембраны, предположительно рафтах (рис. 2), которых около 13% мембраны ГМК (Schutz *et al.*, 2000). При фракционировании мембран ГМК T-кадгерин обнаруживается в детергент-нерастворимых микродоменах совместно с кавеолином (Philippova *et al.*, 1998). Однако этот метод не позволяет достаточно точно разделить разные типы рафтов.

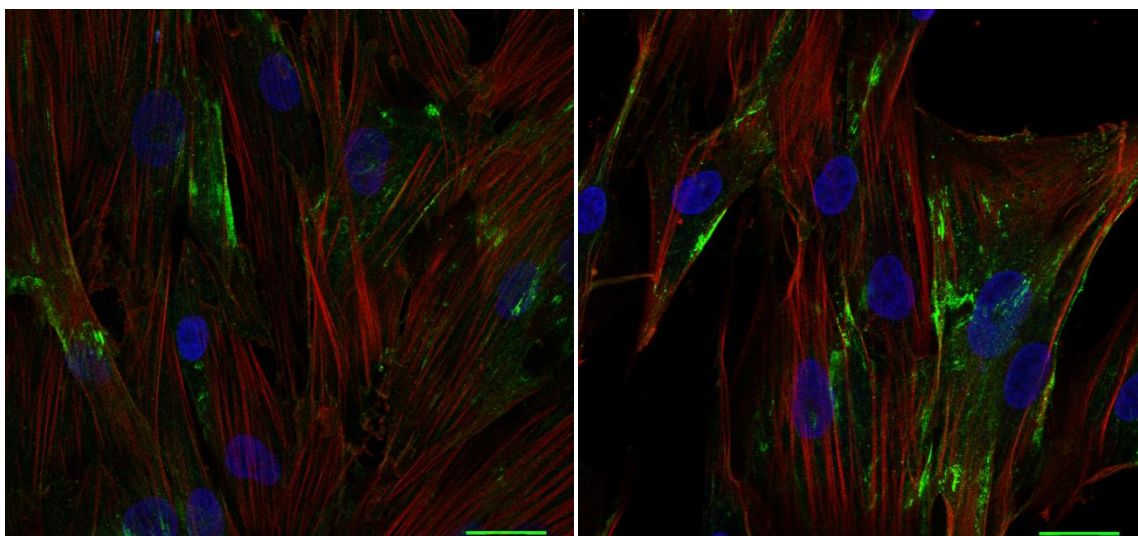


Рисунок 2. Иммунофлуоресцентный анализ распределения T-кадгерина на поверхности ГМК с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Альфа-гладкомышечный актин – красный цвет; T-кадгерин – зелёный цвет; ядра – синий цвет. Масштабный отрезок соответствует 30 мкм.

Для оценки отдельного и совместного действия двух лигандов (ЛНП и Адипо) регистрировали динамику изменения внутриклеточного $[Ca^{2+}]_{in}$ при помощи флуоресцентного зонда Fura-2 в одиночных клетках. Оказалось, что добавление Адипо, как и культуральной среды, не вызывает увеличения внутриклеточного $[Ca^{2+}]_{in}$ в отличие от ЛНП (рис. 3). Более того, Адипо способен статистически значимо подавлять ЛНП-индуцируемую кальциевую сигнализацию при совместном действии двух лигандов (рис. 3 Б).

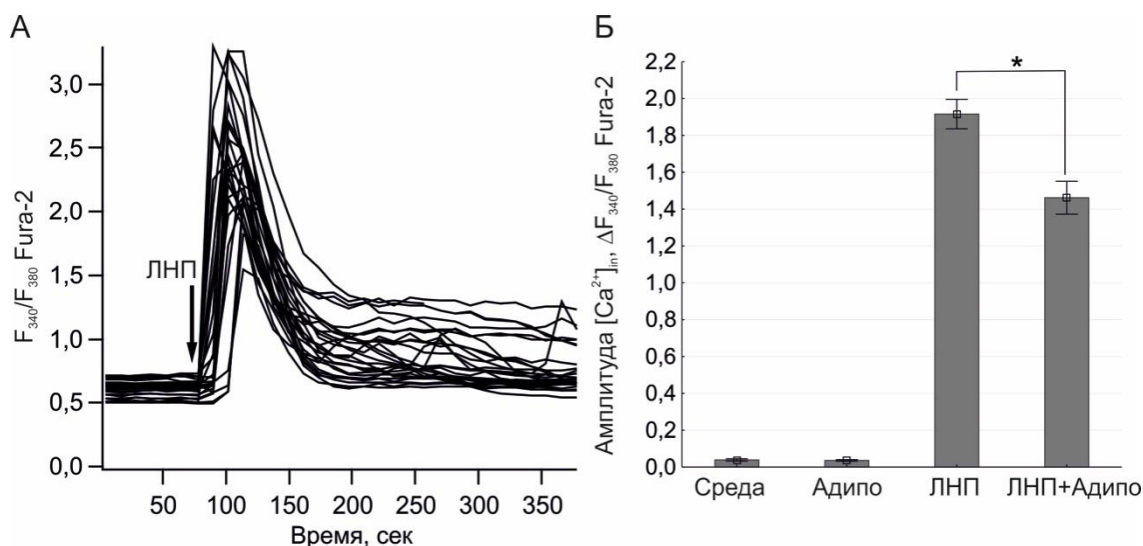


Рисунок 3. Анализ динамики изменения $[Ca^{2+}]_{in}$ с помощью флуоресцентной микроскопии. А. Повышение концентрации $[Ca^{2+}]_{in}$ в одиночных ГМК в ответ на добавление ЛНП, оцененное по отношению флуоресценции F_{340}/F_{380} в серии микроскопических изображений. Б. Амплитуда $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа при добавлении к ГМК среды культивирования (Среда), Адипо 10 мкг/мл, ЛНП 100 мкг/мл и их сочетания. Данные приведены в виде среднего \pm стандартная ошибка. Для сравнения 4 групп использовали дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом, показавшим достоверное различие между группами, особо отмечено * $p < 0,001$.

2. Т-кадгерин необходим для ингибирования ЛНП-индуцируемого $[Ca^{2+}]_{in}$ -ответа адипонектином. Для того, чтобы проверить, происходит ли ингибирование ЛНП-индуцируемой $[Ca^{2+}]_{in}$ через Т-кадгерин, мы использовали модель линейных клеток НЕК293, которые в норме не экспрессируют Т-кадгерин, и клоны с его гиперэкспрессией. Ранее было показано, что в этих клетках ЛНП-индуцируемая сигнализация сходна с таковой в первичных культурах по динамике $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа и ключевым участникам сигнального пути, что говорит об адекватности данной модели (Kipmen-Korgun et al., 2005; Rubina et al., 2005). В выбранных клонах Т-кадгерин в значительных количествах детектируется как в образцах общего белка, так и на поверхности клеток (рис. 4).

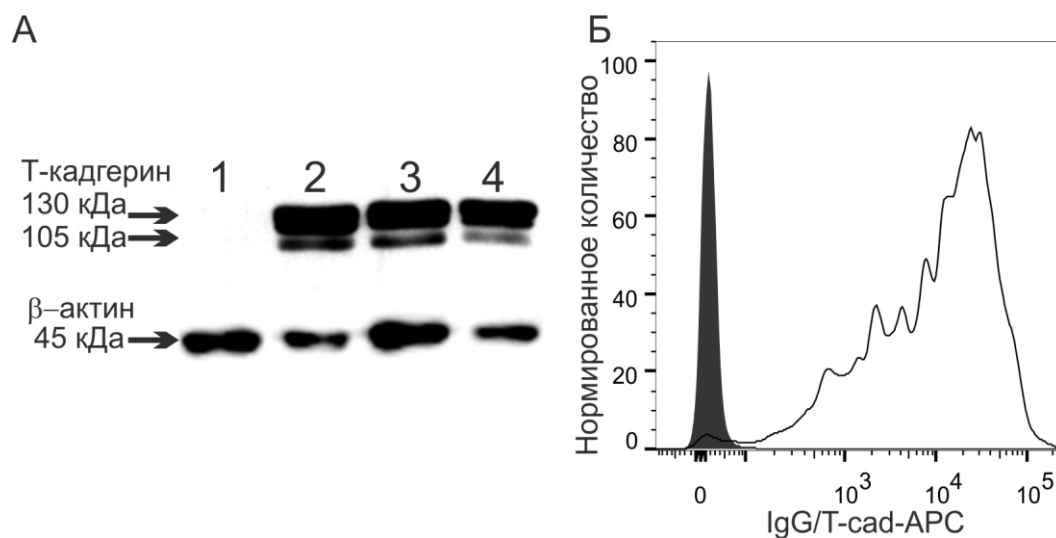


Рисунок 4. Содержание Т-кадгерина в клетках линии HEK293. А. Анализ содержания Т-кадгерина с помощью иммуноблоттинга: дорожка 1 – немодифицированные клетки; дорожки 2-4 – клоны клеток, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин. Б. Анализ экспрессии Т-кадгерина на поверхности клеток одного из клонов с помощью проточной цитометрии: закрашенная гистограмма – флуоресцентно меченный изотипический контроль, незакрашенная – флуоресцентно меченые антитела против Т-кадгерина.

В клетках, экспрессирующих Т-кадгерин, ЛНП-индуцируемый $[Ca^{2+}]_{in}$ ответ в два раза больше по амплитуде по сравнению с контролем (рис. 5). В контрольных клетках амплитуда $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа при добавлении ЛНП и ЛНП+Адипо достоверно не отличается, однако в Т-кадгерин положительных клетках Адипо снижает ЛНП-индуцируемый $[Ca^{2+}]_{in}$ ответ до уровня контрольных клеток. Эти данные говорят о том, что адипонектин ингибирует именно Т-кадгерин зависимую сигнализацию. Вероятно, Т-кадгерин независимая сигнализация связана с электростатическим взаимодействием поликатиона ЛНП с мембраной, которое также может запускать фосфоинозитидный обмен, но с иной кинетикой и профилем фосфатов (Бочков 2005).

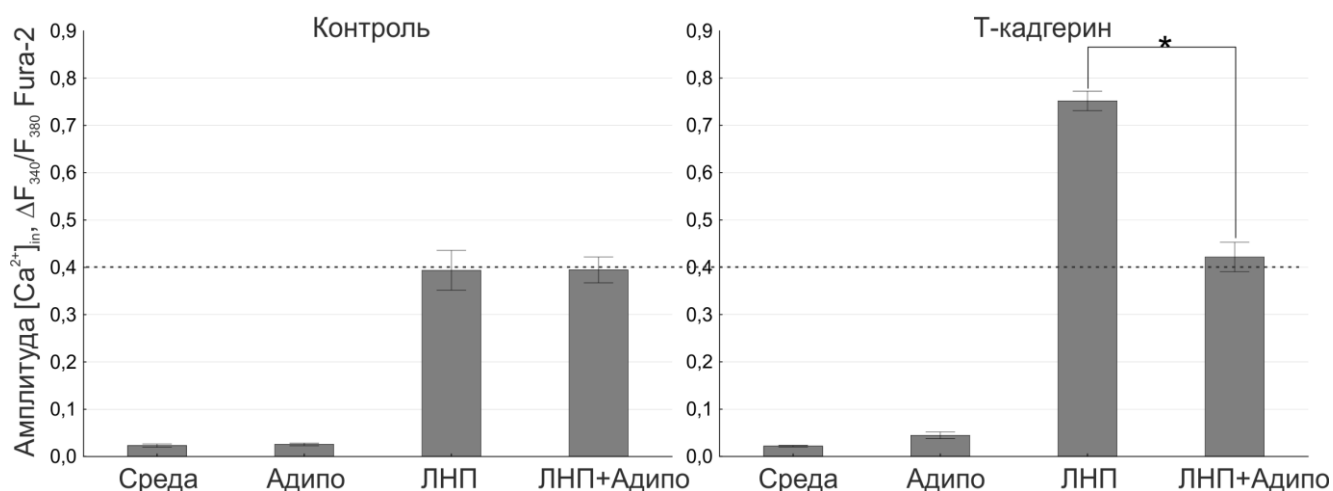


Рисунок 5. Сравнение амплитуд $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа клеток на действие лигандов с помощью флуоресцентной микроскопии. Контроль - клетки HEK293 без Т-кадгерина (слева). Т-кадгерин - клетки HEK293, гиперэкспрессирующие этот белок (справа). Амплитуды $[Ca^{2+}]_{in}$ анализировали после добавления среды культивирования (Среда), Адипо 10 мкг/мл, ЛНП 25 мкг/мл или их сочетания. Данные приведены в виде среднего \pm стандартная ошибка. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом, особо отмечено * $p < 0,001$.

Таким образом, два лиганда Т-кадгерина приводят к противоположным клеточным ответам, однако причина этих отличий не ясна. Мы предположили, что в основе наблюдаемых отличий может быть различное влияние двух лигандов на димерное состояние Т-кадгерина. Изучать димеризацию рецепторов в нативных условиях т.е. на мембране живых клеток сегодня позволяют только методы флуоресцентной микроскопии. Среди этих методов наиболее надежными и распространенными являются методы на основе регистрации FRET (*Förster 1948*). Они, в свою очередь, требуют оптимизации способов флуоресцентного мечения рецепторов и регистрации сигнала FRET.

3. Создание метода флуоресцентного мечения Т-кадгерина, не нарушающего его физиологическую активность. Для регистрации FRET мы выбрали доступный нам подход с использованием различных молекул донора и акцептора FRET. Для этого мы создали были созданы две химерные конструкции Т-кадгерина с флуоресцентными белками (FP), которые образуют FRET пару: донор (mTFP1, далее TFP) и акцептор (tagYFP, далее

YFP). Учитывая ряд структурных особенностей T-кадгерина, место вставки FP было выбрано между пятым доменом кадгерина (рис. 6 А, EC5) и C-концевой последовательностью, которая впоследствии заменяется на ГФИ-якорь (Балацкая и др., 2014). Вопреки ожиданиям, две химерные конструкции T-кадгерина, которые различались лишь последовательностями FP, по-разному локализовались в клетке и имели различную молекулярную массу (рис. 6, Б, В). Нативный T-кадгерин имеет массу 130 кДа (PP-EC1-EC5) и 105 кДа (EC1-EC5) (Stambolsky et al., 1999) и локализуется на плазматической мембране и везикулах внутри клетки (рис. 6, В). Химерный белок T-cad-TFP отличается по массе от нативного на массу FP и также обнаруживается в клетке в виде двух форм PP-EC1-EC5-FP и EC1-EC5-FP, локализуясь на мембране и в везикулах (рис. 6, Б, В). Однако белок T-cad-YFP на иммуноблоте детектируется в виде одной полосы, а в клетке обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме (данные по солокализации с ретикулумом и связыванию с ЛНП приведены в диссертации) (рис. 6, Б, В).

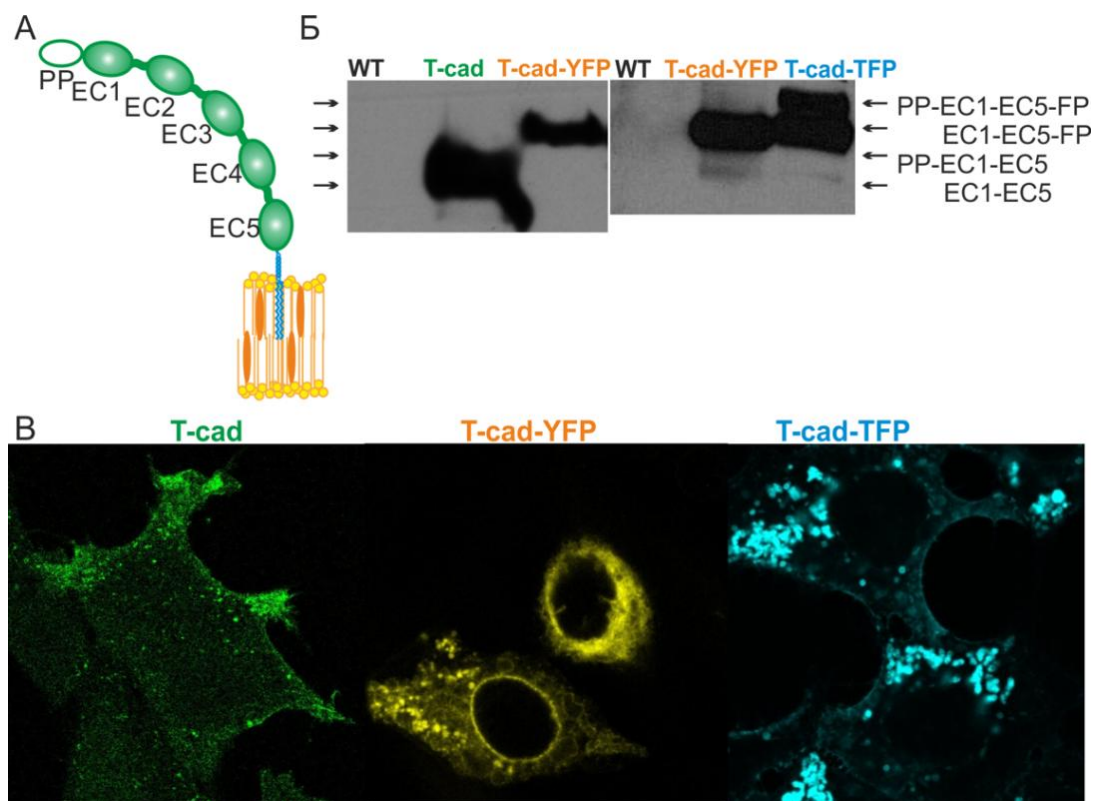


Рисунок 6. Экспрессия нативного Т-кадгерина и его флуоресцентных химер. А. Схема структурной организации Т-кадгерина: PP – продомен, EC1-EC5 – кадгериновые домены. Б. Содержание Т-кадгерина в клетках HEK293, оцененное с помощью иммуноблоттинга: T-cad – клетки, экспрессирующие нативный Т-кадгерин; T-cad-YFP и T-cad-TFP – клетки, экспрессирующие химерные белки. В. Содержание Т-кадгерина в клетках HEK293, оцененное с помощью конфокальной микроскопии. Химерный белок T-cad-YFP – жёлтая флуоресценция; T-cad-TFP – голубая флуоресценция; нативный Т-кадгерин окрашен антителами – зеленая флуоресценция.

Вероятно, T-cad-YFP некорректно сворачивается и, в основном, не выходит на мембрану. Для проверки предположения о мисфолдинге химерного белка были построены трёхмерные модели T-cad-YFP, T-cad-TFP и нативного белка Т-кадгерина на основе их первичной последовательности, поиска гомологичных последовательностей и распознавания укладки (*Kelley et al., 2015*). Структура T-cad-YFP отличалась от Т-кадгерина и T-cad-TFP (рис. 7). Вставка RFP между EC4 и EC5 доменами Т-кадгерина другими исследователями привела к схожим результатам (*Tyrberg et al., 2011*), следовательно, природа FP значительно влияла на сворачивание и созревание Т-кадгерина.

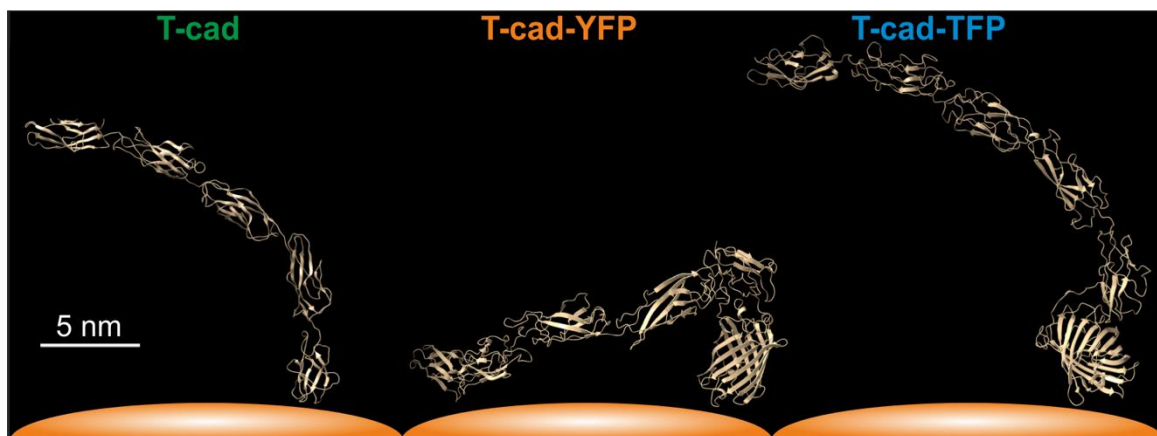


Рисунок 7. Сравнение конформаций EC1-EC5 доменов нативного Т-кадгерина (T-cad) и химерных белков T-cad-YFP и T-cad-TFP, построенных на основе моделирования сервисом Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) и визуализированных посредством Chimera (Pettersen *et al.*, 2004), снизу оранжевым цветом изображена мембрана.

В связи с этим, был избран принципиально другой подход к этой задаче: вставка короткого тега (S6-пептида) с последующим ферментативным ковалентным присоединением флуоресцентно меченого субстрата (Zhou *et al.*, 2007). Преимуществами такого подхода являются: 1) возможность мечения двумя разными красителями (в нашем случае донор DY-547 и акцептор DY-647P1); 2) маленькая генетически кодируемая метка (12 аминокислотных остатков против 240 у FP) не внесла заметных изменений в структуру белка Т-кадгерина (рис. 8, А); 3) флуоресцентное мечение только белков, находящихся на мембране, так как краситель не проникает через мембрану, что позволяет избавиться от засветки из цитоплазмы, которая присуща эндогенным FP(рис. 8, Б); 4) возможность получения контрольных клеток (только краситель-донор или акцептор) с использованием тех же клеток, что в опыте; 5) простота изменения соотношения донор:акцептор путем изменения концентрацией флуоресцентных субстратов в реакции мечения (экспрессию FP контролировать достаточно тяжело); 6) для используемых флуоресцентных меток не обнаружено собственной димеризации в отличие от многих FP.

Анализ образцов методом иммуноблотинга показал, что меченный таким образом белок обладает молекулярной массой схожей с нативным Т-

кадгерином и имеет обе формы 105 и 130 кДа. Амплитуда Ca^{2+} -ответа на ЛНП в клетках с T-cad-S6 также достоверно не отличалась от таковой у клеток с нативным T-кадгерином. При этом антитела против T-кадгерина узнавали T-cad-S6, а ферментативное мечение было селективно (данные приведены в диссертации).

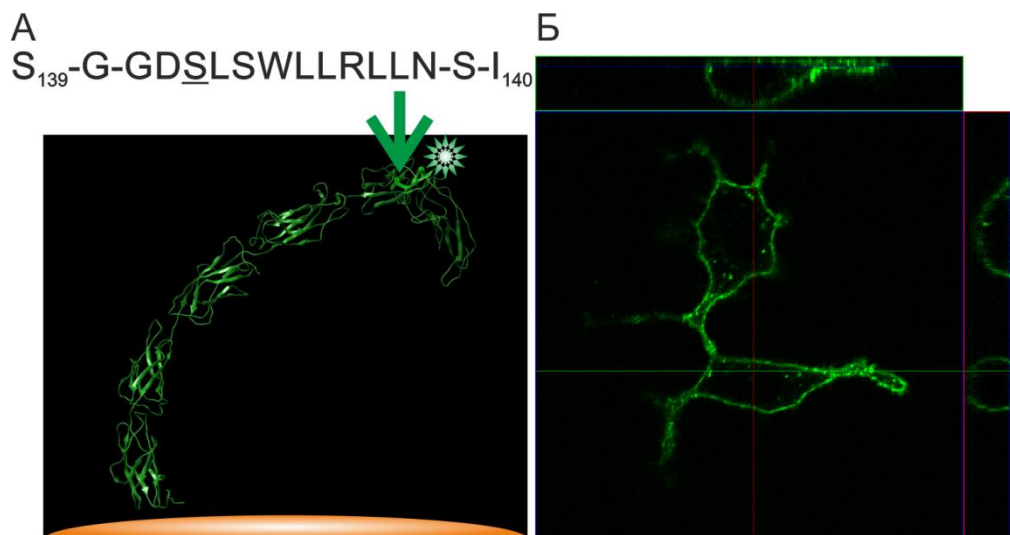


Рисунок 8. Новый подход к внесению флуоресцентной метки в последовательность T-кадгерина позволяет сохранять структуру белка и его мембранную локализацию. А. Трёхмерная модель T-кадгерина со вставкой S6-пептида (сверху представлена его последовательность; место вставки между EC1 доменом и пропептидом обозначено стрелкой; флуоресцентная метка, которая присоединяется к серину(выделен нижним подчёркиванием), изображена в виде зелёной звезды). Б. Мембранная локализация химеры T-кадгерина с флуоресцентно меченным S6 пептидом на поверхности двух живых клеток HEK293. Сверху и справа представлены ортогональные проекции 3-х мерного конфокального изображения в плоскостях, отмеченных зеленой и красной линиями, соответственно.

4. Измерение FRET между молекулами T-кадгерина на мембране живых клеток. В результате инкубации клеток с T-cad-S6 в присутствии эквимольных количеств CoA547 (субстрат с донорным красителем DY-547) и CoA647 (субстрат с акцепторным красителем DY-647P1), а также фермента, который специфично ковалентно присоединяет одну молекулу красителя на серин одного S6-пептида, были получены клетки, на поверхности которых молекулы T-кадгерина помечены случайным образом одним из двух красителей с равной вероятностью. Эффективность FRET зависит от расстояния между донором и акцептором r и от Фёрстеровского

радиуса этой пары R_0 (Lakowicz 1999), который определяется величинами κ – ориентационного фактора, n – показателем преломления, ϕ_d – квантовым выходом флуоресценции донора, J – интегралом перекрытия спектра эмиссии донора $F_D(\lambda)$ (площадь которого нормирована на 1) и спектра поглощения акцептора ϵ_A :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}; \quad R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\phi_D}{128N_A\pi^5n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda, \text{ где } N_A - \text{число Авогадро.}$$

Дипольные моменты донора DY-547 и акцептора DY-647P1, благодаря их малой массе и гибкому линкеру, могут принимать произвольные ориентации, в отличие от тяжёлых FP (Vogel et al., 2012), поэтому $\kappa^2=2/3$. Показатель преломления среды, в которой находились клетки, согласно нашим измерениям, был равен 1,335. Квантовый выход донора DY-547 в виде свободной кислоты в растворе составлял 0,1 по данным производителя. Коэффициент экстинкции акцептора DY-647P1 в максимуме с 250000 М⁻¹см⁻¹. Интеграл перекрытия спектров донора и акцептора по нашим расчётам составил $3,81 \cdot 10^{-13}$ см⁶/моль, а R_0 – 4,4 нм.

Экспериментально эффективность FRET была измерена методом обесцвечивания акцептора при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Из зарегистрированной флуоресценции в канале донора в начальный момент времени и возросшей флуоресценции донора после обесцвечивания акцептора было вычислено, что на поверхности живых клеток в среде без лигандов эффективность FRET составила в среднем $11,8 \pm 1,8\%$, а в присутствии сыворотки (в которой есть оба лиганда Т-кадгерина) $24,2 \pm 0,2\%$. Метод обесцвечивания акцептора позволяет быстро оценить эффективность FRET, однако не позволяет измерить кинетику образования димеров при добавлении лиганда.

Для кинетических измерений FRET мы использовали метод стимулированной эмиссии акцептора. После измерения флуоресценции в трёх каналах – донора (возбуждение 561 нм, эмиссия 570-613 нм), FRET (возбуждение 561 нм, эмиссия 665-691 нм) и акцептора (возбуждение 633 нм, эмиссия 665-691 нм) в контрольных образцах только с донором или

акцептором были рассчитаны коэффициенты засветки красителей в канал FRET, что позволило рассчитать показатель FRET микроскопических изображений опытных образцов с донором и акцептором по формуле, предложенной в работе (Xia and Liu 2001). Добавление лигандов, ЛНП и Адипо, увеличило показатель FRET, однако кинетика образования димеров Т-кадгерина разительно отличалась: ЛНП (25 мкг/мл) стимулировали образование димеров, которые за время наблюдения распадались по экспоненте с характерным временем 12,1 с, в то время как Адипо (10 мкг/мл) стимулировал образование димеров с характерным временем 34,8 с (рис. 9, верхняя панель).

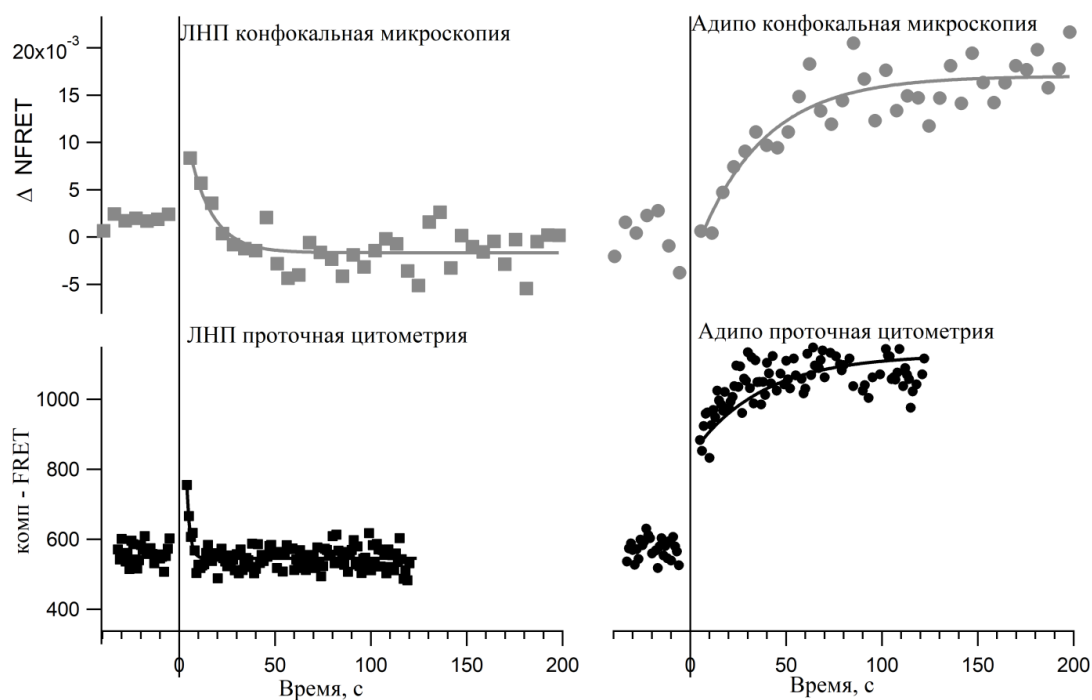


Рисунок 9. Кинетика изменения расстояния Т-кадгерин-Т-кадгерин на мембране живых клеток при добавлении ЛНП и Адипо в момент времени 0. Верхний ряд: изменение показателя FRET по сравнению с базовой линией (конфокальная—лазерная сканирующая микроскопия). Каждая точка соответствует усреднённому значению NFRET одного микроскопического изображения. Нижний ряд: изменение компенсированного сигнала FRET (проточная цитометрия). Каждая точка соответствует медиане интенсивности флуоресценции в канале 670/30 нм при возбуждении 561 нм с поверхности живых клеток, выбранных на основе прямого и бокового светорассеяния. Сплошные линии на графиках – модельные экспоненциальные зависимости вида $y_0 + A \cdot \exp(x \cdot \text{invTau})$, описывающие экспериментальные данные.

Кинетика лигандозависимого образования кластеров Т-кадгерин-Т-кадгерин была измерена также методом проточной цитометрии, который позволял детектировать интегральный сигнал с поверхности отдельной клетки с миллисекундным разрешением. Характер кинетики FRET повторился: при добавлении ЛНП образовывались короткоживущие димеры с характерным временем экспоненциального спада 1,7 с, при добавлении Адипо наблюдалось медленное образование димеров с характерным временем экспоненциального роста 36,4 с (рис. 9, нижняя панель). Совместное добавление ЛНП и Адипо приводило к такому же значению FRET, как и при добавлении Адипо (данные приведены в диссертации).

5. Возможный молекулярный механизм взаимодействия Т-кадгерина с ЛНП и адипонектином. Таким образом, Т-кадгерин образует димеры при взаимодействии со своим низкоафинным лигандом ЛНП (100 нМ = 50 мкг/мл (*Tkachuk et al., 1994*)), так и высокоафинным Адипо (1-6 нМ = 0,17-2 мкг/мл (*Hug et al., 2004; Fukuda et al., 2017*)). Однако ЛНП за секунды запускает IP_3 - Ca^{2+} сигнализацию, а Адипо её не запускает (рис. 3, рис. 5, рис.10 Б, В). Мы предполагаем, что обнаруженная нами разница связана с тем, что комплекс ЛНП с димером Т-кадгерина запускает внутриклеточную сигнализацию через короткоживущие рафты, тогда как комплекс с Адипо с димером Т-кадгерина оказывается в более долгоживущих, но ингибирующей сигнализацию рафтах, кавеолах (рис. 10).

ЛНП-индуцируемый сигнальный каскад Т-кадгерина напоминает каскад CD59: димеры ГФИ-заякоренного белка стабилизируют рафт, в который рекрутируются Gai и киназы из семейства Src; их ассоциация приводит к активации киназы и фосфолипазы C (PLC), в результате которой образуется IP_3 , который, в свою очередь, открывает Ca^{2+} -каналы эндоплазматического ретикулума (рис. 10, Б). Участие этих белков в ЛНП-индуцируемой сигнализации доказано ингибиторным анализом (*Buhler et al., 1991; Resink et al., 1993; Kipmen-Korgun et al., 2005; Ткачук В.А. 2005*). Такие короткоживущие малые рафты (единичные рафты < 50 нм существуют < 10

с) имеют плоскую форму и стабилизируются за счёт димеров ГФИ-заякоренных белков (Рис.10, планарный рафт) (Suzuki et al., 2012).

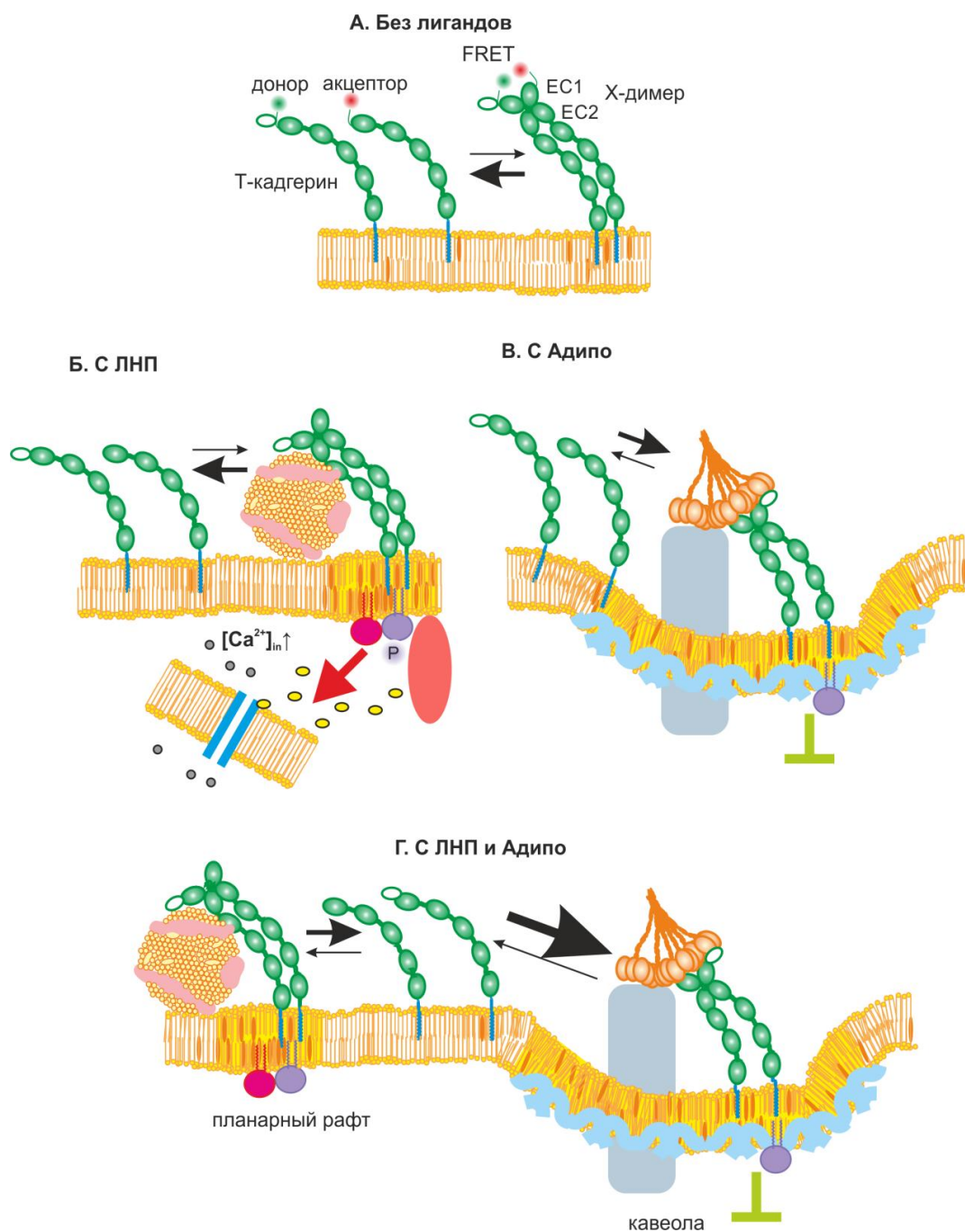


Рисунок 10. Модель, описывающая распределение Т-кадгерина на поверхности мембраны до и после стимуляции физиологическими лигандами. А. В отсутствии лигандов Т-кадгерин локализован в неупорядоченных участках мембраны. Б. При взаимодействии с ЛНП Т-кадгерин перераспределяется в или формирует в своем основании плоский рафт, который служит платформой для запуска сигнализации через $G_{\alpha i}$, SFK, PLC, IP_3 кальциевые каналы. В. При взаимодействии с Адипо Т-кадгерин перераспределяется в кавеолы, в которых активность SFK подавлена кавеוליном, и $[Ca^{2+}]_{in}$ сигнализация не запускается. В кавеолах также присутствует другой рецептор адипонектина AdipoR1. Г. В присутствии ЛНП и Адипо за счет большей аффинности Адипо преобладает локализация Т-кадгерина в кавеолах.

Лиганд-рецепторный комплекс Адипо-Т-кадгерин, вероятно, имеет большую аффинность к долгоживущему рафту, кавеоле, который стабилизируется за счёт олигомеров белков кавеолинов на внутренней поверхности мембраны (единичные кавеолы 60-80 нм существуют минуты). Обычно взаимодействие с кавеолином ингибирует активность сигнальных молекул (*Fielding 2006*). Ранее было показано, что Т-кадгерин и адипонектин действительно обнаруживаются во фракциях мембран с кавеолином (*Philippova et al., 1998; Wang et al., 2012; Liu et al., 2015*). Кавеолы могут не только сдерживать патогенную сигнализацию, но и сохранять целостность мембраны при сжатиях и растяжениях (механическом стрессе) за счёт их образования, отшнуровывания, слияния и распрямления (*Cheng and Nichols 2016*).

В норме в крови концентрация высокоафинного лиганда Адипо больше (12,5 мкМ = 4,5 мг/л), чем низкоафинного ЛНП (1,56 мкМ = 0,8 г/л), что приводит к тому, что почти весь Т-кадгерин связан с Адипо. Однако при ожирении концентрация ЛНП растёт, а Адипо падает, что должно приводить к росту комплексов ЛНП-Т-кадгерин, $[Ca^{2+}]_{in}$ сигнализации и патологической пролиферации ГМК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предпринята попытка объяснить необычный феномен: наличия противоположных физиологических эффектов двух естественных лигандов одного рецептора. В настоящей работе было впервые показано образование димеров ГФИ-заякоренного рецептора Т-кадгерина под действием лигандов: липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина. Для этого разработаны оригинальные методы мечения белка и измерения FRET на мембране живых клеток, как при помощи микроскопии, так и при помощи проточной цитометрии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что липопротеиды низкой плотности вызывают быстрое образование

короткоживущих димеров Т-кадгерина, а высокомолекулярная форма адипонектина – образование стабильных комплексов. Комплекс Т-кадгерин-адипонектин не запускает $[Ca^{2+}]_{in}$ ответ и ингибирует кальциевую сигнализацию, вызванную липопротеидами низкой плотности, что может быть связано с перераспределением Т-кадгерина из планарных рафтов в кавеолы. По-видимому, при физиологических условиях почти весь Т-кадгерин на мембране оказывается в комплексе с адипонектином, а при патологических состояниях образуются комплексы Т-кадгерина с липопротеидами низкой плотности, запускающие внутриклеточную сигнализацию.

ВЫВОДЫ

1. Липопротеиды низкой плотности, связываясь с Т-кадгерином, вызывают быстрое обратимое увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$. Высокомолекулярная форма адипонектина, которая тоже связывается с Т-кадгерином, не стимулирует $[Ca^{2+}]_{in}$ сигнализацию, но конкурентно подавляет эффекты липопротеидов низкой плотности.

2. Разработан новый метод флуоресцентного мечения Т-кадгерина с помощью включения в его состав пептида S6 и последующего специфического конъюгирования флуоресцентного зонда, которое не нарушает локализацию белка на плазматической мембране и его физиологическую активность.

3. Разработан оригинальный метод для измерения и анализа FRET на мембране живых клеток, позволяющий детектировать димеризацию ГФИ-заякоренных рецепторов.

4. С помощью разработанных подходов показано, что связывание липопротеидов низкой плотности с Т-кадгерином приводит к формированию короткоживущих димеров с характерным временем жизни на мембране менее 12 с, тогда как при взаимодействии высокомолекулярной формы адипонектина с Т-кадгерином образуются стабильные димеры.

5. Предложена модель, объясняющая отличия в активности липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина их конкурентным взаимодействием с Т-кадгерином и формированием димеров Т-кадгерина с разным временем жизни и локализацией в разных типах липидных рафтов.

**НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ,
ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI:**

1. **Balatskaya M. N.**, Balatskii A. V., Sharonov G. V., Tkachuk V. A. T-cadherin as a novel receptor regulating metabolism in the blood vessel and heart cells: from structure to function // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 2016. V. 52 № 2. P. 103-118.
2. Sharonov G. V., **Balatskaya M. N.**, Tkachuk V. A. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins as Regulators of Cortical Cytoskeleton // Biochemistry (Mosc.). 2016. V. 81 № 6. P. 636-650.
3. Sveshnikova A. N., Balatskiy A. V., Demianova A. S., Shepelyuk T. O., Shakhidzhanov S. S., **Balatskaya M. N.**, Pichugin A. V., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling// J. Thromb. Haemost. 2016. V. 14 № 10. P. 2045-2057.
4. **Балацкая М. Н.**, Шаронов Г. В., Мамедов Н. Н., Рубцов Ю. П. Флуоресцентные методы для детекции и изучения низкоафинного связывания липопротеидов низкой плотности на живых клетках // Технологии живых систем. 2014. Т. 12 № 1. стр. 56-63.

**ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ:**

5. **Balatskaya M.**, Sharonov G., Baglay A., Balatskiy A., Tkachuk V. One receptor, two ligands, different responses: T-cadherin as a receptor for low density lipoprotein and adiponectin // The FEBS Journal. 2017. V. 284. P. 153.

6. **Balatskaya M. N.** , G. V. Sharonov, A. I. Baglay, V. A. Tkachuk. Covalent labeling of cell-surface glycosylphosphatidylinositol-anchored receptors for study of dimerization and oligomerization in living cells by FRET/ // Тезисы постерных докладов 2-я Школа ADFLIM. — Университетский центр СПбГУ, 2017. — P. 1–2.
7. **Балацкая М. Н.**, Баглай А. И., Шаронов Г. В., Ткачук В. А. Механизм сигнализации гликозилфосфатидилинозитид-заякоренного рецептора Т-кадгерина при связывании с липопротеидами низкой плотности // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. – Т. 1 –Fix-print, Пущино, 2017. – С. 117-122.
8. **Балацкая М. Н.**, Баглай А. И., Мамедов Н. Н., Ткачук В. А. Способ получения высокоочищенных молекулярных комплексов для изучения межмолекулярных взаимодействий при помощи кросс-линкеров // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. – Т. 1 –Fix-print, Пущино, 2017. – С. 404-409.
9. **Балацкая М. Н.**, Шаронов Г. В., Ткачук В. А. Различное действие двух лигандов одного рецептора: адипонектин и липопротеиды как лиганды ГФИ-заякоренного рецептора Т-кадгерина // XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" –, 2017. – С. 9.
10. Баглай А. И., **Балацкая М. Н.**, Ткачук В. А. N-гликозилирование Т-кадгерина влияет на внутриклеточную сигнализацию липопротеидов низкой плотности // XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" –, 2017. – С. 93.
11. **Balatskaya M.**, Sharonov G., Tkachuk V. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein T-cadherin on human platelet-derived extracellular vesicles. Abstracts of the UK-Russia Researcher Links Workshop: Extracellular vesicles - mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis // Journal of extracellular vesicles. 2015. V. 4. P. 28165.

12. Sharonov G. V., **Balatskaya M. N.**, Rubtsov Y. P., Stambolskiy D. V., Tkachuk V. A. Receptor clustering: implication for microvesicles biogenesis and signalling // Abstracts of the UK-Russia Researcher Links Workshop: Extracellular vesicles – mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis. – Т. 28165 –Journal of Extracellular Vesicles, 2015. –28165
13. **Balatskaya M. N.**, Sharonov G. V., Rubtsov Y. P., Tkachuk V. A. Adiponectin promotes the formation of microparticles in vitro // EMBO, EMBL, Symposium: Seeing is Believig – Imaging the Processes of Life –Mera-Druck GmbH Sandhausen, Germany, 2013. – С. 88-88.
14. Sharonov G. V., **Mozgovaja (Balatskaya) M. N.**, Astapova M. V., Kolosov P. M., Arseniev A. S., Feofanov A. V. Study of EphA2 dimerization and clusterization in living cells using sensitized acceptor emission in FRET pair // Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology / Méndez-Vilas A.FORMATEX, 2012.

ССЫЛКИ НА ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ СОИСКАТЕЛЯ ПРИВЕДЕНЫ В БАЗАХ ДАННЫХ:

Web of Science <http://www.researcherid.com/rid/A-8192-2014>

Scopus <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=35424319200>

RSCI https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=725631

ИСТИНА <http://istina.msu.ru/profile/Balatskaya/> (IstinaResearcherID : 1072048)

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (12-04-3226612, руководитель Балацкая М.Н.), Министерства образования и науки РФ (14.132.21.1307, руководитель Балацкая М.Н.), РФФИ (14-24-00086, руководитель Ткачук В.А.).