

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Ткачук Всеволод Арсеньевич
доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Шаронов Георгий Владимирович
кандидат физико-математических наук

Москва, 2018

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Структурные особенности Т-кадгерина, уникального представителя суперсемейства кадгеринов.....	11
1.2. Экспрессия Т-кадгерина в организме	17
1.3. Т-кадгерин как рецептор липопротеидов низкой плотности: связывание, IP_3 - Ca^{2+} сигнализация, пролиферация и миграция клеток сосудов.	19
1.4. Т-кадгерин как рецептор высокомолекулярной формы адипонектина: связывание, возможная внутриклеточная сигнализация и защитное действие на сердечно-сосудистую систему	22
1.5. Роль димеризации мембранных рецепторов в передаче сигнала	27
1.6. ГФИ-заякоренные белки, мембранные микродомены и методы их изучения	28
1.7. FRET как метод детекции белок-белковых взаимодействий ГФИ-заякоренных белков	33
1.8. Механизмы передачи сигнала ГФИ-заякоренными рецепторами	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Культивирование эукариотических клеток	39
2.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле и иммуноблотинг	39
2.3. Выделение липопротеидов низкой плотности, определение их чистоты и степени окисленности, введение в них флуоресцентной метки	40
2.4. Создание плазмидных конструкций с химерами Т-кадгерина.....	43
2.5. Трансфекция эукариотических клеток и селекция клонов	46
2.6. Иммунофлуоресцентное окрашивание гладкомышечных клеток	46
2.7. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия	47
2.8. Измерение внутриклеточного кальция в одиночных клетках	48
2.9. Проточная цитометрия	51

2.10. Измерение связывания флуоресцентно-меченных ЛНП с Т-кадгерином на живых клетках при помощи проточной цитометрии	51
2.11. Введение флуоресцентной метки в Т-кадгерине на поверхности мембраны	52
2.12. Измерения FRET при помощи конфокальной микроскопии.....	53
2.13. Кинетические исследования FRET при помощи проточной цитометрии	57
2.14. Построение модельных кривых.....	59
2.15. Построение трёхмерных моделей структуры белков.....	59
2.16. Статистическая обработка результатов	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
3.1. Действие ЛНП и адипонектина на $[Ca^{2+}]_{in}$ в гладкомышечных клетках человека.....	60
3.2. Т-кадгерин необходим для ингибирования ЛНП-индуцируемого $[Ca^{2+}]_{in}$ -ответа адипонектином.	62
3.3. Создание метода флуоресцентного мечения Т-кадгерина, не нарушающего его физиологическую активность.	64
3.4. Измерение FRET между молекулами Т-кадгерина на мембране живых клеток.....	70
3.5. Возможный молекулярный механизм взаимодействия Т-кадгерина с ЛНП и адипонектином.	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ВЫВОДЫ.....	81
БЛАГОДАРНОСТИ	82
СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	87

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AdipoR1, AdipoR2 — рецепторы адипонектина 1 и 2 типа

AMPK — АМФ-зависимая активируемая протеинкиназа (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase)

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

DPBS — фосфатно-солевой буфер, модифицированный Дульбекко (Dulbecco's phosphate-buffered saline)

DRM — мембраны, нерастворимые в неионных детергентах (detergent resistant membrane)

Erk1/2 — киназы, регулируемые внеклеточным сигналом (extracellular signal-regulated kinases)

FITC — изотиоцианат флуоресцеина (fluorescein isothiocyanate)

FP — флуоресцентный белок (fluorescent protein)

FRET — Фёрстеровский (флуоресцентный) резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer)

GPCR — рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками (G-protein coupled receptors)

G-белок — гуанин-нуклеотид-связывающий белок (guanine nucleotide binding protein)

HEK293 — эмбриональные клетки почек человека (Human Embryonic Kidney 293)

IP₃ — инозитол-1,4,5-трисфосфат

LB — лизогенная среда (lysogeny broth)

LDLR — рецептор липопротеидов низкой плотности (low density lipoprotein receptor)

NFκB — ядерный фактор κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

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

RTK — рецепторные тирозиновые киназы (receptor tyrosine kinases)

SDS — додецилсульфат натрия (sodium dodecylsulfate)
SFK — киназы Src-семейства (Src family kinase)
T-cad-S6 — химерный белок Т-кадгерина с S6-пептидом
T-cad-TFP — химерный белок Т-кадгерина с TFP
T-cad-YFP — химерный белок Т-кадгерина с YFP
TFP —сине-зелёный флуоресцентный белок (teal fluorescent protein)
TNF — фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor)
uPAR — рецептор урокиназы (urokinase-type plasminogen activator receptor)
YFP — жёлтый флуоресцентный белок (yellow fluorescent protein)
Адипо — высокомолекулярная форма адипонектина
БСА — бычий сывороточный альбумин
ГДФ — гуанозиндифосфат
ГМК — гладкомышечные клетки
ГТФ— гуанозинтрифосфат
ГФИ — гликозилфосфатидилинозитол
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК – ДНК, комплементарная РНК
ЛВП — липопротеиды высокой плотности
ЛНП — липопротеиды низкой плотности
ЛОНП — липопротеиды очень низкой плотности
ПААГ — полиакриламидный гель
ЭГТА — этиленгликоль тетрауксусной кислоты
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР — эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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 [1], так и за счёт запуска внутриклеточной сигнализации [2]. ЛНП в гладкомышечных (ГМК), эндотелиальных клетках и фибробластах запускают 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 [2-12]. Доказано, что сигнальные эффекты запускаются не через переносчик ЛНП апоВ/Е рецептор (рецептор ЛНП, LDLR), а через Т-кадгерин [10, 12, 13].

У Т-кадгерина есть внеклеточные кадгериновые домены (extracellular cadherin, EC1-EC5), гомологичные классическим кадгеринам, но отсутствует трансмембранный и внутриклеточный домены. На мембране он заякорен при помощи гликозилфосфатидилинозитного (ГФИ) остатка [14]. Классические кадгерины 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) [15]. Т-кадгерин отличается тем, что его EC1 стабилен в мономерной форме (не образует EC1-EC1), а EC1-EC2 фрагменты образуют Х-димер, который для классических кадгеринов является лишь переходной формой при образовании структурно иного димера [16]. При гиперэкспрессии Т-кадгерина *in vitro* он также может обеспечивать адгезию клеток, которая подавляется в присутствии ЛНП [17] за счет образования более стабильного комплекса Т-кадгерина с ЛНП ($K_{D \text{ dimer}} = 41 \text{ мкМ}$ [16], $K_{D \text{ LDL}} = 0,1 \text{ мкМ}$ [18]). При этом неизвестно, как при отсутствии внутриклеточного домена Т-

кадгерин запускает внутриклеточную сигнализацию при взаимодействии с ЛНП, и какую роль в этом играет ГФИ-якорь. Показано, что димеризация некоторых ГФИ-заякоренных рецепторов при связывании с лигандом является ключевым этапом передачи ими сигнала [19].

В 2004 году было обнаружено, что у Т-кадгерина есть другой лиганд – высокомолекулярная форма адипонектина (Адипо), гормона жировой ткани, – который, в отличие от ЛНП, оказывает протективные эффекты на сердечно-сосудистую систему [20]. Концентрация в крови именно этой формы значительно падает при ожирении и при сердечно-сосудистых заболеваниях [21-23]. Т-кадгерин связывается с Адипо на поверхности клеток сердца, аорты и скелетных мышц. В отсутствии Т-кадгерина Адипо не связывается с этими тканями, что приводит к возрастанию концентрации гормона в крови в 5 раз [24-26]. На нокаутных мышцах было показано, что взаимодействие Т-кадгерина с Адипо необходимо для реализации защитных механизмов на моделях различных сердечно-сосудистых патологий [24, 25, 27].

Экспрессия Т-кадгерина высока в клетках сердечно-сосудистой системы [28]. ЛНП и Адипо могут взаимодействовать с Т-кадгерином на одних и тех же клетках сосудов, так как в крови одновременно присутствуют и ЛНП, и Адипо. Однако причина различий физиологических действий ЛНП и Адипо через Т-кадгерин не известна. В частности, не ясно, как эти лиганды влияют на димеризацию Т-кадгерина и как возможное изменение димерного состояния связано с внутриклеточной сигнализацией, что и было предметом исследования настоящей работы. В связи с этим, изучение молекулярных механизмов лиганд-рецепторного взаимодействия Т-кадгерина представляется чрезвычайно актуальным. Во-первых, это позволит лучше понять фундаментальные механизмы передачи сигнала ГФИ-заякоренными рецепторами, а во-вторых, прояснит возможные способы использования Т-кадгерина в качестве фармакологической мишени.

Цель исследования:

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

Задачи исследования:

1. Исследовать роль Т-кадгерина в запуске внутриклеточной кальциевой сигнализации при действии липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина.
2. Разработать метод флуоресцентного мечения Т-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 Т-кадгерина.
4. С помощью разработанного метода изучить влияние липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина на димеризацию Т-кадгерина, а также временные характеристики этого процесса.

Научная новизна и практическая значимость работы:

Впервые проведено исследование совместного влияния физиологически активных молекул липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина. Обнаружено подавление адипонектином индуцируемой липопротеидами $[Ca^{2+}]$ сигнализации, которое может лежать в основе известного феномена защиты сосудов и сердца (в тканях, в которых локализован Т-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 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-кадгерином, что может представлять интерес при разработке новых лекарственных препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Метод флуоресцентного мечения Т-кадгерина с использованием клонирования короткого пептидного тэга (12 аминокислотных остатков) в последовательность белка после продомена и последующей ферментативной реакции с флуоресцентным субстратом позволяет сохранить активность и локализацию Т-кадгерина в клетке, а также измерять гомодимеризацию Т-кадгерина на мембране живых клеток.
2. Липопротеиды низкой плотности стимулируют образование короткоживущего (менее 12 с) димера Т-кадгерина и при этом запускают внутриклеточную кальциевую сигнализацию.

3. Высокомолекулярная форма адипонектина стимулирует образование стабильного димера Т-кадгерина и при этом не запускает внутриклеточную кальциевую сигнализацию.

4. Высокомолекулярная форма адипонектина в физиологических концентрациях ингибирует внутриклеточную кальциевую сигнализацию, вызванную липопротеидами низкой плотности.

Степень достоверности результатов исследований, проведенных соискателем. Задачи работы сформулированы исходя из тщательного и критического анализа работ российских и зарубежных авторов по теме диссертации. Для решения поставленных задач использованы традиционные хорошо зарекомендовавшие себя методы, а также разработаны новые, необходимость и информативность которых обоснована и доказана. Набор использованных методов является оптимальным для решения поставленных задач. Достоверность полученных результатов подтверждена статистическим анализом. Выводы диссертации обоснованы, вытекают из полученных результатов и содержат решения поставленных задач.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурные особенности Т-кадгерина, уникального представителя суперсемейства кадгеринов

Т-кадгерин (от слова «truncated»), известный также как Н-кадгерин (от слова «heart» или кадгерин-13, относят к представителям суперсемейства кадгеринов, отличительной чертой которых является наличие внеклеточных кадгериновых (extracellular cadherin, EC) доменов (рис. 1.1). Однако целый ряд принципиальных структурных отличий от классических кадгеринов позволяет ему выполнять функции, отличные от межклеточной адгезии [29].

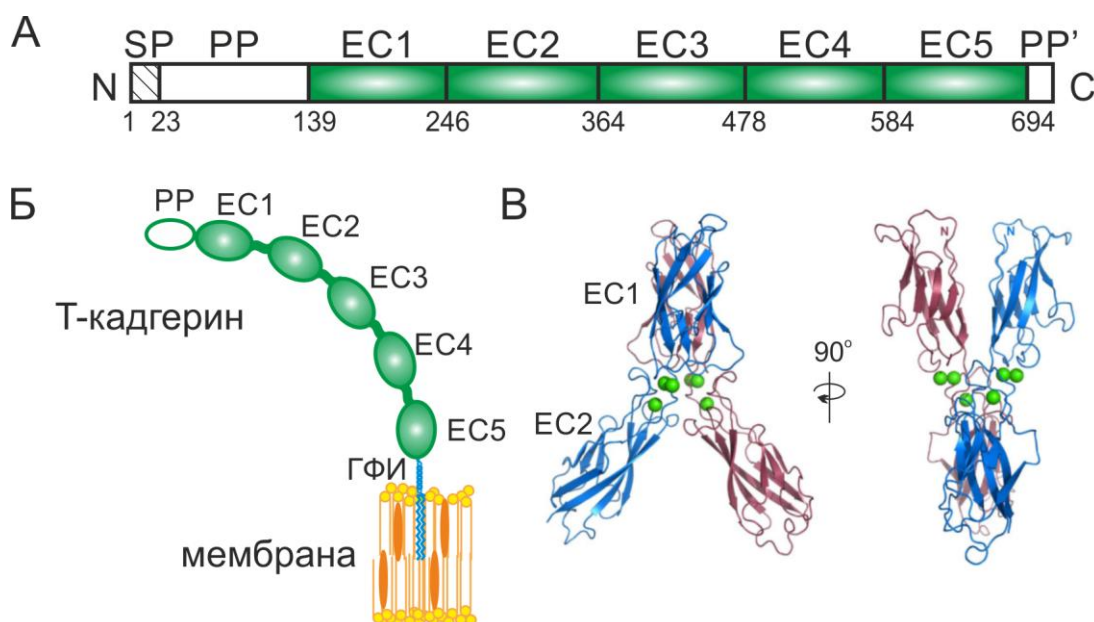


Рисунок 1.1. Структурные особенности Т-кадгерина [29]. А. Доменная организация препробелка Т-кадгерина. SP – сигнальный пептид, PP – пропептид, EC1-EC5 – внеклеточные кадгериновые домены (зелёные), PP' – пропептид, который заменяется на ГФИ-якорь. Числами обозначены первые аминокислотные остатки доменов. 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 [16]) первых двух доменов (EC1 и EC2) со связанными ионами кальция (зелёные).

Т-кадгерин человека синтезируется в виде препробелка длиной 713 аминокислотных остатков (рис. 1.1, А). На N-конце незрелого белка располагается сигнальный пептид размером 22 аминокислотных остатка,

характерный для многих мембранных, включая кадгерины, и большинства секретируемых белков [14]. После попадания созревающего белка в эндоплазматический ретикулум (ЭПР) пептидаза отщепляет сигнальный пептид от пробелка. Как и у классических кадгеринов, за сигнальным пептидом в Т-кадгерине следует N-концевой пропептид размером 116 аминокислотных остатков. Экспериментально показано, что обычно в клетках, экспрессирующих Т-кадгерин, детектируется как про-форма (p130), так и зрелая форма (p105), и обе формы обнаруживаются на мембране [30, 31]. Классические кадгерины, E- и N-кадгерины, нуждаются в протеолитическом отщеплении пропептида для осуществления своей функции – кальций-зависимой клеточной адгезии [32-34]. Отщепление пропептида, предположительно, осуществляет эндопротеаза фурин в дистальных зонах аппарата Гольджи (транс-Гольджи) [16], а также на поверхности клетки и в эндосомах [35]. Интересно, что у мышей с нокаутом гена адипонектина в скелетных мышцах и миокарде детектируется только зрелая форма Т-кадгерина p105 при неизменном уровне мРНК, т.е. адипонектин, возможно, предотвращает отщепление пропептида Т-кадгерина в норме [25, 27]. Недавно показано, что пропептид важен для связывания Т-кадгерина с адипонектином [36]. С ЛНП связываются обе формы Т-кадгерина p105 и p130 [31].

Т-кадгерин, как и другие члены суперсемейства кадгеринов, имеет внеклеточные кадгериновые домены EC1-EC5, каждый размером примерно 110 аминокислотных остатков, которые уложены в структуру бета-баррель с топологией греческого ключа [37] (рис. 1.1). Т-кадгерин имеет от 30% до 58% гомологии аминокислотной последовательности в EC1 домене при сравнении с E-, N-, C-кадгерином, а домены EC1-EC5 схожи на 47% с N-кадгерином [14, 37-40]. В последовательности Т-кадгерина есть необходимые для связывания кальция группы аминокислот: Glu-11 (нумерация без пропептида), LDRE, DQNDN, DADD и другие [38]. У всех кадгеринов между доменами располагаются консервативные кальций-связывающие сайты,

стабилизированные тремя ионами Ca^{2+} [41]. Благодаря высокоаффинному связыванию Ca^{2+} пять доменов белка при физиологических условиях оккупированы двенадцатью ионами Ca^{2+} , что позволяет координировать структуру кадгериновых доменов так, что белок принимает форму полумесяца [42]. Такая форма необходима кадгеринам для обеспечения адгезивного связывания: ЕС1 и ЕС5 должны располагаться под углом $\approx 90^\circ$ друг к другу для взаимодействия в *транс*-конформации (рис. 1.2) [15]. Полученные с атомарным разрешением структуры первых двух кадгериновых доменов и различные эксперименты с мутантами позволили установить механизм образования *цис*-гомодимеров и *транс*-гомодимеров классических кадгеринов [15, 34, 43, 44]. Образуя одновременно *цис*- и *транс*-связь, классические кадгерины формируют олигомерные комплексы в межклеточных контактах, а цитоплазматические домены опосредованно связываются с актиновым цитоскелетом и стабилизируют сеть олигомеров [15, 45]. На ЕС1 домене триптофан во втором положении (Trp-2) кадгеринов типа I заходит в консервативный гидрофобный карман ЕС1 партнёрской молекулы, образуя "strand-swap" димер (рис. 1.2) [44]. Однако у Т-кадгерина в ЕС1 домене заменены аминокислоты, необходимые для образования димеров по такому механизму (например, отсутствует NAV-мотив, а во втором положении находится Ile) [14, 16, 37]. Эти модификации первого домена приводят к стабилизации мономерной формы и уменьшению адгезивности Т-кадгерина по сравнению с кадгеринами типа I [37]. Исследования, проведенные на клетках с гиперэкспрессией Т-кадгерина, показали, что этот белок тоже может участвовать в адгезии клеток [46]. В образовании димеров Т-кадгерина участвуют кальций-связывающие участки ЕС1-ЕС2, в результате чего образуется Х-димер (рис. 1.1., В). Такой димер является лишь переходной формой для кадгеринов типа I при образовании димера "strand-swap" (рис. 1.2) [44].

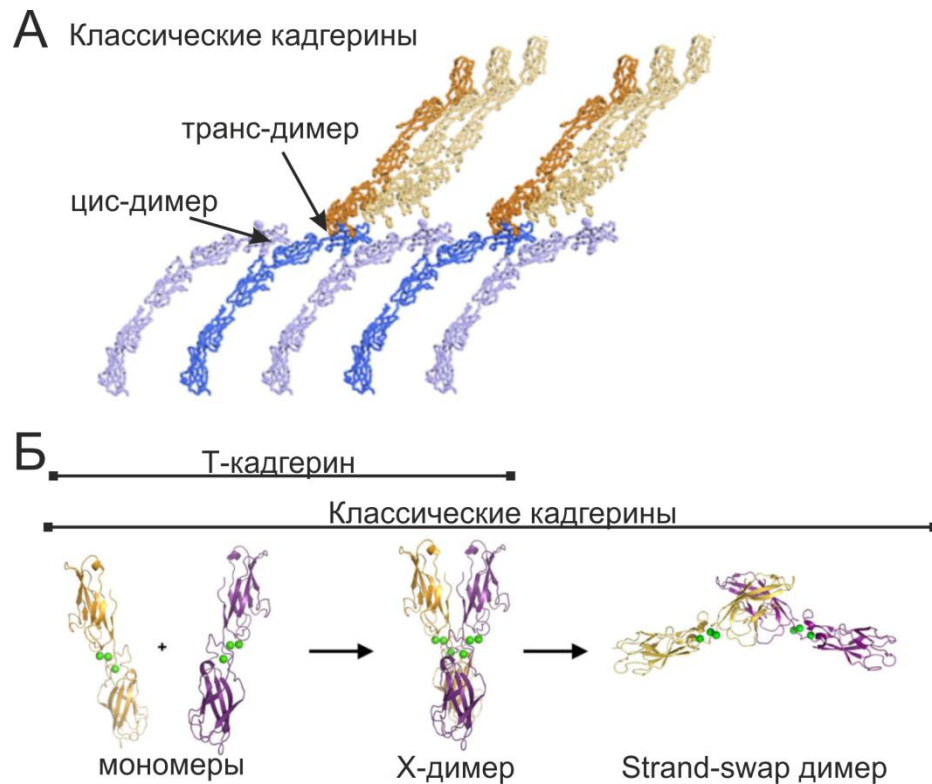


Рисунок 1.2 Модели формирования кадгериновых димеров. А. На примере N-кадгерина показано, как классические кадгерины образуют сеть, соединяющую клетки: один ряд кадгеринов (синий) взаимодействуют с другим рядом кадгеринов (оранжевый) на другой клетке. При этом образуются как *цис*- так *транс*- димеры [44]. Б. Двухстадийная модель образования димеров классических кадгеринов. Мономеры кадгерина сначала быстро образуют X-димер. Такие димеры образует и Т-кадгерин. Далее у классических кадгеринов X-димер медленно переходит в «strand-swap» *транс*-димер [15].

На С-конце Т-кадгерина располагается гидрофобный пропептид длиной 20 аминокислотных остатков (рис. 1.1, А), который заменяется в ЭПР на ГФИ-якорь (рис. 1.3) при участии трансамидазы.

Зрелый белок удерживается на внешней стороне плазматической мембраны благодаря двум остаткам жирных кислот ГФИ-якоря. При обработке клеток *in vitro* фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазой С ГФИ-якорь отделяется и Т-кадгерин оказывается в культуральной среде [14].

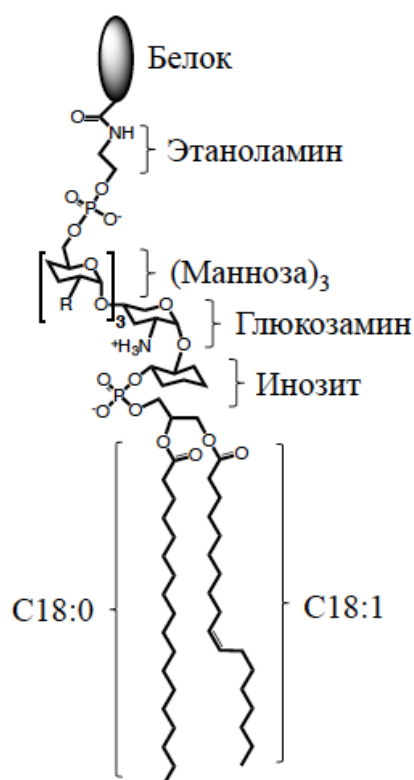


Рисунок 1.3. Структура ГФИ-якоря млекопитающих [47]. По направлению от белка к липидной части ГФИ-якорь состоит из этаноламина, фосфата, трех остатков маннозы, которые могут быть модифицированы дополнительными цепями сахаров (R), глюкозамина, инозита и фосфолипида. Наиболее распространенным алкильным заместителем является остаток стеариновой кислоты C18:0 и, реже, вместо одной из них в sn-1 положении присутствует мононенасыщенная олеиновая (C18:1, на рисунке) или насыщенная пальмитиновая (C16:0) кислота

При анализе ДНК, комплементарной РНК (кДНК) мозга куриного эмбриона была обнаружена другая изоформа Т-кадгерина – Т-кадгерин 2, который отличается последовательностью на С-конце, однако его зрелая форма также содержит ГФИ-якорь [48]. Накопленные данные по кДНК человека, предсказывают существование ещё нескольких изоформ, помимо обсуждаемой здесь основной формы Т-кадгерина человека (P55290 по UniProtKB/Swiss-Prot, размером 713 аминокислотных остатков, рассчитанная масса 78287 Да). Предсказанная по базам данным NCBI RefSeq и UniProtKB первичная аминокислотная последовательность этого белка содержит от 175 до 760 аминокислотных остатков, однако экспериментального подтверждения существования этих изоформ белка в организме пока нет.

Т-кадгерин подвергается ряду посттрансляционных модификаций, благодаря которым его молекулярная масса в эндотелиальных, гладкомышечных клетках и в миокарде увеличивается до 130 кДа (с пропептидом на N-конце) или 105 кДа (зрелая форма) [28, 31]. Интересно, что молекулярная масса классических кадгеринов с трансмембранным и цитоплазматическим доменами ≈ 120 кДа и в норме детектируется одна зрелая форма без пропептида [33, 40, 49]. Ингибирование N-гликозилирования туникамицином приводит к накоплению незрелой формы 75 кДа, которая не транслоцируется на клеточную поверхность [50]. Это свидетельствует о важности гликозилирования для созревания Т-кадгерина. На основе анализа аминокислотной последовательности установлено, что Т-кадгерин имеет восемь сайтов N-гликозилирования, наличие четырех из них экспериментально подтверждено при помощи масс-спектрометрии: один находится в пропептиде, два – в домене EC4, один – в домене EC5 [51, 52]. Недавно в скелетных мышцах было обнаружено необычное O-гликозилирование Т-кадгерина одним остатком маннозы в районе EC1-EC2, которое может иметь регуляторное значение [53]. Также экспериментально показано АДФ-рибозилирование Т-кадгерина в сердечной саркомере [54]. При индукции нейрональной дифференцировки линейных клеток РС12 феохромоцитом фактором роста нервов происходит фосфорилирование тирозина-327 в домене EC2, что ведёт к деградации белка по протеосомному пути [55]. Пока изоформы и посттрансляционные модификации Т-кадгерина мало изучены: нет данных о тканеспецифичных формах и модификациях. Необъясненным остаётся и различия в определении молекулярной массы Т-кад при иммуноблоттинге от 45 до 130 кДа [50].

Таким образом, структура доменов Т-кадгерина во многом схожа с характерными доменами классических кадгеринов, однако отдельные аминокислотные замены и ГФИ-якорь придают этому белку уникальные свойства, не характерные для кадгеринов, отвечающих за межклеточную адгезию.

1.2. Экспрессия Т-кадгерина в организме

Т-кадгерин был впервые обнаружен в нервной системе куриного эмбриона [14]. При эмбриональном развитии Т-кадгерин экспрессируется в строго определённое время и в ограниченном количестве клеток, способствуя определению траектории роста аксонов [56-59]. Человеческий гомолог, названный Taniguchi с коллегами кадгерин-13, аминокислотная последовательность которого на 82% идентична куриному Т-кадгерину, был получен из мозга [40]. Аминокислотная последовательность Т-кадгерина высоко консервативна (степень идентичности между видами выше, чем у Е-кадгерина) у позвоночных, но, в отличие от других кадгеринов, не имеет гомологов среди беспозвоночных [60, 61]. Это косвенно свидетельствует в пользу важности функций Т-кадгерина для позвоночных животных. Во взрослом организме Т-кадгерин также экспрессируется в нервной системе, причём уровень экспрессии у взрослых выше, чем у эмбрионов [62]. Несмотря на исходное обнаружение в мозге, самый высокий уровень белка у человека обнаруживается в сердце, аорте и артериях [28, 63].

В нашей лаборатории было показано, что Т-кадгерин экспрессируется в интима и медию сосудов: в эндотелиальных клетках, ГМК и перицитах [28]. В адвентиции Т-кадгерин присутствует также в стенках *vasa vasorum*. При развитии атеросклеротического поражения стенки сосуда наблюдается усиление экспрессии Т-кадгерина в ГМК [28]. При повреждении стенки сосуда при ангиопластике рост уровня Т-кадгерина в ГМК совпадает по времени с фазой активной миграции и пролиферации сосудистых клеток [64]. *In vitro* эксперименты показали, что синтез Т-кадгерина в ГМК зависит от плотности клеток и их пролиферативного статуса [65]. В эндотелиальных клетках, как и в ГМК, наблюдается зависимость уровня Т-кадгерина от фазы клеточного цикла (больше в G2/M), а его гиперэкспрессия приводит к увеличению пролиферации клеток [66]. Анализ сосудов в разных тканях показал, что в норме Т-кадгерин экспрессируется не одинаково на эндотелиальных клетках сосудов лёгких, сердца, селезёнки и почек [67].

Синтез Т-кадгерина увеличивается в эндотелиальных клетках опухолей [67]. Основные экспериментальные сведения об экспрессии Т-кадгерина приведены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1. Наличие Т-кадгерина в тканях, органах и клетках взрослого здорового человека и лабораторных животных на уровне мРНК и синтеза белка.

	орган/ткань/клетки	мРНК	белок	первоисточник
1	сердце	+	+	[28, 63, 64]
2	аорта	+	+	[28, 64, 68]
3	артерия	н	+	[28]
4	нижняя полая вена	н	+	[28]
5	мозг	+	+	[14, 62, 63]
6	скелетные мышцы	+	+	[14, 28, 63]
7	гладкие мышцы	+	+	[28, 69]
8	эндотелиальные клетки	+	+	[28, 49, 67, 70]
9	эпителиальные клетки молочной железы	+	+	[63]
10	эпидермальные кератиноциты	+	+	[63, 71]
11	перициты	н	+	[45]
12	мезенхимальные стромальные клетки	н	+	[72]
13	легочные фибробласты	н	+	[73]
14	улитка внутреннего уха	+	+	[74]
15	почки	+	+	[14, 63, 64]
16	мочевой пузырь	+	+	[28, 63]
17	лёгкие	+	+	[14, 28, 63]
18	поджелудочная железа	-	+	[28, 63, 75]
19	кишечник	н	+	[28, 64, 76]
20	спинной мозг	-	+/	[28, 62]
21	пищевод	н	+/	[28, 64]
22	преадипоциты	+	н	[63]
23	адипоциты	+	+/	[26, 77-79]
24	печень	-	-	[28, 63, 64, 78, 80]
25	селезенка	-	-	[28, 63]
26	желудок	н	-	[28]
27	надпочечники	н	-	[28]
28	щитовидная железа	н	-	[28]
29	лимфотические узлы	н	-	[64]

"+" - достоверно детектируется, "+?"-слабый сигнал, "+/-"- разные данные в литературе, "-"-достоверно не детектируется, "н"- нет литературных данных.

Ряд работ посвящен клеточным эффектам Т-кадгерина при его гиперэкспрессии (созданной путём искусственного введения дополнительного гена Т-кадгерина в клетки) без рассмотрения его взаимодействий с лигандами [30, 66, 70, 81-96]. Однако многие физиологические эффекты Т-кадгерина связаны с его рецепторными свойствами.

1.3. Т-кадгерин как рецептор липопротеидов низкой плотности: связывание, IP_3 - Ca^{2+} сигнализация, пролиферация и миграция клеток сосудов.

Под руководством Ткачука Т-кадгерин был идентифицирован как белок, связывающий ЛНП [13]. ЛНП является основным переносчиком холестерина из печени в ткани. Холестерин необходим организму для построения мембран, выработки витамина Д, стероидных гормонов и желчных кислот, но также накапливается в стенках кровеносных сосудов при атеросклерозе [1]. Высокий уровень ЛНП в крови является фактором риска развития атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний [97]. ЛНП состоит из гидрофобного ядра, образованного триацилглицеринами и эфирами холестерина, и оболочки, образованной фосфолипидами, холестерином и белком АпоВ-100 (4536 аминокислотных остатков, молекулярной массой 512 кДа) (рис. 1.4). Диаметр глобулы ЛНП составляет 18-25 нм, а масса – около 3000 кДа [98].

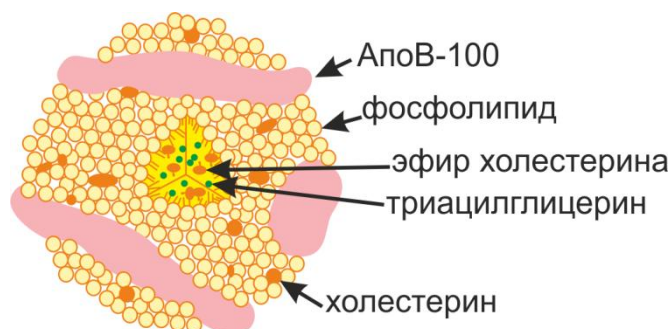


Рисунок 1.4. Схематическое представление липопротеинового комплекса липопротеида низкой плотности.

Поглощение клетками частиц ЛНП происходит путём эндоцитоза, опосредованного рецептором ЛНП LDLR [1]. Однако целый ряд работ

показал, что ЛНП оказывают эффекты, не связанные с LDLR и эндоцитозом. Было обнаружено, что ЛНП в низких концентрациях (10-100 мкг/мл) запускает быструю (секунды-минуты), обратимую (называемую также гормоноподобной) сигнализацию на первичных эндотелиальных, гладкомышечных клетках, фибробластах и тромбоцитах. Эта сигнализация включает активацию фосфолипазы C и протеинкиназы C, фосфоинозитидный обмен, увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$, ингибирование Na^+/H^+ антипорта и фосфорилирование ряда белков [2-12, 99-101]. Синтетические негидролизующие аналоги ГТФ и ГДФ, а также селективный ингибитор Gai коклюшный токсин достоверно влияли на ЛНП-индуцируемое образование инозитфосфатов и $[Ca^{2+}]_{in}$ [2, 101].

ЛНП не только сам запускает Ca^{2+} сигнализацию, но и усиливает действие Ca^{2+} мобилизующих веществ: ангиотензина II, адреналина, тромбина, фактора роста фибробластов, тромбоцитарного, инсулиноподобного и эпидермального факторов роста [6, 102-109].

Для идентификации рецептора ЛНП, который запускает внутриклеточную сигнализацию, были использованы вещества, ингибирующие связывание ЛНП с LDLR, скевенджер рецептором, рецептором липопротеидов очень низкой плотности, белком, родственным к рецептору ЛНП, но специфичное связывание ЛНП удалось уменьшить только при добавлении анти-апоВ антител [110]. Модификации ЛНП (ацетилирование, карбамоилирование, модификация лизиновых остатков) практически не влияли на их сигнальную активность, хотя снижали связывание с LDLR [18, 111]. Внутриклеточная сигнализация у пациентов с существенными дефектами LDLR (семейной гиперхолестеринемией) сохранялась [104, 112, 113].

Для идентификации белка, который связывается с ЛНП на ГМК и запускает внутриклеточную сигнализацию, был применён метод лигандного блоттинга: связывания ЛНП с Вестерн-блотами препаратов меди аорты человека [13]. В результате масс-спектрометрического анализа и

секвенирования полос, специфически связывающих ЛНП, был идентифицирован белок массой 105 и 130 кДа – Т-кадгерин [13, 31]. Т-кадгерин является низкоафинным рецептором ЛНП $Kd_{LDL} = 100 \text{ нМ} = 50 \text{ мкг/мл}$ [18]. Связывание ЛНП с Т-кадгерином на лигандном блоттинге значительно уменьшалось в присутствии хелатора двухвалентных ионов ЭДТА и восстанавливающего агента β -меркаптоэтанола, что говорит о необходимости ионов кальция и дисульфидных связей для поддержания структуры Т-кадгерина [111]. В лаборатории Resink было показано методом лигандного блота, что после обработки клеток фосфатидилинозит-специфической фосфолипазой С образец супернатанта, содержащий Т-кадгерин, не связывает ЛНП [73]. Эукариотический Т-кадгерин, лишенный пропептида (заменяемого при процессинге на ГФИ-якорь), а также Т-кадгерин, синтезированный в *E. coli* без ГФИ-якоря, также не связывают ЛНП, из чего авторы заключили, что ГФИ-якорь необходим для связывания с ЛНП. В другой работе [17] было показано, что обработка фосфатидилинозит-специфической фосфолипазой С клеток, экспрессирующих Т-кадгерин, приводит к уменьшению их специфического связывания с ЛНП, а по нашим данным к такому же эффекту приводит протеолиз, что говорит о важности белковой части Т-кадгерина при связывании с ЛНП. Прямых измерений или структурных данных о сайтах взаимодействия ЛНП с Т-кадгерином пока нет.

Экспрессия Т-кадгерина на линейных клетках приводит к увеличению связывания ЛНП и специфической внутриклеточной сигнализации: активации фосфолипазы С, формированию IP_3 , увеличению $[Ca^{2+}]_{in}$, а позднее к фосфорилированию Erk1/2 и транслокации NF κ B в ядро [10, 12]. Участие киназ из семейства Src в этом сигналинге пока достоверно не показано, хотя и предполагается некоторыми учёными [10, 11]. Сигнальные эффекты ЛНП приводят к миграции и пролиферации как линейных клеток с Т-кадгерином, так и ГМК [10, 12, 109].

Экспрессия Т-кадгерина увеличивается в сосудах при рестенозе и атеросклерозе [28, 64]. Способность Т-кадгерина связывать ЛНП и запускать

внутриклеточную сигнализацию может играть роль в прогрессировании этих сердечно-сосудистых заболеваний, при которых, помимо увеличения уровня экспрессии Т-кадгерина, увеличивается и уровень ЛНП в крови.

1.4. Т-кадгерин как рецептор высокомолекулярной формы адипонектина: связывание, возможная внутриклеточная сигнализация и защитное действие на сердечно-сосудистую систему

Неожиданной находкой стало обнаружение способности Т-кадгерина связывать не только липопротеиды, но и структурно другой лиганд: гексамерную и высокомолекулярную формы адипонектина, гормона жировой ткани [20]. Адипонектин (другие обозначения AdipoQ, Acrp30, apM1 и ошибочное GBP-28 [114, 115]) был открыт как специфический мажорный секретируемый белок зрелых адипоцитов [116-118]. Его концентрация в крови в норме необычайно высока 2-20 мкг/мл (около 0,05% общего белка сыворотки), но достоверно уменьшается при ожирении, инсулинорезистентности, диабете второго типа, метаболическом синдроме и сердечно-сосудистых заболеваниях [21, 116, 118-124].

Адипонектин является мультимерным белком и представлен в крови несколькими формами (рис. 1.5) [125, 126]. Мономер адипонектина человека состоит из 244 аминокислотных остатков молекулярной массой 26 кДа. С N-конца после небольших сигнальной последовательности и гипервариабельного участка следует коллагеноподобный участок (66 аминокислотных остатков), а на С-конце находится глобулярный домен (137 аминокислотных остатков), гомологичный фактору комплимента C1q, глобулярным доменам коллагенов типа VIII и X. Структурно похожие коллагеновый и глобулярные домены есть также у TNF α , маннан-связывающего белка гепатоцитов, сурфактанта легких и ряд других белков [116, 127].

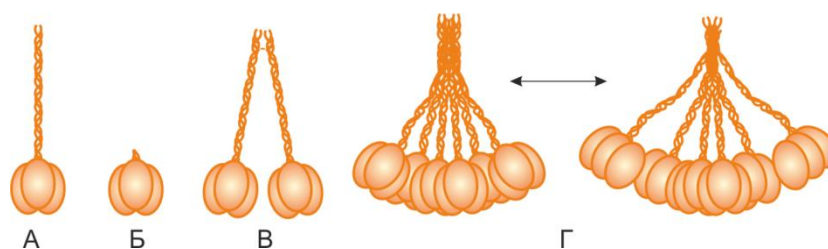


Рисунок 1.5. Формы адипонектина, циркулирующие в крови. А. Тример. Б. Глобулярная форма. В. Гексамер. Г. Высокомолекулярная форма: веероподобная (более компактная ≈ 25 нм) и букетоподобная (≈ 32 нм).

В результате посттрансляционных модификаций внутри адипоцитов образуются гомоолигомеры: тримеры, гексамеры и 12-18меры (высокомолекулярная форма, 360-540 кДа) (рис.1.5 А, В, Г) [116, 128-130]. Тримеры адипонектина формируются за счёт нековалентных связей коллагеновых доменов, образующий тройную спираль, и ассоциации глобулярных доменов. Для образования гексамерной и более крупных форм необходимы дисульфидные связи между тримерами (рис. 1.5) [128]. Структуру высокомолекулярной формы адипонектина стабилизируют также ионы кальция [131].

Ряд гомологов адипонектина подвергаются протеолитическому расщеплению, в результате которого образуется биологически активный тример глобулярных доменов. В лаборатории Lodish предположили, что адипонектин тоже подвергается протеолизу с образованием глобулярного адипонектина и обнаружили его небольшое количество в крови (рис.1.5, Б) [122]. *In vitro* показано, что такой протеолиз может осуществлять лейкоцитарная эластаза, секретируемая активированными моноцитами или/и нейтрофилами [128].

В крови разные формы (тримерные, гексамерные и высокомолекулярной) адипонектина не превращаются в друг друга [129]. Существуют половые отличия в концентрации тотального адипонектина в крови и соотношения его форм: у самцов концентрация в крови в 1,5-2 раза ниже, чем у самок, в основном за счёт уменьшения концентрации высокомолекулярной формы адипонектина под действием андрогенов [21,

128, 130, 132-134]. Именно высокомолекулярную форму адипонектина (далее Адипо) считают мажорной и наиболее физиологически активной. Обнаружена отрицательная зависимость между концентрацией Адипо и индексом массы тела, диабетическим фенотипом, инсулиносувствительностью и сердечно-сосудистые заболеваниями связанными с метаболическими дисфункциями [21-23, 128, 135-138]. *In vitro* показано, что Адипо вызывает фосфорилирование AMP-зависимой протеинкиназы (АМРК) и защищает от апоптоза эндотелиальные клетки [22], а при внутривенных инъекциях лабораторным животным приводит к уменьшению уровня глюкозы в крови [23].

Для обнаружения белка, связывающего Адипо, Hug с коллегами трансформировали ретровирусной библиотекой кДНК миобластов C2C12 клетки Ba/F3, которые исходно не связывали адипонектин [20]. Оказалось, что клоны, связывающие адипонектин после трансформации, содержат Т-кадгерин. Было показано селективное взаимодействие Т-кадгерина с гексамерной и высокомолекулярной формами адипонектина, но не с тримерной или глобулярной. Только адипонектин, полученный из эукариотических клеток, связывается с Т-кадгерином, что говорит о важности посттрансляционных модификаций для этого взаимодействия. Мутант адипонектина без цистеинового остатка на N-конце, который необходим для образования гексамеров и более крупных олигомеров, при иммунопреципитации демонстрирует значительное снижение связывания с Т-кадгерином по сравнению с Адипо дикого типа. В экспериментах *in vivo* на мышцах была показана солокализация Т-кадгерина с Адипо в сердечной мышце (как микроскопически, так и при иммунопреципитации) [25]. Кардиомиоциты, эндотелий, гладкомышечные и скелетные мышцы нокаутных по Т-кадгерину мышей не связывают Адипо, и за счёт этого уровень адипонектина в плазме значительно возрастает [24, 25]. Множество исследований подтверждает связь полиморфизма гена Т-кадгерина с уровнем адипонектина в крови [139-144]. Не так однозначны результаты

исследований других рецепторов адипонектина: в нескольких работах идентифицированы значимые ассоциации AdipoR1, AdipoR2 с его уровнем и патологиями [145-148], однако другие исследования не выявили подобной зависимости [149-152]. Для связывания Адипо клетками НЕК293 достаточно трансфицировать их конструкцией с кДНК Т-кадгерина, но не конструкциями других рецепторов адипонектина AdipoR1, AdipoR2 [25]. Все эти данные доказывают, что Т-кадгерин является специфическим адипонектин-связывающим белком.

Т-кадгерин опосредует ряд физиологических эффектов Адипо. В лаборатории Ranscht было показано, что отсутствие гена Т-кадгерина у мышей приводит к отмене протективного действия адипонектина, что выражается в развитии избыточной гипертрофии сердца и увеличении зоны инфаркта миокарда [25]. На той же модели нокаутных животных продемонстрирована необходимость Т-кадгерина при адипонектин-опосредованной реваскуляризации [27]. А в 2017 году показано, что комплекс Адипо-Т-кадгерин защищает от пролиферации неоинтимы и от формирования атеросклеротических бляшек [24]. Авторы работы отмечают, что молекулярный механизм этого эффекта ещё предстоит выяснить.

Интересно, что между концентрацией белка Т-кадгерина и Адипо в тканях существует положительная связь: не только Т-кадгерин необходим для связывания Адипо, но и Адипо необходим для стабилизации рецептора на мембране, вероятно, за счёт того, что Адипо может предотвращать отщепление фосфолипазой ГФИ-якоря [25, 26].

Совсем недавно было проведено исследование по выявлению доменов Т-кадгерина необходимых для связывания с Адипо [36]. Используя конструкцию Т-кадгерина с Fc фрагментом IgG, было показано связывание с гексамерным и более крупными гомоолигомерами адипонектина в бесклеточной системе без дополнительных сывороточных факторов и мембранных рецепторов. Без доменов EC1, EC2 Т-кадгерин не связывается с Адипо, без продомена и домена EC3 домена происходит уменьшение

связывания. Форма Т-кадгерина с пропептидом значительно увеличивает связывание с Адипо в мышечных аортах *in vivo*. В этой работе [36] константа диссоциации рецептор-лигандного комплекса составила $Kd_{Adipo} = 1 \text{ нМ}$ (в эквиваленте тримера), что значительно меньше, чем в предыдущих работах – 25 нМ (в эквиваленте тримера) [20, 153]. Это различие может быть связано с тем, что исследования были проведены на разных экспериментальных моделях: более ранние работы были выполнены на клетках при температуре 4°C , а Fukuda с коллегами работали с химерными белками при комнатной температуре. Мы предполагаем, что важнейшим различием этих экспериментальных моделей является различие в форме Т-кадгерина: Fukuda с коллегами использовали искусственно димеризованный Т-кадгерин на Fc фрагментах, тогда как его форма организации на мембране неизвестна. Именно при димеризации важны EC1-EC2 Т-кадгерина, что, может объяснять невозможность связывания Адипо при их отсутствии. Адипо может образовывать всеорообразный комплекс или более компактный букетообразный [154] (рис. 1.5). Коллагеновое основание "букета" описывает эллипсоид $6 \times 4,5 \times 4,5 \text{ нм}$, а глобулярные домены могут занимать от 25 нм до 32 нм [126, 154]. Такой большой размер лиганда не раз наталкивал исследователей на мысль о том, что при связывании с Адипо происходит кластеризация рецепторов [126, 155]. До настоящего момента сведений о *цис*-димеризации Т-кадгерина в литературе не было. Однако есть некоторые данные о других рецепторах адипонеткина AdipoR1 и AdipoR2.

Рецепторы адипонектина AdipoR1 и AdipoR2 состоят из семи трансмембранных α -спиралей, но с инвертированной топологией по сравнению с рецепторами, сопряженных с G-белками [156]. Эти рецепторы экспрессируются повсеместно, хотя уровень экспрессия в тканях отличается, например, AdipoR1 много в скелетных мышцах, а AdipoR2 – в печени. AdipoR1 является высокоаффинным рецептором глобулярной формы и низкоаффинным рецептором полноразмерного адипонектина, AdipoR2 является среднеаффинным рецептором обоих исследуемых в этой работе

форм. Внутриклеточная сигнализация от адипонектина, запускаемая через эти рецепторы и их влияние на воспаление, метаболизм глюкозы и липидов активно исследуется (подробнее в обзорах [157-159]). Остаётся неясным, является ли Т-кадгерин корецептором AdipoR1 и AdipoR2. Трансмембранные рецепторы AdipoR1 и AdipoR2 образуют гомо- и гетеродимеры, однако, вопреки ожиданиям, при взаимодействии с Адипо эти димеры диссоциируют [160, 161].

Запускается ли при связывании с адипонектином внутриклеточная сигнализация через Т-кадгерин, пока нельзя сказать однозначно. Показано, что у мышей, нокаутных по Т-кадгерину, изменён уровень фосфорилирования AMPK в кардиомиоцитах, а в эндотелиальных клетках при подавлении Т-кадгерина увеличивается адипонектин-стимулированное фосфорилирование Erk1/2 [25, 162].

1.5. Роль димеризации мембранных рецепторов в передаче сигнала

Понимание передачи сигнала мембранными рецепторами является важной научно-практической задачей, поскольку большинство гормонов и лекарств действует на мембранные рецепторы, запуская или ингибируя клеточные процессы. Хорошо изучен механизм передачи сигнала рецепторными тирозиновыми киназами (RTK): внеклеточный домен узнаёт лиганд, что приводит к димеризации двух рецепторов, активации их внутриклеточных ферментативных доменов, фосфорилированию этих доменов и сборке на них сигнального комплекса белков. Несмотря на различия в типах димеров среди представителей этого класса, давно понятна ключевая роль димеризации RTK [163, 164]. Современные методики позволили обнаружить короткоживущие димеры RTK без лигандов, и увеличение их времени жизни при связывании с лигандом [165, 166].

Долгое время считалось, что рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), образующие самое большое семейство мембранных рецепторов (около 800 генов), после связывания с лигандом остаются в мономерной форме, меняя лишь свою конформацию. Однако в последнее время

множество работ посвящено обсуждению существования на мембране гомо-, гетеродимеров и олигомеров GPCR (подробнее в обзорах [167, 168]). Образование комплексов GPCR влияет на связывание лигандов и трансдукцию сигнала, например, для рецепторов, активируемый протеиназой (PARs) [169] и рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (GABA_B) [170]. А рецепторы глутамата (mGlu), GPRC6a и ионов Ca²⁺ (CaS receptor) образуют даже дисульфидные связи при образовании гомоолигомеров [171]. Но, как уже было показано на примере рецепторов AdipoR, связывание с лигандом может приводить к диссоциации димеров, а в случае neurokinin-1 рецептора лиганд не изменяет его мономерного состояния [172]. Таким образом, роль димеризации при передаче сигнала GPCR зависит от структурных особенностей рецепторов и лигандов и не является универсальной для всех представителей этого семейства.

Прежде чем обсуждать роль димеризации в передаче сигнала ГФИ-заякоренными белками, остановимся на их особенностях, локализации и функциях.

1.6. ГФИ-заякоренные белки, мембранные микродомены и методы их изучения

В организме человека более 130 ГФИ-заякоренных белков по информации базы данных UNIPROT (www.uniprot.org), среди них молекулы, выполняющие разные функции и имеющие структурно разные внеклеточные домены (таблица 1.2).

Таблица 1.2. Некоторые представители ГФИ-заякоренных белков человека из разных суперсемейств [47, 173, 174].

ГФИ-заякоренный белок	Название гена	Суперсемейства, к которым относятся внеклеточные домены этих белков, по http://supfam.org
Фактор ускорения распада комплемента	CD55	Complement control module/SCR domain
Ингибитор мембрано-атакующего комплекса	CD59	Snake toxin-like
Урокиназный рецептор	PLAUR	Snake toxin-like
Т-кадгерин	CDH13	Cadherin-like
Эфрин A1	EFNA1	Cupredoxins
Нетрин-G1	NTNG1	EGF/Laminin
Прионный белок	PRNP	Prion-like
5'-нуклеотидаза	NT5E	Metallo-dependent phosphatases; 5'-nucleotidase, C-terminal domain
Ацетилхолинэстераза	ACHE	alpha/beta-Hydrolases
Дипептидаза	DPEP1	Metallo-dependent hydrolases
Алкалиновая фосфотаза	ALPPL2	Alkaline phosphatase-like
Антиген 3, ассоциированный с функцией лимфоцитов	CD58	Immunoglobulin
Нейтральный белок клеточной адгезии	NCAM1	Fibronectin type III Immunoglobulin

Незрелые формы ГФИ-заякоренных белков имеют С-концевые пептиды (сигналы ГФИ модификации), которые распознаются специфической трасамидазой и заменяются на про-форму ГФИ-якоря, который затем модифицируется далее. Не менее 27 белков участвуют в биосинтезе, модификации и транспорте ГФИ-якоря, а отсутствие биосинтеза ГФИ-якоря летально (подробнее в обзорах [173, 175]). Роль этих модификаций и самого ГФИ-якоря пока не ясна, но, по-видимому, крайне важна и не ограничивается функцией сигнала выхода на плазматическую мембрану. Например, нарушения в гене PIGG, кодирующем белок биосинтеза ГФИ-якоря, приводит к нарушениям интеллекта с судорогами и гипотонией, при этом не нарушая локализацию ГФИ-заякоренных белков на поверхности клеток [176]. До сих пор нет данных о связи между

структурными особенностями ГФИ-якоря и функцией ГФИ-заякоренного белка.

Первым популярным экспериментальным подходом для изучения ГФИ-заякоренных белков было их выделение с фракцией мембран, нерастворимых в неионных детергентах (detergent resistant membrane, DRM), обычно холодного Triton X-100 [177]. Помимо ГФИ-заякоренных белков такие фракции обогащены холестерином и сфинголипидами [178, 179]. DRM ранее отождествляли с липидными (мембранными) рафтами, функциональное значение которых обсуждается уже несколько десятилетий [180, 181]. Однако вскоре стало понятно, что этот метод не всегда отражает исходное состояние изучаемой мембраны. Состав белков, входящий в DRM, зависит от температуры, детергента и его концентрации [182, 183]. Более того, детергенты могут вызывать разделение фаз даже в исходно гомогенных мембранах [184]. Поэтому в последнее время активно разрабатываются и применяются другие подходы.

Функциональная роль липидных рафтов проявляется в их способности быстро образоваться, сливаться и распадаться под управлением белков, входящих в их состав [185]. Характерное время жизни рафтов составляет от мс до мин, а размер от 2 до 1000 нм [185, 186]. Очевидно, что метод на основе DRM не позволяет изучить суть процессов, связанных с липидными рафтами, т.к. не обладает необходимым временным и пространственным разрешением.

Основной отличительной особенностью липидных рафтов является упорядоченность липидного бислоя. Все современные методы их регистрации и изучения используют косвенные показатели упорядоченности бислоя, измеренные с помощью подходов оптической микроскопии [187]. Хотя, как и метод на основе DRM, эти подходы измеряют косвенные показатели, их временное и/или пространственное разрешение соответствует динамике и размеру липидных рафтов, что позволяет изучать их функциональную роль в работе плазматической мембраны. Среди косвенных

показателей, используемых для регистрации липидных рафтов используют подвижность и вращательную релаксацию мембранных зондов, обогащение насыщенных липидов с насыщенными остатками жирных кислот и холестерина, кластеризацию флуоресцентных аналогов этих липидов, а также кластеризацию и подвижность ГФИ-белков [187]. Именно при изучении липидных рафтов с помощью анализа траекторией движения отдельных ГФИ-белков были выявлены особенности взаимодействия мембраны с цитоскелетом и его влияние на подвижность молекул и свойства липидных рафтов [188, 189]. Было обнаружено, что в искусственных мембранах и клеточных мембранных участках без цитоскелета (блебах, вздутиях мембраны) коэффициент диффузии белков порядка $8 \text{ мкм}^2/\text{с}$, что в приблизительно в 20 раз выше, чем в плазматической мембране. Такое же увеличение скорости диффузии ГФИ-заякоренных белков происходит при разрушении актинового цитоскелета [188, 190], что доказывает его участие в ограничении подвижности молекул в плазматической мембране. Другим важным фактором, ограничивающим диффузию ГФИ-заякоренных белков, является их связывание с лигандом и гомодимеризация, что приводит к организации и функционированию рафта [19, 188, 189]. Другие авторы считают, что иммобилизация ГФИ-заякоренных белков не влияет на упорядоченность липидов в мембране [191]. По-видимому, пока нет единого представления о взаимовлиянии рафтов и ГФИ-заякоренных белков.

Рафты отличаются от остальной мембраны повышенным содержанием насыщенных заряженных липидов и холестерина, увеличенной на $\sim 1 \text{ нм}$ (или на $\sim 15\%$) толщиной, упорядоченной липидной фазой и замедленной в 2–3 раза скоростью латеральной диффузии липидов [47, 192]. Основными насыщенными липидами внешней стороны плазматической мембраны являются гликофинголипиды (ганглиозиды, сфингомиелин, церамиды), и их концентрация в рафте примерно в 1,5 раза выше, чем в остальной мембране [47, 192]. Для холестерина этот показатель составляет 2. С внутренней стороны плазматической мембраны рафт обогащен фосфатидилсерином, а

также другими анионными липидами – фосфатидилинозитами, которые специфичны относительно различных типов рафтов [47, 181, 193]. Обращает на себя внимание бислойность рафта – сопряжённость монослоёв, причины которой являются предметом исследований последних лет [181, 194-196] (рис.1.6).

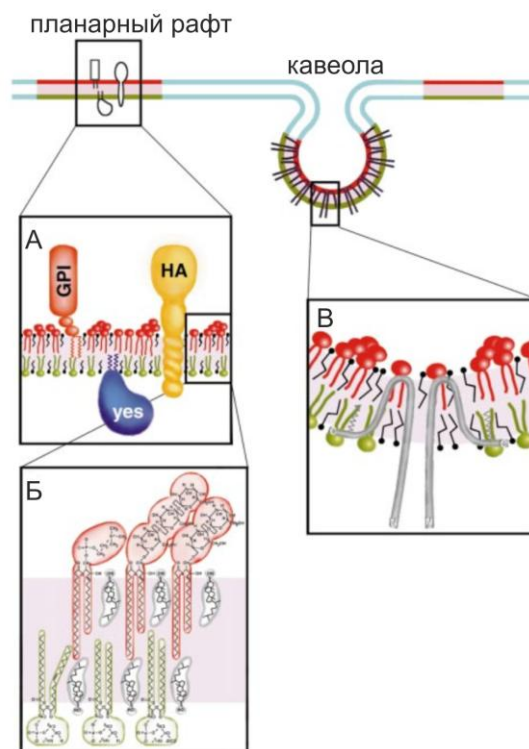


Рисунок 1.6. Модельная схема организации рафтов в плазматической мембране. Рафты (красный), богатые холестерином и сфинголипидами, выделяются из других областей бислоя (голубой). А. Планарные рафты на внешней поверхности мембраны содержат ГФИ-заякоренные рецепторы (GPI), на внутренней – киназы из семейства Src (yes), а также трансмембранные белки (например, гемагглютинин). Б. Бислойный рафт ассиметричен: сфингомиелин (красный) и гликофосфолипиды (красный) – на внешней поверхности мембраны, и глицеролипиды (например, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин; зеленый) – на внутренней. Холестерин (серый) находится в обоих монослоях. Взаимодействуя с сфингомиелином и ацильными цепями, он структурирует мембрану. В. Кавеола образуется за счёт самоорганизации липидированных молекул кавеолина, которые образуют шпильку в мембране (из [181] с изменениями).

В результате посттрансляционных модификаций к белкам могут присоединяться определенные липиды, которые повышают их афинность к рафтам [197]. Например, в таких белках как Gai, Lyn и Yes к концевому

глицину присоединяется N-миристоил, а к следующему за ним цистеину S-пальмитоил; в кавеолине – три S-пальмитоила к цистеинам. ГФИ-якорь должен содержать насыщенные и моновенасыщенные остатки жирных кислот длиной не менее 16 атомов углерода для взаимодействия с рафтами [198, 199]. Рафты с олигомерами кавеолина образуют инвагинации – кавеолы, которые детектируются при помощи электронной микроскопии, тогда как рафты без кавеолина являются плоскими (планарные рафты) и не детектируются при помощи электронной микроскопии [200] (рис. 1.6). Эти два типа рафтов также различаются по времени жизни кавеолы могут существовать минуты, тогда как плоские рафты несколько секунд.

Изучение компартментизации и функционирования мембраны по-прежнему остаётся сложной экспериментальной задачей [201]. Размеры рафтов меньше дифракционного предела световой микроскопии, а время их жизни слишком коротко для прямой детекции при помощи микроскопии сверхвысокого разрешения [187, 202]. Для метода молекулярной динамики моделирования мембранных процессов, напротив, рафты являются слишком многокомпонентными, крупными и долгоживущими объектами для предсказания поведения которых необходим расчёт по крайней мере 1 мкм и 1 с, однако работы в этом направлении ведутся [203-206]. Поэтому использование явления Фёрстеровского (флуоресцентного) резонансного переноса энергии (FRET), которое позволяет детектировать сближение флуорохромов на расстояние 1-10 нм является одним из немногих подходящих инструментов для изучения рафтов и динамики ГФИ-заякоренных белков на мембране (рис.1.7.).

1.7. FRET как метод детекции белок-белковых взаимодействий ГФИ-заякоренных белков

FRET – индуктивно-резонансный перенос энергии между двумя флуоресцентными молекулами, при котором возбуждённая молекула донора (D) безызлучательно переносит энергию на достаточно близко расположенную (<10 нм) молекулу акцептора (A) в основном состоянии в

результате диполь-дипольного взаимодействия. Теорию этого феномена впервые описал в своих работах в 1940х годах Theodor Förster [207].

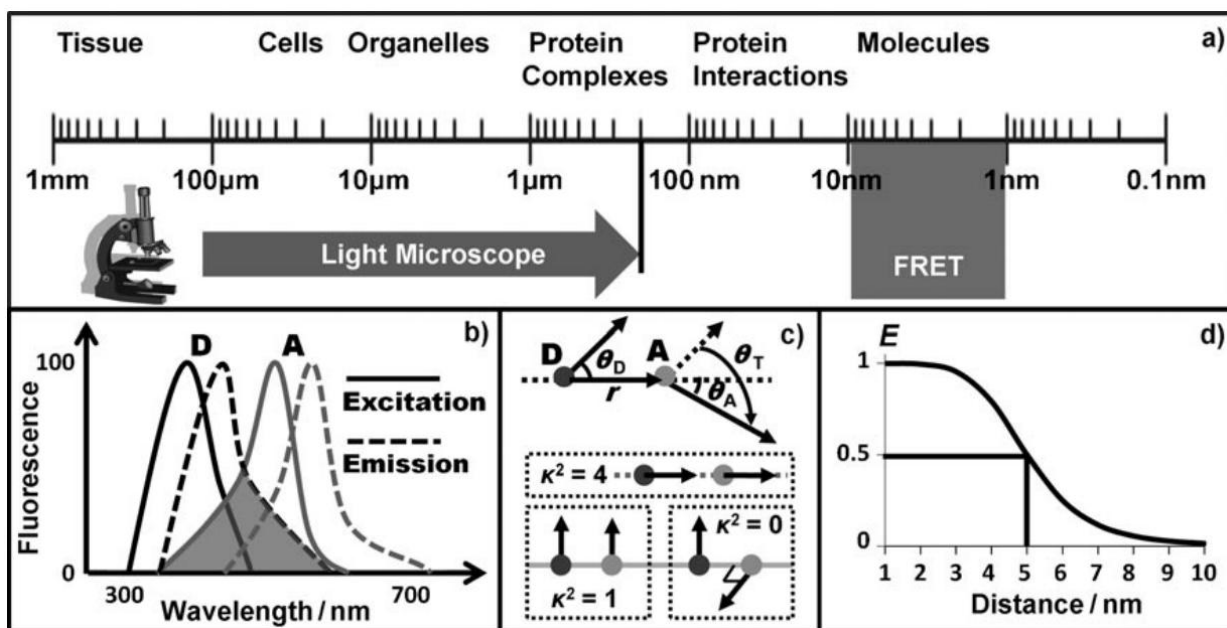


Рисунок 1.7. Основные принципы FRET. а) FRET может использоваться для обнаружения взаимодействия между флуоресцентно мечеными клеточными компонентами в пределах 1-10 нм, далеко за пределом разрешения светового микроскопа (около 200 нм). Наблюдение FRET требует не только определённого расстояния D-A но и двух других условий: б) существенного перекрытия между спектрами эмиссией донора и возбуждения акцептора (серая область); в) определённой ориентации дипольных моментов донора и акцептора; вероятность FRET тем больше, чем больше фактор $\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cdot \cos\theta_A)^2$, где θ_T угол между диполем эмиссии донора и диполем поглощения акцептора; θ_D и θ_A - углы между этими диполями и вектором, соединяющим донор и акцептор; д) Поскольку эффективность передачи энергии E от донора к акцептору зависит от шестой степени расстояния между ними [см. формулу (1.1)], параметр E чувствителен к изменению расстояния D-A на расстояниях близким к фёрстеровскому радиусу, как видно из графика зависимости расстояния между пары D-A и E , у которой фёрстеровский радиус 5 нм (из [208]).

Эффективность определяется формулой:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (1.1)$$

где r – это от расстояние между донором и акцептором и R_0 - фёрстеровский радиус пары флуорофоров [209]).

Фёрстеровский радиус пары флуорофоров может быть рассчитан по формуле:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \varphi_D}{128 N_A \pi^5 n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \text{ где } N_A - \text{число Авогадро.} \quad (1.2)$$

где κ – ориентационный фактор, n – показателем преломления, φ_D – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора, J – интеграл перекрывания спектра эмиссии донора $F_D(\lambda)$ (площадь которого нормирована на 1) и спектра поглощения акцептора ε_A , N_A – число Авогадро.

На экспериментальное наблюдение FRET значительно влияют три параметра: перекрывание спектров донора и акцептора, ориентация диполей донора и акцептора и расстояние между ними (рис.1.7.). Именно благодаря чувствительности FRET к расстоянию до 10 нм его стали использовать как «спектроскопическую линейку» для измерения расстояния между биомолекулами [210]. С развитием технологий появились подходы, позволяющие измерять FRET методами флуоресцентной микроскопии (сенсебилизированной эмиссии, обесцвечивания акцептора, времени жизни флуоресценции, поляризационной) и проточной цитометрии. Появление флуоресцентных антител, а за тем и генетически кодируемых флуоресцентных белков увеличило популярность применения FRET среди биологов.

Kenworthy и Edidin в 1998 году применили FRET для оценки кластеризации ГФИ-заякоренной 5'-нуклеотидазы [211]. В своих пионерских экспериментах они использовали флуоресцентно-меченные моноклональные антитела против ГФИ-заякоренного белка на фиксированных формальдегидом образцах. Им удалось детектировать эффективность FRET, которая коррелировала с флуоресценцией акцептора. По теоретическим оценкам авторов такая зависимость соответствовала случайному распределению ГФИ-заякоренного белка на мембране, а не постоянно существующим кластерам.

В том же году Varma и Mayor измерили анизотропию FRET флуоресцентного аналога фолиевой кислоты для оценки кластеризации её ГФИ-заякоренного рецептора [212]. Такой приём позволил подтвердить существование на мембранах живых клеток субмикронных доменов, богатых холестерином. После удаления холестерина с мембраны при помощи метил-

бета-циклодекстрина разрушалась организация в кластеры ГФИ-заякоренных фолатных рецепторов.

Эксперименты по гомо- и гетеро-FRET (одинаковыми и отличными красителями, соответственно) с конструкциями ГФИ-заякоренных флуоресцентных белков позволили показать, что большинство из них находятся на мембране в виде мономеров и лишь 20-40% собраны в кластеры [213].

Ряд успешных экспериментов был проведен с химерными конструкциями ГФИ-заякоренных и флуоресцентных белков. Функциональный химерный белок для ГФИ-заякоренного урокиназного рецептора удалось получить научным группам Sidenius и Blasí [214]. Для исследования динамики мономер-димер и распределения рецептора была использована микроскопия времени жизни флуоресценции и флуоресцентная корреляционная спектроскопия. Кластеризация прионных белков на клетках также была обнаружена благодаря использованию методов измерения FRET путем фотообесцвечивания акцептора, сенсебилизированной эмиссии и времени жизни флуоресценции [215].

Таким образом, измерение FRET позволяет эффективно оценивать степень димеризации ГФИ-заякоренных белков на мембране живых клеток.

1.8. Механизмы передачи сигнала ГФИ-заякоренными рецепторами

Несмотря на отсутствие трансмембранного и цитоплазматических доменов, некоторые ГФИ-заякоренные белки по праву могут считаться рецепторами: они не только специфично связываются со своими лигандами, но и запускают внутриклеточную сигнализацию. Можно выделить два основных возможных механизма передачи сигнала ГФИ-заякоренными белками:

- 1) связывание трансмембранных адаптеров, корецепторов;

2) образование гомодимеров/олигомеров за счёт белок-белковых взаимодействий и активизация белков на внутренней поверхности мембраны за счёт липид-рафтовых взаимодействий.

Эти механизмы не являются взаимоисключающими. Так, например, известно, что ГФИ-заякоренный рецептор урокиназы (uPAR) имеет 9 лигандов, 33 латеральных партнёра и способен к димеризации [216]. Причём результирующий внутриклеточный сигнал и клеточный ответ зависит от того, с какими белками связан uPAR: в рафтах образуется EGFR-интегрин-uPAR комплекс, который запускает пролиферацию, вне рафтов может быть образован комплекс интегрин-uPAR-GPCR, инициирующий клеточную миграцию, или же PAI-1/uPA-uPAR-интегрин комплекс, который, напротив, блокирует миграцию. Связывание uPAR с витронектином приводит к формированию стабильных гомодимеров, тогда как урокиназа уменьшает количество димеров на мембране [214].

Предпринимались попытки найти молекулярных партнёров, корецепторов, Т-кадгерина [217, 218]. При исследовании методами коиммунопреципитации и масс-спектрометрии клеток с гиперэкспрессии Т-кадгерина с генетически кодируемой меткой были идентифицированы молекулы Grp78, интегрин $\beta 3$ [217]. Являются ли эти молекулы партнёрами Т-кадгерина лишь в определённых условиях, таких как стресс ЭПР, остаётся не ясно [70, 219]. Нет данных и о том что они участвуют в лиганд-зависимом передаче сигнала.

Ряд ГФИ-заякоренных рецепторов (GFRa, CD14, Thy-1), связываясь со своими лигандами, образуют гомодимеры и запускают сигнализацию [190]. Детально описан механизм запуска кальциевой сигнализации CD59 (рис.1.8) [19, 188, 189].

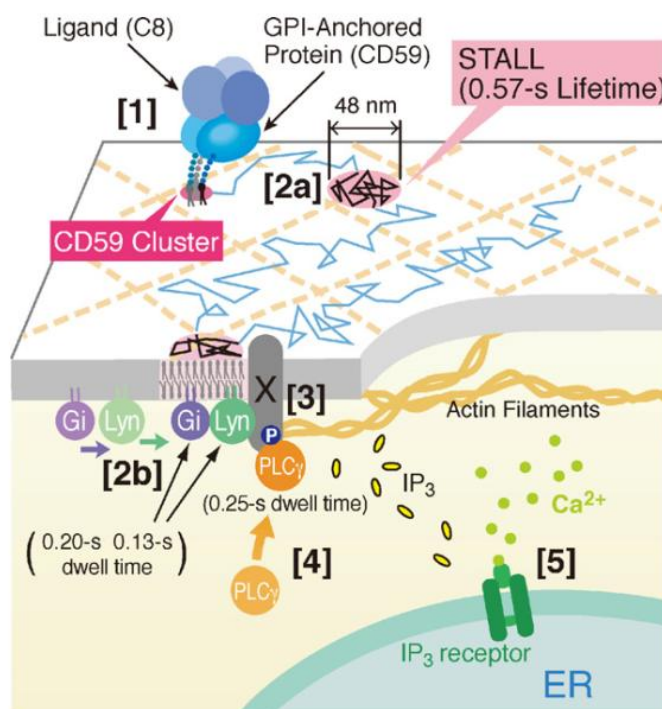


Рисунок 1.8. Схема передачи сигнала ГФИ-заякоренным CD59. [1] При связывании с лигандом CD59 образует гомоолигомер, который может привлекать холестерин и гликофинголипиды, образуя рафт. [2a] Происходит стимуляция индуцированной временной остановки латеральной диффузии (STALL) [2b] За счёт липид-липидного взаимодействия Gai и Lyn киназа (из семейства Src) рекрутируются в рафт, вероятно, [3] через неизвестный трансмембранный белок X, имеющий сродство к белковой части Gai и Lyn и рафту. Gai при взаимодействии с Lyn активирует её, что приводит к фосфорилированию неизвестного белка X, который индуцирует связывание рафтов, содержащих кластеры CD59, с актиновыми филаментами цитоскелета и STALL. [4]. Во время периода STALL белком X рекрутируется фосфолипаза C. Активация фосфолипазы C приводит к образованию из PIP_2 , IP_3 и DG, что соответственно открывает кальциевые IP_3 зависимые рецепторы на ЭПР и [5] концентрация Ca^{2+} в цитоплазме растёт.

Наиболее долгоживущими (>140 мс) кластерами ГФИ-заякоренных белков являются гомодимеры, образованные за счёт белок-белковых взаимодействий и стабилизированные липид-липидными взаимодействиями [19]. Прионные белки, по-видимому, образуют гомокластеры и иммобилизованы 72% времени, обеспечивая протективное, антиапоптотическое действие в физиологических условиях [220, 221]. Эти примеры доказывают важность гомодимеризации ГФИ-заякоренных рецепторов и временных характеристик этого процесса для передачи сигнала.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Культивирование эукариотических клеток

Линейные эмбриональные клетки почек человека (HEK293) культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM, HyClone или ПанЭко), содержащей антибиотик, антимикотик (HyClone) и 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone). Гладкомышечные клетки (ГМК) были выделены из пупочной артерии или вен человека по методам, описанным ранее ([222] и [223], соответственно).

ГМК культивировали в среде DMEM F12 с добавлением 5% необходимых добавок для роста ГМК SMGS (Gibco), 5% фетальной бычьей сыворотки (HyClone) и антибиотика, антимикотика (HyClone). В экспериментах использовали клетки 3-5 пассажа. Все клетки пассировали, обрабатывая раствором Версена (ПанЭко, Россия) и смесью протеаз HyQTase (HyClone) и культивировали в инкубаторе при 37°С и 5% CO₂.

2.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Клетки лизировали на льду при помощи буфера RIPA (Radio-Immune Precipitation Assay: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5 % дезоксихолата натрия, 0,1% SDS) с добавлением ингибиторов протеаз (Pierce) и инкубировали 30 минут при постоянном покачивании. Для получения гомогенного лизата проводили центрифугирование при 12000 g в течение 10 минут при 4°С, после которого отбирали супернатант. Для нанесения одинаковой массы белка на дорожку геля в полученных образцах измеряли концентрацию белка при помощи коммерческого набора с бицинхониновой кислотой (BCA Assay, Pierce), используя в качестве контроля бычий сывороточный альбумин (BSA) (Pierce). Денатурацию образцов проводили в буфере Лэммли с β-меркаптоэтанолом при 99 °С в течение 5 минут.

Разделение белков по молекулярной массе осуществляли в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS по методу Лэммли [224]. Градиентные гели для разделения белков липопротеидов делали по

протоколу, изложенному в [225]. Для анализа белкового состава клеточного лизата использовали 7,5% разделяющий ПААГ. Для электрофореза использовали Tris-HCl буфер, реактивы и оборудование Bio-Rad. После выхода фронта красителя и разделения маркерных белков производили перенос на активированную этанолом PVDF мембрану (GE Healthcare) методом влажного переноса в течение 2 часов при 350 мА при 4°C, используя оборудование Bio-Rad. Блокирование неспецифического связывания на мембране проводили 5% обезжиренным молоком на PBS с 0,05% Tween 20 (Pierce) в течении ночи при 4°C. В работе использовали первичные кроличьи антитела против Т-кадгерина (ProSci), адипонектина (любезно предоставленные проф., д.б.н. А.Г. Катрухой, [226]) β -актин (CellSignaling) и вторичные антитела против кроличьих IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (R&D или ИМТЕК). Инкубации с антителами проводили в течении часа и после которых мембрану троекратно отмывали в PBS с 0,05% Tween 20. Для визуализации белков интереса на мембране использовали субстраты для усиленной хемилюминесценции (ECL Pico или Dura, Pierce). Свечение регистрировали при помощи плёнки для рентгенограмм (Kodak) с последующей проявкой или на приборе ChemiDoc (Bio-Rad). Для анализа изображений использовали Quantity One или Image Lab (Bio-Rad).

2.3. Выделение липопротеидов низкой плотности, определение их чистоты и степени окисленности, введение в них флуоресцентной метки

Для получения липопротеидов низкой плотности был использован метод препаративного ультрацентрифугирования, который остаётся «золотым стандартом» среди всех методов выделения липопротеидов благодаря высокой эффективности их разделения по плотности [227]. Принципы метода описаны в [228, 229]. Плазма была получена сразу после забора крови в результате двух последовательных центрифугирований 2000 g (центрифуга 5804R, Eppendorf) в течении 20 минут при 16 °C крови с 4 мМ ЭДТА*Na₂ (Диа-М), полученной от здоровых добровольцев в возрасте 25-35

лет. Для создания необходимой плотности растворов с плазмой использовали растворы, содержащие 0,196 М NaCl (Диа-М), 0,01% Na₂EDTA (Диа-М), 0,05% NaN₃ (Диа-М), pH=7,4 и соли NaBr. Плотность растворов солей проверяли по показателю преломления на рефрактометре ИРФ-454Б2М (КОМЗ). Создавая ступенчатый градиент и последовательно центрифугируя на ультрацентрифуге Optima L-100XP (Beckman Coulter) при 80000 об/мин (546883 g ротор 90Ti) 3,5 часа, а затем 15 часов при 16°C, были выделены ЛНП с плотностью 1,019–1,063 г/мл. ЛНП хранили не более трёх недель до эксперимента при 4°C. Перед экспериментом проводили диализ против 0,15 М NaCl в течение 18 часов при 4°C и стерилизовали пропусканием через фильтры 0,22 мкм. В некоторых случаях ЛНП концентрировали при помощи центрифужных фильтров Amicon Ultra-4 Ultracell 50 K (Millipore).

Концентрацию ЛНП измеряли по белку методом Лоури [230], готовя реактивы согласно статье или используя набор Modified Lowry Protein Assay (Thermo Scientific). Анализ результатов проводили при помощи программы Prism (GraphPad). Чистоту ЛНП оценивали по содержанию примесных белков в градиентном полиакриламидном геле 5-20% (20 на 20 см) в присутствии SDS с последующим окрашиванием Coomassie brilliant blue R250 (рис. 2.1, А). Также было дополнительно оценено наличие в примесях ЛНП Т-кадгерина и адипонектина при помощи иммуноблотинга (рис 2.1 Б).

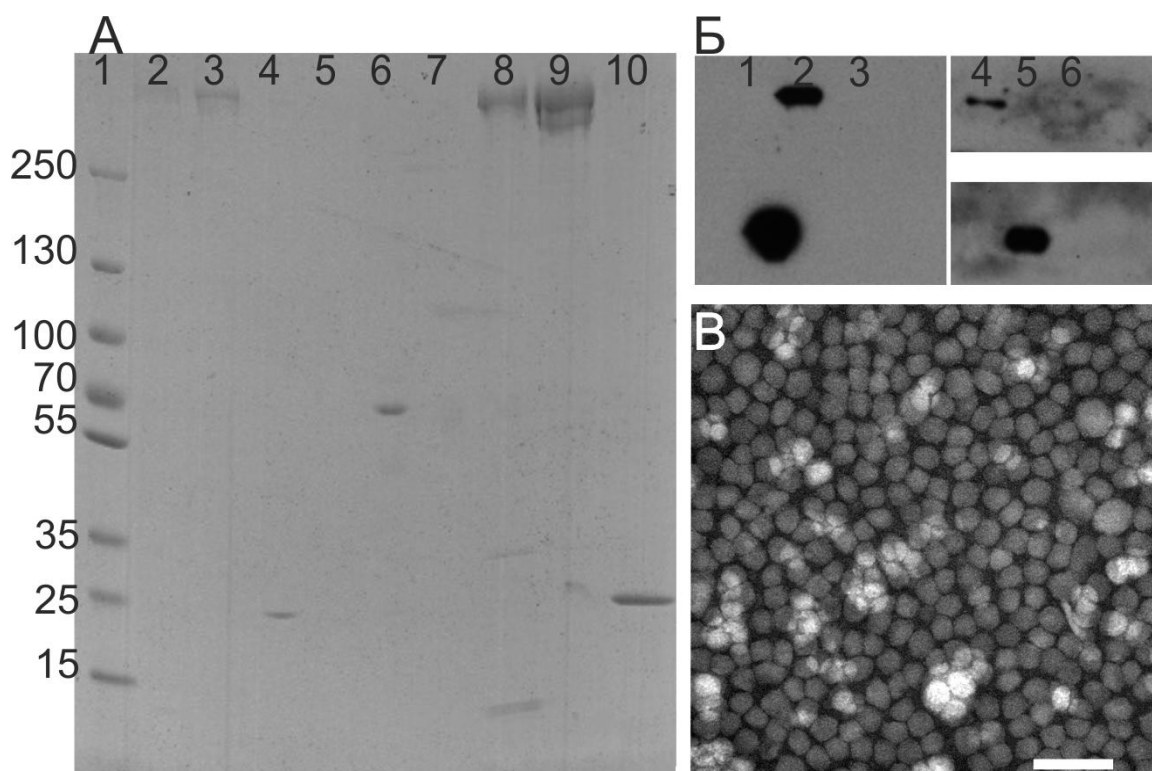


Рисунок 2.1. Характеристика выделенных липопротеидов. А. В градиентном полиакриламидном геле. Дорожки: 1 – маркеры молекулярного веса белков (Fermentas), числа слева кДа, 2 – 0,5 мкг ЛОНП, 3 – 0,5 мкг ЛНП, 4 – 0,5 мкг ЛВП, 6 – неочищенный образец плазмы, 5 и 7 – контрольные дорожки с буфером для образцов, 8 – 4 мкг ЛОНП, 9 – 4 мкг ЛНП, 10 – 4 мкг ЛВП. Б. Два иммуноблота: верхняя часть покрашена антителами против Т-кадгерина, нижняя – против адипонектина, дорожка 1 – 250 нг рекомбинантного адипонектина, 2 – 250нг рекомбинантного Т-кадгерина, 3 – 50 мкг ЛНП, 4 – 10 нг Т-кадгерина, 5 – 10 нг адипонектина, 6 – 120 мкг ЛНП. В. Электронная микрофотография ЛНП, масштабный отрезок 100 нм (сделана к.ф.-м.н. Д. Багровым, МГУ, биологический факультет).

Как и ожидалось, в образцах с ЛОНП детектировался белок апоВ 100 (512кДа), апоЕ (34 кДа), и более лёгкие Апо С1-С3 (7,5-9 кДа), ЛНП – АпоВ 512 кДа, ЛВП – АпоА1 (28кДа), основная масса белка плазмы представлена альбумином (65 кДа) (рис. 2.1, А). Образцы ЛНП не содержали детектируемого количества примесей Т-кадгерина и адипонектина, что согласуется с масс-спектрометрическими данными [231] (рис. 2.1, Б). Размеры выделенных частиц ЛНП также соответствовали литературным данным – приблизительно 20-40 нм (рис. 2.1, В).

Степень окисленности ЛНП определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой, которая реагирует с малоновым диальдегидом (продуктом

окислительной деградации липидов) с образованием продукта с максимумом поглощения при 532 нм. Реакцию проводили согласно рекомендации производителя, используя TBARS Assay (R&D Systems, Inc.). Анализ не показал значимого окисления: не более 0,03 нмоль/мг продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Таким образом, выделенные ЛНП обладали высокой чистотой и соответствовали нативным неокисленным ЛНП.

Для введения флуоресцентной метки в ЛНП использовали набор для ковалентного сшивания первичных аминогрупп и родаминовой метки NHS-Rhodamine Antibody Labeling Kit (Pierce).

2.4. Создание плазмидных конструкций с химерами Т-кадгерина

Среди множества флуоресцентных белков для создания химеры Т-кадгерина был выбран желтый флуоресцентный белок (yellow fluorescent protein, YFP), которого отличает относительно высокая яркость, фотостабильность, а также узкий спектр поглощения и испускания, что является важным преимуществом при наблюдении клеток с помощью флуоресцентных методов. Для создания химерного белка T-cad-YFP использовали три плазмиды: pIRESneo1-T-cad с последовательностью Т-кадгерина человека, полученную в нашей лаборатории ранее, pBlueScriptSK+ (Stratagene Cloning Systems) и pTagYFP-N (Евроген) (рис.2.2). Дизайн рекомбинантных конструкций проводили при помощи программы Vector NTI (Invitrogen). С N- и С-конца незрелого Т-кадгерина располагаются пептиды, которые впоследствии отщепляются, поэтому место вставки гена YFP было выбрано в районе 675 аминокислоты на необходимом удалении от сайта присоединения ГФИ-якоря для обеспечения корректной работы трансамидазы.

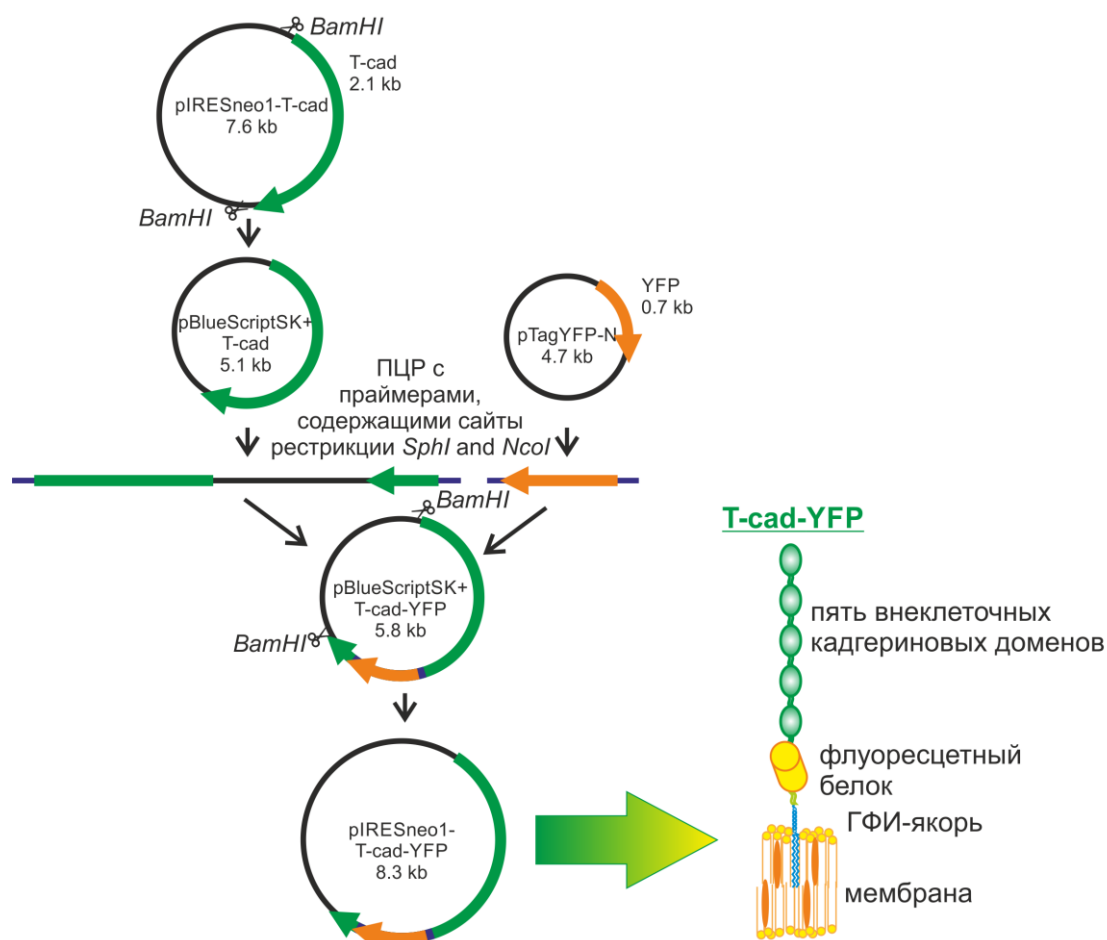


Рисунок 2.2. Схема стадий молекулярного клонирования T-cad-YFP.

В работе использовали праймеры (Evrogen) с рестрикционными сайтами и последовательностями линкерных аминокислот:

R-NcoI-T-cad 5'-GATCTCCATGGAGATCTGTGATATTCGTCATGG-3',

F-SphI-T-cad 5'-GCATGTGCATGCCAGGGTACAAGTGTGCTC-3',

F-NcoI-YFP 5'-CTGTCACCATGGAGTTAGCAAAGGCGAGGAG-3',

R-SphI-YFP 5'-GTATATGCATGCTCGCGGTACAGCTCGTCCAT-3'.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с соответствующими праймерами и полимеразой Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) была проведена согласно протоколу производителя. Амплифицированные фрагменты были разделены в агарозном геле и выделены из него при помощи набора GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas). ПЦР-фрагменты были гидролизованы соответствующими рестриктазами (Fermentas) и встроены в pIRESneo1. Нуклеотидная последовательность полученной плазмиды

pIRESneo1-T-cad-YFP была подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием химерного гена (Evrogen).

Для создания второй химерной конструкции T-cad-TFP с белком TFP использовали плазмиду pmTFP1-N (Allele Biotechnology). Флуоресцентный белок mTFP1 (далее TFP) был выбран в качестве донора для FRET пары как мономерный циановый фотостабильный белок с высоким коэффициентом экстинкции и квантовым выходом [232]. Две части последовательности белка TFP были амплифицированы при помощи праймеров:

F-NcoI-mTFP1 5'-CTGTCACCATGGAGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'

R-HinfI-mTFP1 5'-TCCATGGAGGAGGACTCCTTCAG-3'

F-HinfI-mTFP1 5'-GAGGAGGACTCCTTCATCTACGA-3'

R-SphI-mTFP1 5'-

GTATATGCATGCTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'

Полученные последовательности лигировали при помощи T4 ДНК-лигазы (Fermentas) в плазмиду pBlueScriptSK+, а после клонированы по сайтам BamHI в pIRESneo1. Правильность последовательности химерной конструкции T-cad-TFP была проверена секвенированием.

Помимо конструкций, кодирующих химеры Т-кадгерина с флуоресцентными белками, была создана конструкция, кодирующая Т-кадгерин с S6 пептидом [233]. Место вставки было выбрано между продоменом и первым доменом (рис. 1.1, PP и EC1), а между вставкой и Т-кадгерином были линкеры размером в одну аминокислоту: Ser139-G-GDSLWLLRLLN-S-Ile140, что соответствовало нуклеотидной последовательности

GGTGGCGATAGCTTAAGCTGGCTGCTGCGTCTGTTGAACAGC.

Клонирование было произведено по сайтам BstAUI (внутри гена) и NdeI (в CMV промоторе) фирмой Евrogen, в результате чего была получена плаزمид pIRESneo1-T-cad-S6.

Полученные молекулярно-генетические конструкции использовали при трансформации компетентных клеток E.coli (Евrogen) по методу теплового

шока, который описан в [234]. Выросшие на твердой селективной среде с антибиотиком наращивали в LB с ампицилином в течение ночи и выделяли из них плазмидные ДНК по протоколу производителя набора GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas).

2.5. Трансфекция эукариотических клеток и селекция клонов

Для синтеза в клетках нативного Т-кадгерина или химерных белков проводили трансфекцию соответствующими плазмидами с использованием трансфицирующего реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Клетки, синтезирующие Т-кадгерин с флуоресцентным белком, отбирали путем фотоактивированной сортировки при помощи сортера FACS Aria III (BD Biosciences). В течение месяца в результате 4 последовательных сортировок были получены клоны, стабильно синтезирующие химерные белки [235]. В других случаях для выведения стабильной линии использовали селекцию на селективном антибиотике G418(Gibco).

2.6. Иммунофлуоресцентное окрашивание гладкомышечных клеток

Для подтверждения фенотипа культивируемых ГМК и определения локализации на них Т-кадгерина было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание. Для этого ГМК высаживали на 8-луночные планшеты с покровными стеклами Lab-Tek (Nunc) за сутки до окрашивания. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma-Aldrich), приготовленным на PBS (HyClone или Эко сервис), в течение 10 минут при комнатной температуре, затем для блокировки свободного альдегида инкубировали в растворе 50 mM NH_4Cl ещё 10 минут и отмывали PBS. Далее фиксированные клетки пермеабелизовали раствором 0,25% Triton X-100. В качестве блокировочного раствора использовали 1% БСА (Sigma-Aldrich) на DPBS (Панэко). На основе этого раствора был приготовлен раствор с первичными антителами против альфа-гладкомышечного актина (Abcam) и биотинилированными антителами против Т-кадгерина (R&D), а также

контрольный раствор с изотипическим контролем IgG (Dako) и биотинилированным контрольным Ig (R&D). После часовой инкубации клетки дважды отмывали от избытка антител и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa633 (Invitrogen) и стрептавидином конъюгированным с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) (BD). Избыток антител и стрептавидина дважды отмывали. Для визуализации ядер фиксированные клетки инкубировали в растворе с Hoechst 33342 (Pierce) в течение 10 минут и отмывали избыток красителя. Получившиеся образцы анализировали при помощи лазерной сканирующей микроскопии в тот же день.

2.7 Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Локализацию флуоресцентных красителей и белков внутри клеток определяли при помощи лазерных сканирующих конфокальных микроскопов TCS SP5 (Leica) и LSM 780 (Zeiss), оснащенных диодными, аргоновыми и гелий-неоновыми лазерами. Клетки за день до измерений высаживали в 8-луночный планшет Lab-Tek (Nunc).

Для визуализации комплекса антител против альфа-гладкомышечного актина и меченных Alexa633 антител использовали возбуждение лазерным излучением с длиной волны 633 нм, для визуализации комплекса с антитела против Т-кадгерина с меченным FITC биотином – возбуждение 488 нм, для визуализации Hoechst 33342 – возбуждение 405 нм.

Живые клетки HEK293 помещали в раствор Хенкса без фенолового красного (ПанЭко) для сканирования или предварительно окрашивали красителем ЭПР ER-Tracker Red dye (Invitrogen) по протоколу производителя. Для возбуждения флуоресценции YFP использовали лазерное излучение с длиной волны 514 нм, для TFP – 458 нм, для ER-Tracker Red – 543 нм. В ряде экспериментов использовали меченные аллофикоцианином (APC) антитела против Т-кадгерина (R&D), которые возбуждали лазером с длиной волны 633 нм. Для возбуждения флуоресценции красителей, которыми метили химерный Т-кадгерин с S6 пептидом, использовали лазеры

с длиной волны 561 нм для DY-547 (Dyomics) и 633 нм для DY-647P1 (Dyomics).

Параметры детекции в экспериментах подбирались при сравнении с контрольными образцами. Обработка изображений проводилась в программах ImageJ (NIH) или Zen 2010 (Zeiss).

2.8. Измерение внутриклеточного кальция в одиночных клетках

Для детекции изменения концентрации $[Ca^{2+}]_{in}$ внутри клеток использовали роботизированную систему Pathway 855 high-content bioimager (BD) или инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon Ti, которые были оснащены металлогалогеновыми лампами PhotoFluor II (89 North) или ксеноновой лампой Lambda DG-4 (Sutter Instrument) соответственно и необходимыми для регистрации флуоресценции зонда Fura-2 фильтрами. За двое суток до эксперимента клетки HEK293 высаживали в планшеты (по 10 тысяч в лунку 96-луночного планшета или 20 тысяч в лунку 48-луночного планшета), дно которого покрывали тонким слоем коллагена согласно протоколу производителя BD или GIBCO для увеличения адгезии. ГМК высаживали на планшеты без покрытия и в более низкой концентрации, поскольку сами клетки крупнее HEK293 и обладают высокой адгезией. Клетки инкубировали в течение ночи в бессывороточной среде перед съёмкой, а затем в течение часа инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в растворе Хенкса с кальциевым индикатором Fura-2AM в присутствии раствора для усиления сигнала из набора Ratiometric Calcium Assay (BD). После этого клетки инкубировали дополнительные 20 минут при комнатной температуре и при ней же проводили измерения. Флуоресценцию возбуждали каждые 10 секунд длинами волн 340 и 380 нм и детектировали интенсивность испускания около 510 нм, получая серию микроскопических изображений. Изменение $[Ca^{2+}]_{in}$ во времени регистрировали при помощи программ AttoVision (BD) и NIS-Elements (Nikon), последующую обработку проводили единообразно при помощи ImageJ (NIH).

При помощи последовательного применения функций Threshold, Watershed и Analyze Particles в программе ImageJ на первом изображении в одном из каналов определяли области интереса (ROI), которые соответствовали отдельным клеткам и иногда малым группам трудно различимых между собой клеток (рис. 2.3). После вычитания фона для каждой клетки (ROI) измеряли медиану интенсивности при возбуждении 340 и 380 нм (F_{340} и F_{380} , соответственно). Как известно, отношение F_{340}/F_{380} зонда Fura-2 зависит от $[Ca^{2+}]_{in}$ [236]. Для анализа изменений $[Ca^{2+}]_{in}$ мы использовали значение F_{340}/F_{380} , для этого обе таблицы полученных значений переносили в Excel (Microsoft) и рассчитывали отношение F_{340}/F_{380} в каждой временной точке (рис.2.3 В).

В качестве контрольных клеток в работе использовали немодифицированные клетки (дикого типа) НЕК293 или клетки, трансфицированные контрольной плазмидой, по связыванию и кальциевой сигнализации эти клетки не отличались согласно работам наших коллег и нашим данным [17]. Клоны клеток с гиперэкспрессией Т-кадгерина были получены в нашей лаборатории ранее [12]. Время роста и спада сигнала было схожим у клеток НЕК293 дикого типа и НЕК293, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, однако средняя амплитуда ответа значительно отличалась, что подтверждает результаты работы Рубиной с коллегами [12] и корректность наших измерений (рис.2.3 В). По этой причине для характеристики $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа в настоящей работе использовали амплитуду, которая была рассчитана как максимальное значение за вычетом среднего базового значения до добавления агониста.

В некоторых экспериментах проводили калибровку флуоресцентного сигнала Fura-2 для его перевода в единицы концентрации $[Ca^{2+}]_{in}$. Для этого детектировали флуоресцентный сигнал в присутствии иономицина (Invitrogen) с $CaCl_2$ или ЭГТА и рассчитывали концентрацию согласно формуле, описанной в работе Grynkiewicz с коллегами [236]. Амплитуда $[Ca^{2+}]_{in}$ ответов на ЛНП составляла несколько сотен нМ, как и в работах наших

коллег [12, 109]. Однако в в настоящей работе сравнивали относительное изменения амплитуд ответов клеток в одних и тех же экспериментальных условия, поэтому далее приведены только значения $\Delta F_{340}/F_{380}$.

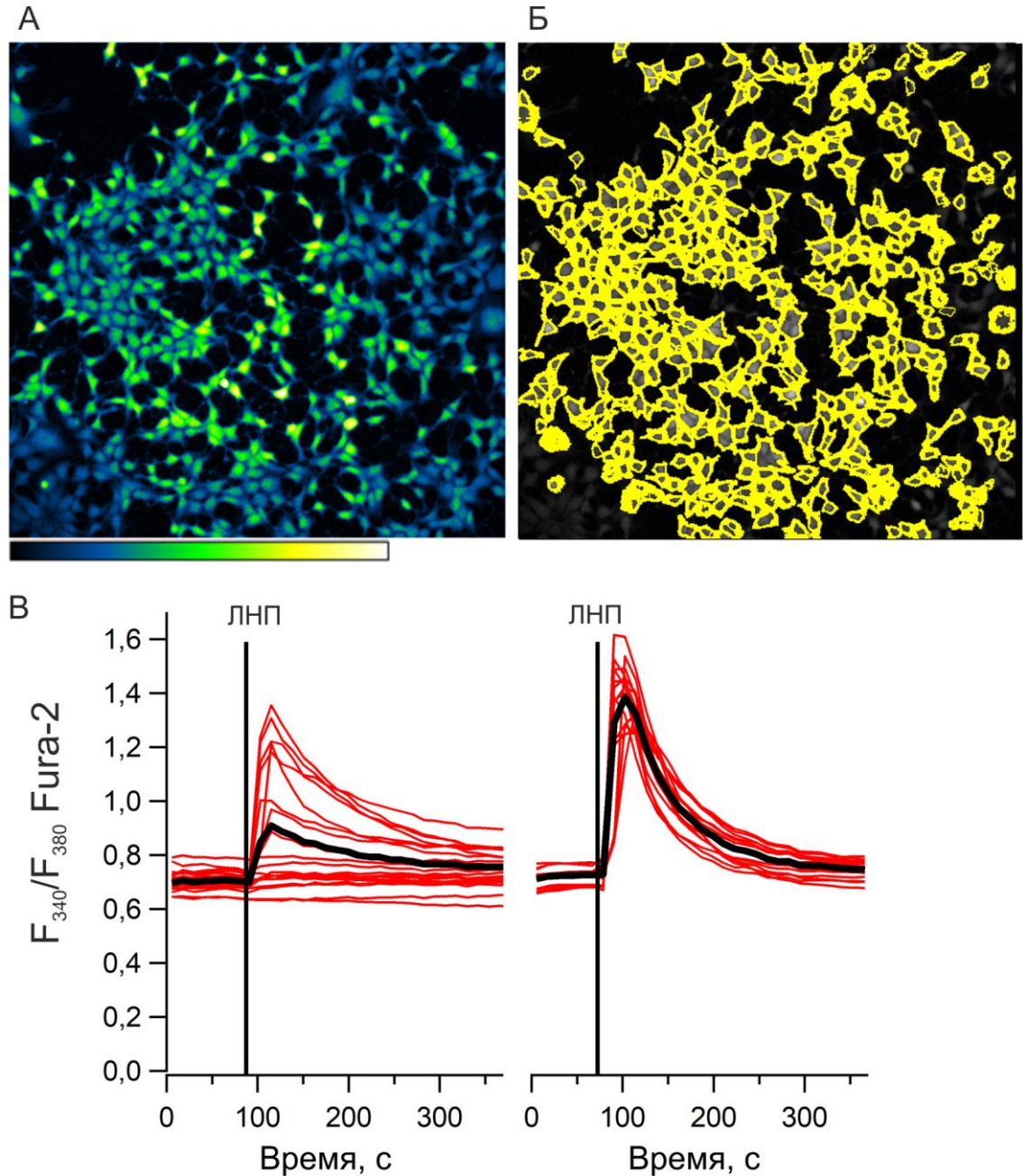


Рисунок 2.3. Получение значений амплитуды $[Ca^{2+}]_{in}$ в одиночных клетках. А. Флуоресцентное изображение клеток НЕК293 после введения кальциевого зонда Fura-2. Шкала отображает интенсивность флуоресценции, которая обозначена цветами. Б. Выделенные области интереса (ROI) в ImageJ соответствуют отдельным клеткам. В. Временная зависимость сигнала F_{340}/F_{380} при добавлении ЛНП в клетках дикого типа (слева) и клетках, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (справа).

2.9. Проточная цитометрия

Для выявления Т-кадгерина на клеточной мембране использовали проточный цитометр FACSCanto II (BD Biosciences). После деадгезии клеток НЕК293 раствором Версена к ним добавляли 1% раствор БСА на DPBS и центрифугировали при 200g в течение 5 минут. Ресуспендировали клетки в 1% растворе БСА на DPBS и каждый тип клеток делили на две части по 30 тысяч, после чего инкубировали с APC-меченными моноклональными антителами против Т-кадгерина или APC-меченным изотипическим контролем той же фирмы (R&D) в количестве 10 мкл/млн. клеток в течение 30-60 минут в темноте при комнатной температуре. После двукратной отмывки от избытка антител клетки ресуспендировали в 300 мкл 1% БСА на DPBS и проводили измерение на проточном цитометре. Анализ данных проводили при помощи программы FlowJo (Tree Star).

2.10. Измерение связывания флуоресцентно-меченных ЛНП с Т-кадгерином на живых клетках при помощи проточной цитометрии

Для определения константы диссоциации Т-кадгерина и ЛНП на мембране живых клеток использовался метод проточной цитометрии с флуоресцентно-мечеными родамином ЛНП [235]. Клетки НЕК293 культивировали до монослоя, затем проводили деадгезию раствором Версена и осаждали при 200g 5 мин. Осадок растворяли в растворе Хенкса с 0,1% БСА и разделяли на равные части по 1000-3000 клеток в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки (Eppendorf), содержащие флуоресцентно меченные ЛНП и/или избыток (2000 мкг/мл) немеченных ЛНП. Клетки с ЛНП инкубировали 4 часа при 4°C в объеме 50 мкл. Затем объем доводили до 1,5 мл холодным раствором Хенкса и центрифугировали при 300g и 4°C 5 мин. Супернатант отбирали, а клетки суспендировали в 100 мкл холодного раствора Хенкса перед измерением. Измерение связавшегося с поверхностью клетки ЛНП-родамина производили на проточном цитометре FACS-LSR Fortessa (BD Biosciences) при комнатной температуре в течение 1-2 минут.

Флуоресценцию родамина детектировали в канале 585/15 нм при возбуждении лазером с длиной волны 561 нм.

При анализе данных проточной цитометрии в рассмотрение брали только события, попадающие в область клеток с нормальной морфологией, выделенную на основе прямого и бокового рассеяния. В клоне, продуцирующем Т-кад-YFP, была выбрана дополнительная область клеток, положительных по флуоресценции YFP, позволяющая избавиться от неспецифических примесей. Образование лиганд-рецепторного комплекса оценивалось по медиане интенсивности флуоресценции меченого лиганда.

2.11. Введение флуоресцентной метки в Т-кадгерине на поверхности мембраны

В работе было Zhou с коллегами [233] были найдены короткие пептиды размером 12 аминокислотных остатков, которые являются специфическим субстратом для ферментов фосфопропантеинил трансфераз. Наименьшей константой Михаэлиса в реакции (рис.2.4) с биотин-CoA обладала пара S6 пептид и Sfp синтаза (другое название фосфопропантеинил трансферазы из *Bacillus subtilis*), которая и была использована в данной работе.

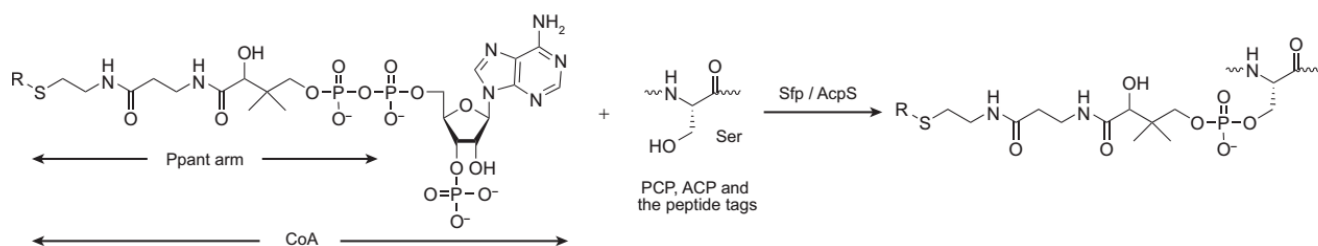


Рисунок 2.4. Реакция мечения серина S6-пептида. Фермент Sfp или AcpS катализирует конъюгацию модифицированного CoA (с флуоресцентным красителем или биотином R) с определённым серином в белках PCP, ACP или их пептидах [233].

При помощи молекулярно-генетических методов была получена плаزمид, кодирующая последовательность T-cad-S6 как было описано выше (п. 2.4). После трансфекции клеток НЕК293 при помощи Lipofectamine 2000 и культивировании на селективном антибиотике G418 (Gibco) были получены стабильные линии (рис. 2.5 (1), (2)).

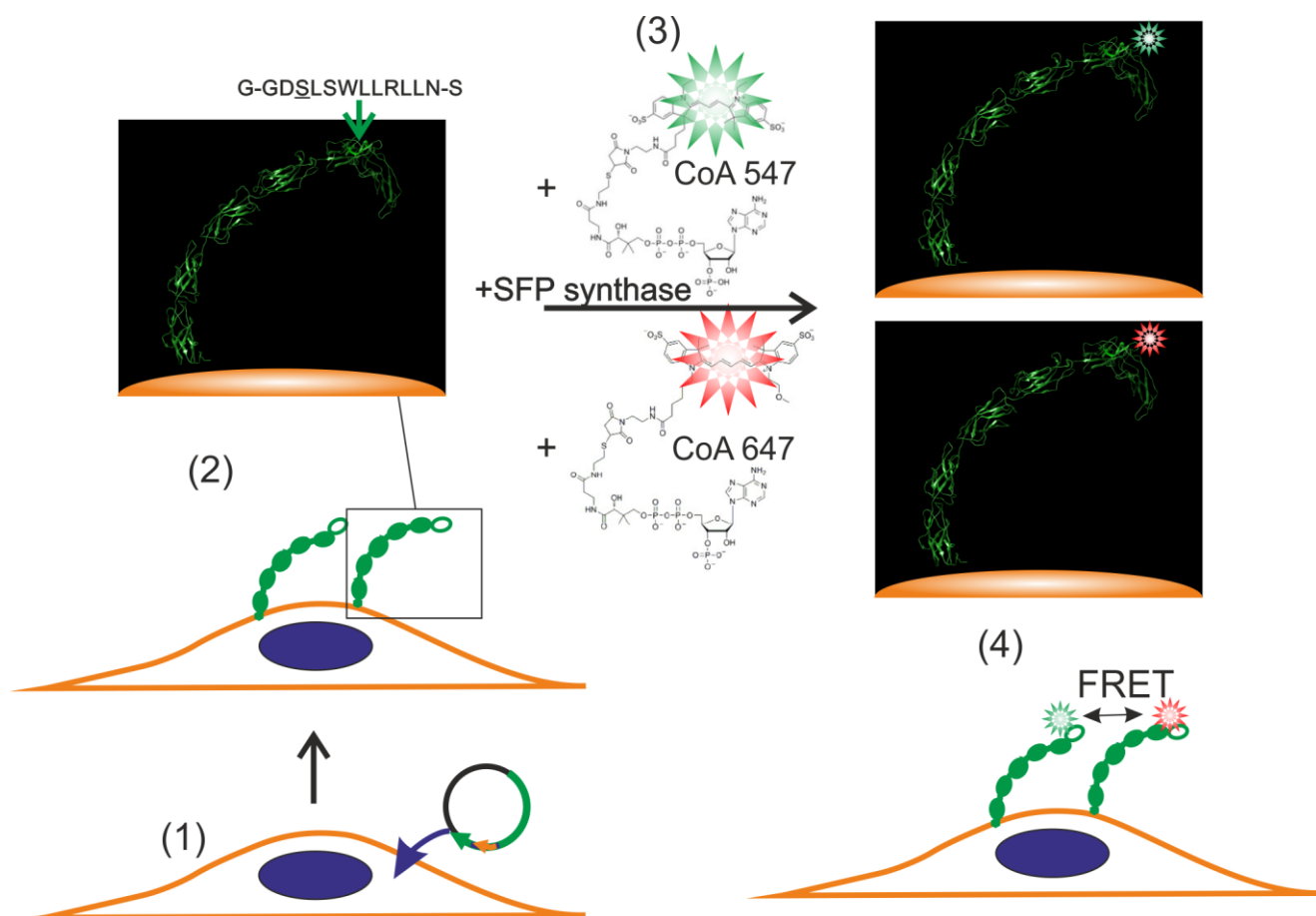


Рисунок 2.5. Схема эксперимента по введению флуоресцентной метки в Т-кадгерин на поверхности мембраны. (1) Плазмиду, кодирующую Т-кадгерин с S6 пептидом, вводили в клетки. (2) На поверхности трансфицированных клеток экспонировался Т-кадгерин, имеющий в своей последовательности S6 пептид. (3) Добавление флуоресцентно-меченных субстратов CoA547 и CoA647 и фермента SFP-синтазы приводило к ковалентной сшивке субстратов с белком.

Мечение проводили при помощи ферментативной реакции с 1 мкМ SFP-синтазы (NEB) и субстратами: 0,5 мМ CoA547 (NEB) или/и 0,5 мМ CoA647 (NEB) в растворе DPBS с 0,5% БСА и 10 мМ $MgCl_2$ при комнатной температуре в течение 40 минут. Трижды отмывали от избытка красителей и фермента в растворе DPBS с 0,5% БСА, после чего анализировали флуоресценцию клеток на конфокальном микроскопе или проточном цитометре.

2.12. Измерения FRET при помощи конфокальной микроскопии

Измерения и анализ FRET проводились на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 (Zeiss) при помощи программы Zen 2010

(Zeiss). Для измерения эффективности FRET использовали метод обесцвечивания акцептора. Клетки, синтезирующие T-cad-S6, были высажены на планшете Lab-Tek (Nunc) за сутки и помечены A547 и A647 за 40 минут до измерения как описано выше. Измерения проводили с использованием объектива Plan-Apochromat 63x с числовой апертурой 1.40. На микрофотографии выбирали область интереса, в которой детектировали интенсивность флуоресценции при возбуждении лазером длиной волны 561 нм в канале донора A547 (569-630 нм). После четвёртого сканирования проводили полное фотообесцвечивание акцептора при помощи лазера 633 нм в течение минуты. Затем снова детектировали флуоресценцию в канале донора, учитывали фоновую флуоресценцию и рассчитывали эффективность FRET в выделенной области:

$$\text{FRET eff} = (I_{\text{post}} - I_{\text{pre}}) / I_{\text{post}} \cdot 100\%, \quad (2.1)$$

где I_{post} - интенсивность флуоресценции донора после фотообесцвечивания акцептора, а I_{pre} - интенсивность флуоресценции донора до фотообесцвечивания.

Для наблюдения кинетических изменений FRET использовали метод стимулированной эмиссии акцептора, при котором производили непрерывную детекцию в трёх каналах: канал донора (возбуждение 561 нм, детекция эмиссии 570-613 нм), канал акцептора (возбуждение 633 нм, детекция эмиссии 665-691), канал FRET (возбуждение 561 нм, детекция эмиссии 665-691 нм) с использованием того же объектива 63x. Размер изображения 135 мкм*135 мкм, количество точек 512*512. Этот метод успешно применялся нами для прижизненного наблюдения за лиганд-зависимой димеризацией химер эфринового рецептора EphA2-CFP и EphA2-YFP [237]. Эфриновые рецепторы A2 являются представителями тирозиновых киназ, которые димеризуются и фосфорилируются после связывания с эфрином A3. Нам удалось измерить увеличение FRET в течение 5 минут, после которого шло его уменьшение до начального уровня в течение 20-25 минут. Метод стимулированной эмиссии акцептора требует

учёта поправок после измерения, поскольку в канал FRET может попадать флуоресценция от донора и акцептора не связанная с резонансным переносом энергии, и в каналах донора и акцептора может быть суперпозиция нескольких сигналов. Множество работ посвящено способам коррекции сигнала FRET: предложены разные показатели FRET, которые учитывают экспериментальные особенности (количественный анализ ряда показателей FRET провели Berney и Danuser [238]). Gordon с коллегами предложили показатель FRET_N и ввели обозначения [239], которые использовались в настоящей работе:

Таблица 2.1. Двухбуквенные обозначения и их значение (подробнее в [239]).

Обозначения	Фильтр/канал	Присутствующий флуорохром	Значение
Dd	Донор	Донор	Сигнал в канале донора в присутствии только донора
Fd	FRET	Донор	Сигнал в канале FRET в присутствии только донора
Ad	Акцептор	Донор	Сигнал в канале акцептора в присутствии только донора
Da	Донор	Акцептор	Сигнал в канале донора в присутствии только акцептора
Fa	FRET	Акцептор	Сигнал в канале FRET в присутствии только акцептора
Aa	Акцептор	Акцептор	Сигнал в канале акцептора в присутствии только акцептора
Ff	FRET	Донор и акцептор	Сигнал в канале FRET в присутствии донора и акцептора

$$\text{FRET}_N = \frac{Ff - [\text{Donor corr.}] - [\text{Acc. corr.}]}{G \cdot Fd \cdot Fa}, \quad (2.2)$$

где Donor corr. и Acc. corr. – вычитаемые сигналы донора и акцептора в канал FRET, связанные с непосредственным возбуждением донора или акцептора, а не с переносом энергии, G – фактор, связанный с уменьшением

эмиссии в результате FRET в канале донора, которая ведёт к возрастанию эмиссии акцептора в результате FRET, учитывающий аппаратные особенности.

В программе Zen2010 (опция FRET) рассчитываются показатели FRET_N и F_c (равный знаменателю выражения(2.1)), предложенный в [240]), и NFRET, предложенный в работе Xia и Liu [241], который корректно характеризует расстояние между флуорохромами независимо от концентраций акцептора и донора в отличие от FRET_N и F_c.

$$\text{NFRET} = \frac{F_f - [\text{Donor corr.}] - [\text{Acc. corr.}]}{\sqrt{G \cdot F_d \cdot F_a}} \quad (2.3)$$

Анализ наших данных также показал меньший разброс значений NFRET по сравнению с FRET_N и лучшее соответствие временной зависимости показателя FRET, измеренной независимым способом, поэтому в работе использовался именно этот показатель.

Для получения значений фоновой флуоресценции, соотношения коэффициентов компенсации и расчёта NFRET проводили контрольные измерения в трёх каналах с образцами, содержащими только донор и только акцептор (рис. 2.6). Затем была построена временная зависимость усреднённого по всей микрофотографии (размером 512*512 точек) показателя NFRET, который отражал только белки, находящиеся на мембране, благодаря особенностям нашего метода мечения. Несмотря на оптимизацию интенсивности лазерного излучения и других параметров, наблюдалось небольшое фотообесцвечивание акцептора, которое учитывалось при помощи вычитания базовой линии (сигнала до добавления лиганда). Таким образом, был получен показатель ΔNFRET приведённый в результатах.

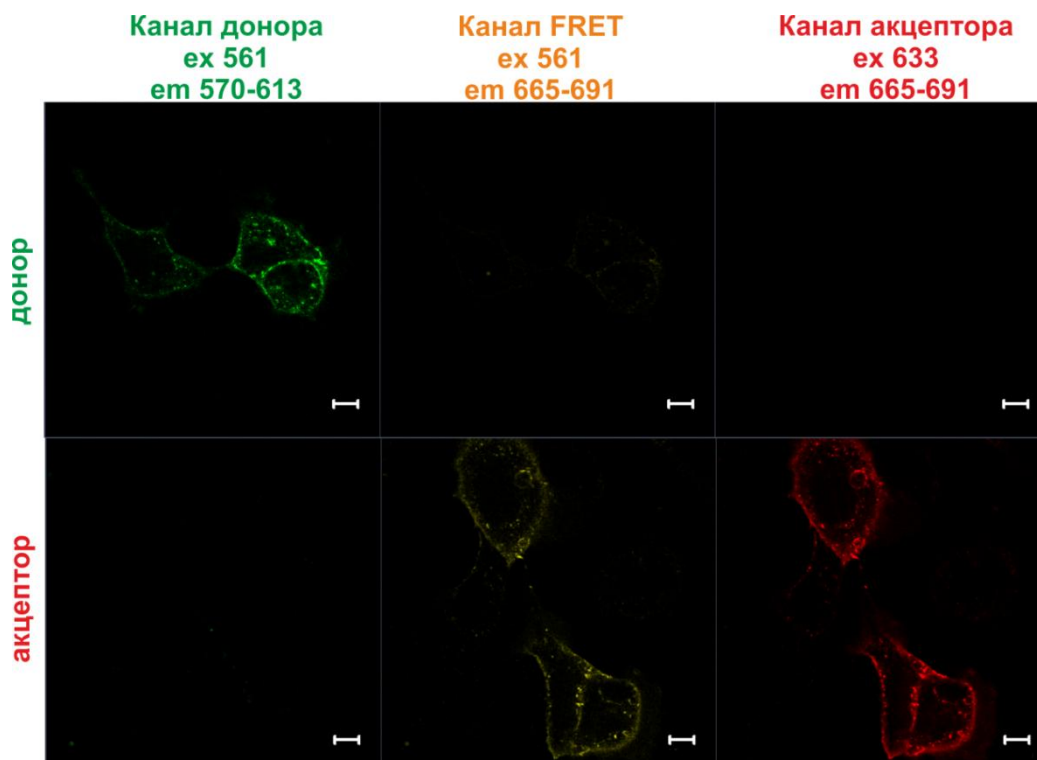


Рисунок 2.6. Интенсивность эмиссии в каналах донора, FRET и акцептора была проанализирована в контрольных образцах только с донором (верхний ряд) и только с акцептором (нижний ряд) для вычисления корректировочных коэффициентов. Масштабный отрезок равен 10 мкм.

2.13. Кинетические исследования FRET при помощи проточной цитометрии

Измерения временных зависимостей флуоресцентных сигналов при добавлении активирующих веществ методом проточной цитометрии были отработаны нами на проточном цитометре LSR Fortessa (BD Biosciences) в работе [242].

Для изучения димеризации Т-кадгерина по FRET использовали деадгезированные клетки HEK293 с T-cad-S6, флуоресцентно-меченные по описанной выше методике. Для анализа отбирали клетки, выделенные по прямому и боковому светорассеянию, что отражает размер и гранулярность клеток, соответственно (рис. 2.7, live).

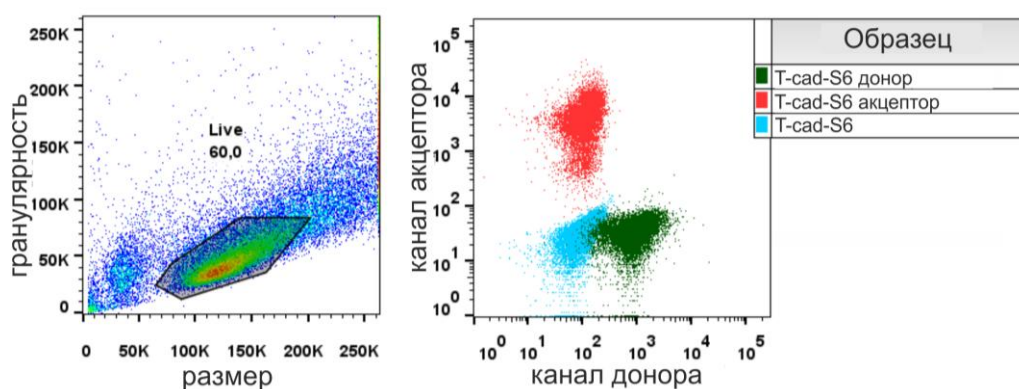


Рисунок 2.7. Анализ данных проточной цитометрии. Слева: живые клетки выделяли по их прямому (размер) и боковому (гранулярность) светорассеянию. Справа: выделенные таким образом контрольные неокрашенные клетки, клетки только с донорным красителем или только с акцепторным.

Для детекции FRET были выбраны следующие каналы: донора – возбуждение 561 нм, детекция эмиссии 585/15 нм, FRET – возбуждение 561 нм, детекция эмиссии 670/30 нм, акцептора – возбуждение 640 нм, детекция эмиссии 670/30 нм. Затем сигнал в канале FRET был скомпенсирован для учёта собственной эмиссии донора и акцептора в этот канал (рис. 2.8).

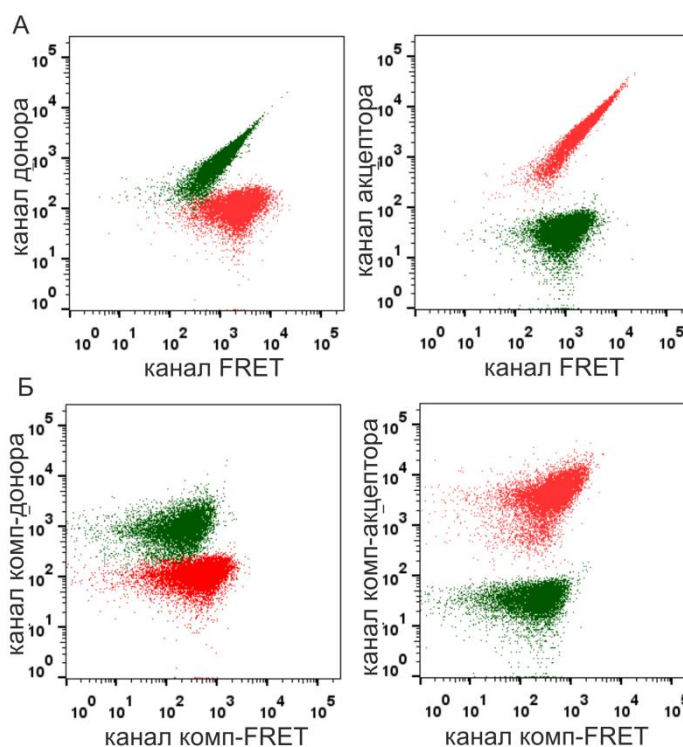


Рисунок 2.8. Корректировка сигнала в канале FRET. А. Измеренная интенсивность в каналах донора, FRET акцептора образцов только с донорным красителем (зелёный) или акцепторным красителем (красный). Б. Скомпенсированный сигнал тех же образцов.

2.14. Построение модельных кривых

Для описания кинетических экспериментальных данных в программе IgorPro были построены модельные экспоненциальные кривые вида $y_0 + A \cdot \exp(x \cdot \ln v \tau)$, откуда вычисляли характерное время экспоненты как обратное величине $\ln v \tau$.

2.15. Построение трёхмерных моделей структуры белков

Для анализа трёхмерных структур белков Т-кадгерина и генетически закодированных в плазмиды конструкций T-cad-YFP, T-cad-TFP, T-cad-S6 использовали биоинформатический сервис Phyre2 (the protein homology/analogy recognition engine 2) <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>. Детали алгоритма описаны в работах [243, 244]. В программу вводили первичную последовательность белков интереса и в результате сравнения с гомологами с известной структурой были получены 3D модели. Визуализацию проводили в программе Chimera [245].

2.16. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета статистических программ Statistica. Уровень значимости для всех проверяемых гипотез был принят как $p < 0,001$. Данные представлялись как среднее $\pm$ стандартная ошибка. Нормальность распределения исследуемых признаков проверялась при помощи критерия Шапиро-Уилка.

Сравнение нескольких выборок проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для апостериорного анализа применялся критерий достоверно значимой разности Тьюки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. 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 Т-кадгерин [10, 109]. Для настоящего исследования были выделены ГМК человека. Иммунофлуоресцентное окрашивание на специфический альфа-гладкомышечный актин подтвердило фенотип этих клеток. Дополнительная иммунофлуоресцентная окраска на Т-кадгерина показала его неоднородное распределение по мембране ГМК. Он оказался локализован в одной или нескольких ограниченных областях мембраны, предположительно рафтах, которые, как известно, занимают около 13% мембраны ГМК [246] (рис. 3.1). В пользу этого также говорят и литературные данные о фракционировании мембран ГМК, при котором Т-кадгерин обнаруживается в детергент-нерастворимых микродоменах совместно с кавеолином [69]. Однако, как уже обсуждалось в главе 1, этот биохимический метод не позволяет достаточно точно разделить разные типы рафтов.

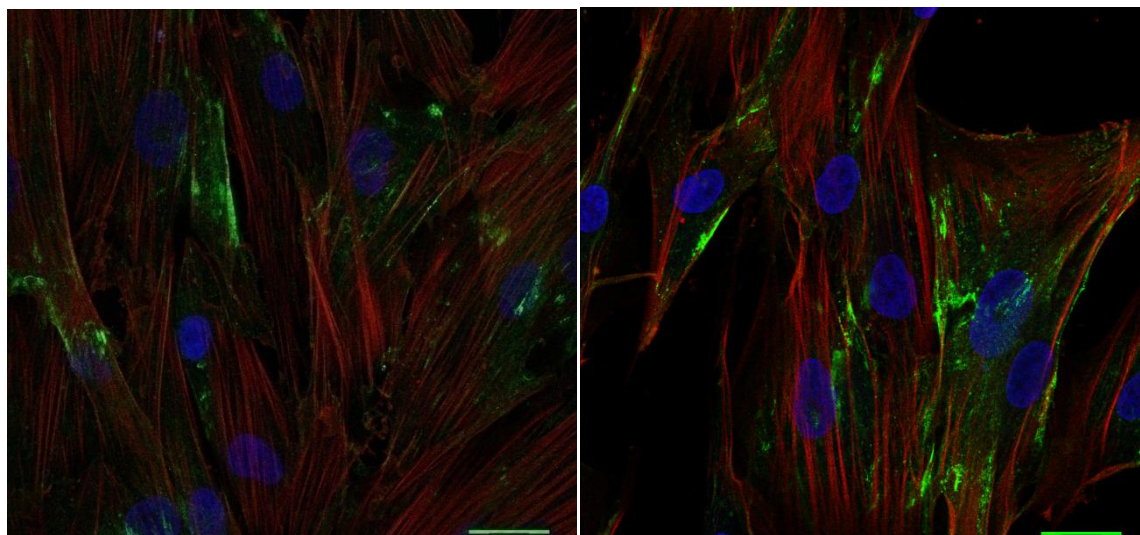


Рисунок 3.1. Иммунофлуоресцентный анализ распределения Т-кадгерина на поверхности ГМК с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Альфа-гладкомышечный актин – красный цвет; Т-кадгерин – зелёный цвет; ядра – синий цвет. Масштабный отрезок соответствует 30 мкм.

Для оценки отдельного и совместного действия двух лигандов (ЛНП и Адипо) на ГМК мы регистрировали динамику изменения внутриклеточного $[Ca^{2+}]_{in}$ при помощи флуоресцентного зонда Fura-2 в одиночных клетках. ЛНП, как и было описано ранее, вызвал выраженное увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ (рис. 3.2 А). Адипо, напротив, не вызывал увеличения $[Ca^{2+}]_{in}$ (рис. 3.2, Б). При совместном действии Адипо подавлял ЛНП-индуцируемую кальциевую сигнализацию (рис. 3.2 Б). Добавление среды (контроль), в которой растворяли лиганды, не изменяло $[Ca^{2+}]_{in}$ (рис. 3.2 Б).

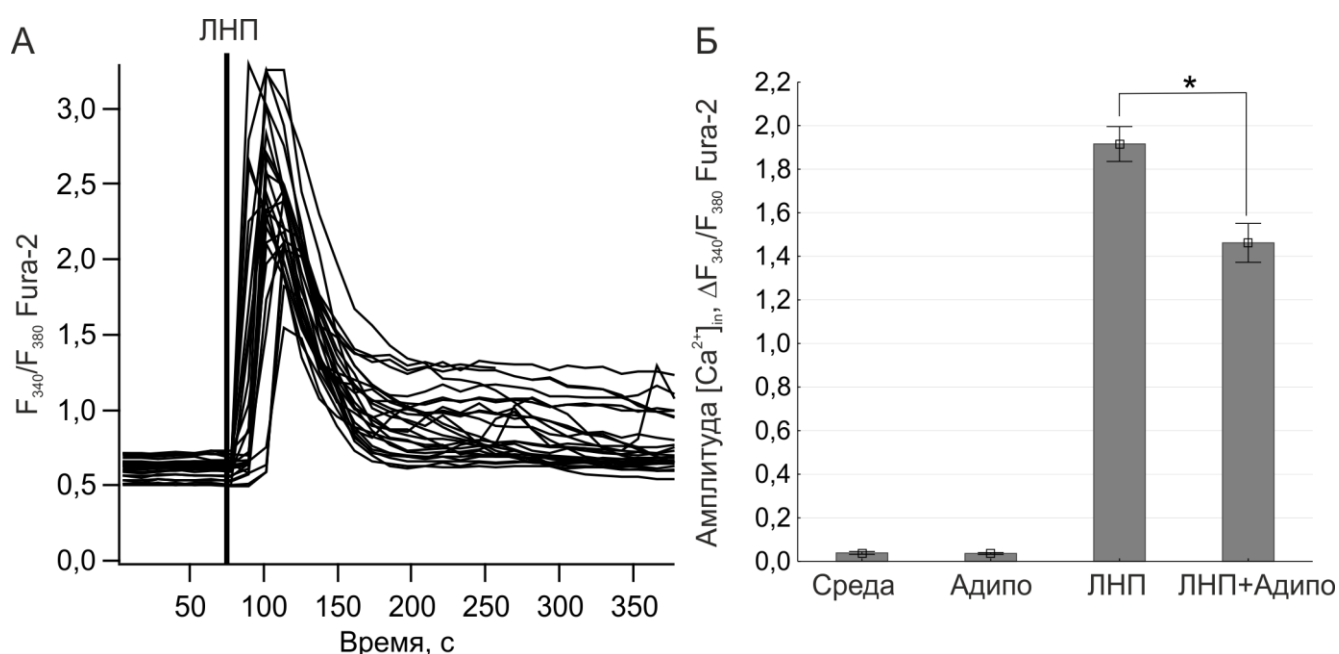


Рисунок 3.2. Анализ динамики изменения $[Ca^{2+}]_{in}$ с помощью флуоресцентной микроскопии. А. Повышение концентрации $[Ca^{2+}]_{in}$ в одиночных ГМК в ответ на добавление ЛНП, оцененное по отношению флуоресценции F_{340}/F_{380} в серии микроскопических изображений. Б. Амплитуда $[Ca^{2+}]_{in}$ 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 * $p < 0,001$.

3.2. Т-кадгерин необходим для ингибирования ЛНП-индуцируемого $[Ca^{2+}]_{in}$ -ответа адипонектином.

Для того, чтобы изучить роль Т-кадгерина в ингибировании ЛНП-индуцируемой $[Ca^{2+}]_{in}$ сигнализации адипонектином, мы использовали линейные клетки НЕК293, в которых не экспрессируется Т-кадгерин по данным иммуноблота, и их модификации с гиперэкспрессией Т-кадгерина (Рис.3.3 А). Ранее было показано, что в этих клетках ЛНП-индуцируемая сигнализация сходна с таковой в первичных культурах по динамике $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа и активируемым посредникам сигнального пути, что говорит об адекватности данной модели [10, 12]. В выбранных клонах клеток с гиперэкспрессией Т-кадгерина он обнаруживается в значительных количествах как в образцах общего белка, так и на поверхности клеток по сравнению с клетками дикого типа (рис. 3.3).

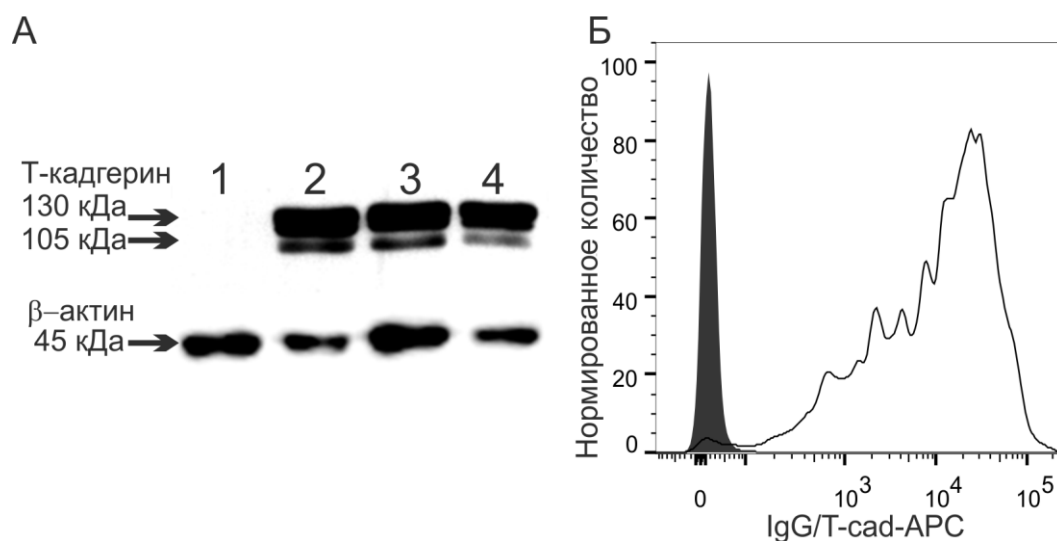


Рисунок 3.3. Содержание Т-кадгерина в клетках линии НЕК293. А. Анализ содержания Т-кадгерина с помощью иммуноблоттинга: дорожка 1 – не трансфицированные клетки; дорожки 2-4 – клоны клеток, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин. Б. Анализ экспрессии Т-кадгерина на поверхности клеток одного из клонов с помощью 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 клетками дикого типа (рис. 3.4). В контрольных клетках амплитуда $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа при добавлении ЛНП и ЛНП+Адипо достоверно не отличается, однако в клетках с Т-кадгерином 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. Т-кадгерин-независимая сигнализация, вероятно, связана с электростатическим взаимодействием поликатиона ЛНП с мембраной, которое также может запускать фосфоинозитидный обмен, но с иной кинетикой и профилем фосфатов инозитола [109].

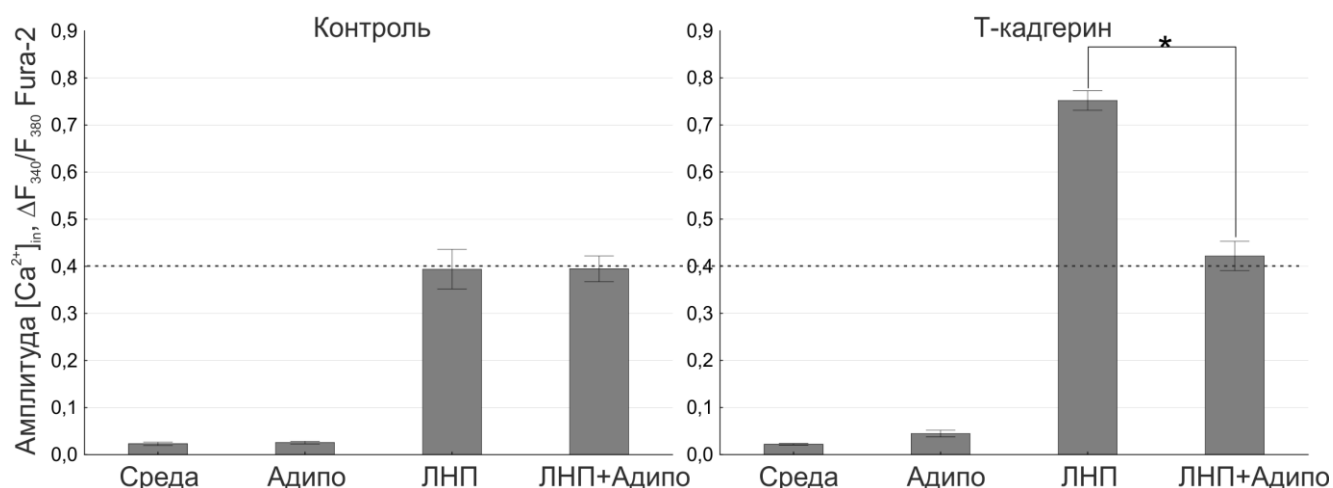


Рисунок 3.4. Сравнение амплитуд $[Ca^{2+}]_{in}$ ответа клеток при действии лигандов с помощью флуоресцентной микроскопии. Контроль – клетки НЕК293 без Т-кадгерина (слева). Т-кадгерин – клетки НЕК293, гиперэкспрессирующие этот белок (справа). Амплитуды $[Ca^{2+}]_{in}$ анализировали после добавления среды культивирования (Среда), Адипо 10 мкг/мл, ЛНП 25 мкг/мл или их сочетания. Данные приведены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка. 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. Они, в свою очередь, требуют оптимизации способов флуоресцентного мечения рецепторов и регистрации сигнала FRET.

3.3. 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 две химерные конструкции Т-кадгерина с флуоресцентными белками (FP), которые образуют FRET пару: донор (TFP) и акцептор (YFP). Учитывая ряд структурных особенностей Т-кадгерина, вставка FP была произведена между пятым доменом кадгерина (рис. 3.5 А, EC5) и С-концевой последовательностью, которая впоследствии заменяется на ГФИ-якорь [235]. Выбор этого места вставки был основан на успешном примере создания флуоресцентной химеры другого ГФИ-заякоренного белка – uPAR[214].

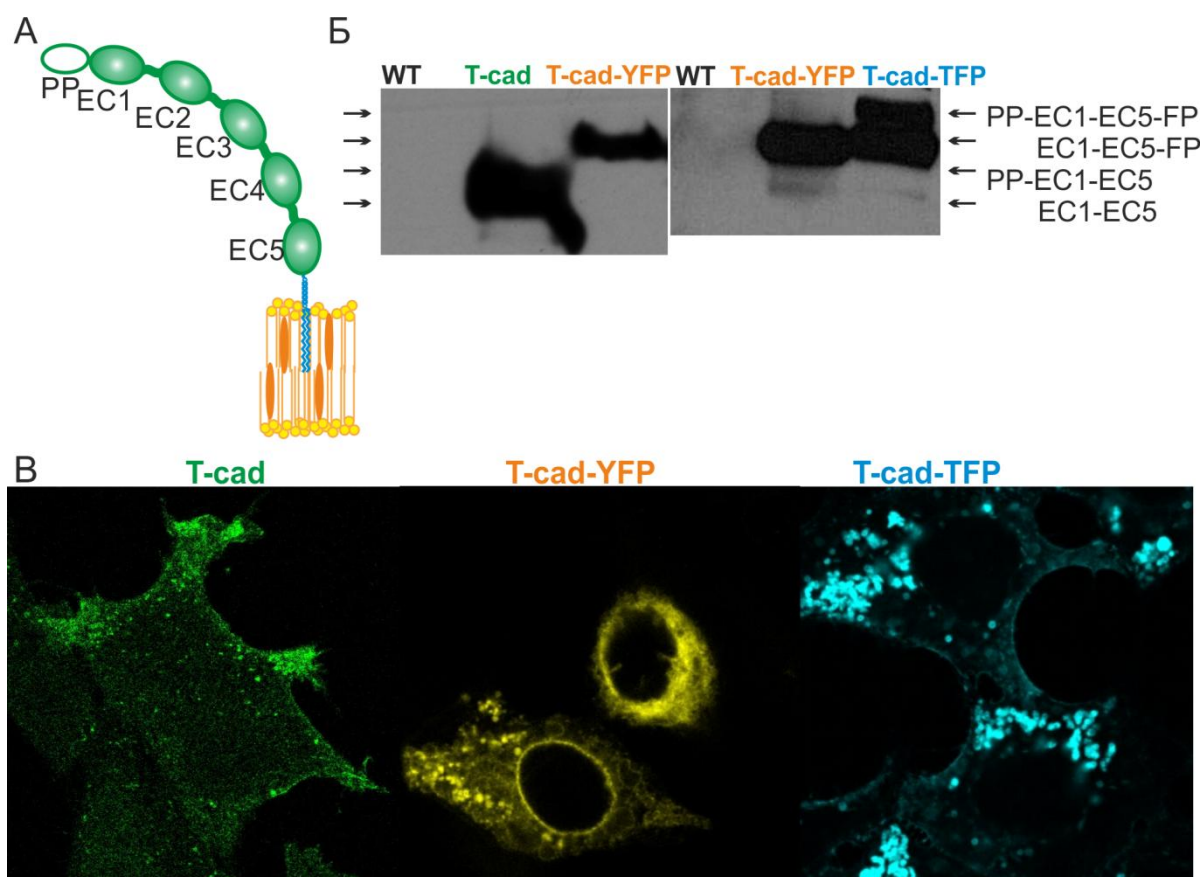


Рисунок 3.5. Экспрессия нативного Т-кадгерина и химерных белков на его основе. А. Схема структурной организации Т-кадгерина: PP – продомен, EC1-EC5 – кадгериновые домены. Б. Анализ экспрессии Т-кадгерина в клетках HEK293 с помощью иммуноблоттинга: T-cad – клетки, экспрессирующие нативный Т-кадгерин; T-cad-YFP и T-cad-TFP – клетки, экспрессирующие химерные белки. В. Анализа локализации Т-кадгерина в клетках HEK293 с помощью конфокальной микроскопии. Зеленым цветом представлено распределение нативного Т-кадгерина, окрашенного антителами, желтым – химерного белка T-cad-YFP, голубым – T-cad-TFP.

Клетки, трансфицированные полученной нами генетической конструкцией pIRESneo1-T-cad-YFP, экспрессировали Т-кадгерин по данным иммуноблоттинга и обладали флуоресценцией YFP по данным микроскопии (рис. 3.5, Б, В). Для характеристики связывания химерного рецептора T-cad-YFP с лигандом ЛНП была использована проточная цитометрия. Специфическое связывание определяли как разницу между общим связыванием и неспецифическим связыванием, аппроксимированным линейной зависимостью (рис. 3.6, А, В, линии 3). При представлении специфического связывания в координатах Скэтчарда (рис. 3.6, В) видно, что нетрансфицированные клетки HEK293 имеют два центра связывания ЛНП:

$Kd_1=2,4$ мкг/мл, $Kd_2=45$ мкг/мл. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными на сольбилизованных клетках гладкой мускулатуры сосудов при измерении связывания 125 I-меченного лиганда: $Kd_1 \approx 2$ мкг/мл, $Kd_2 \approx 40$ -50 мкг/мл [7, 18]. Именно за низкоаффинное связывание ($Kd \approx 45$ мкг/мл) отвечает Т-кадгерин, что подтверждается дозозависимыми сигнальными эффектами при концентрации ЛНП до 100 мкг/мл [7].

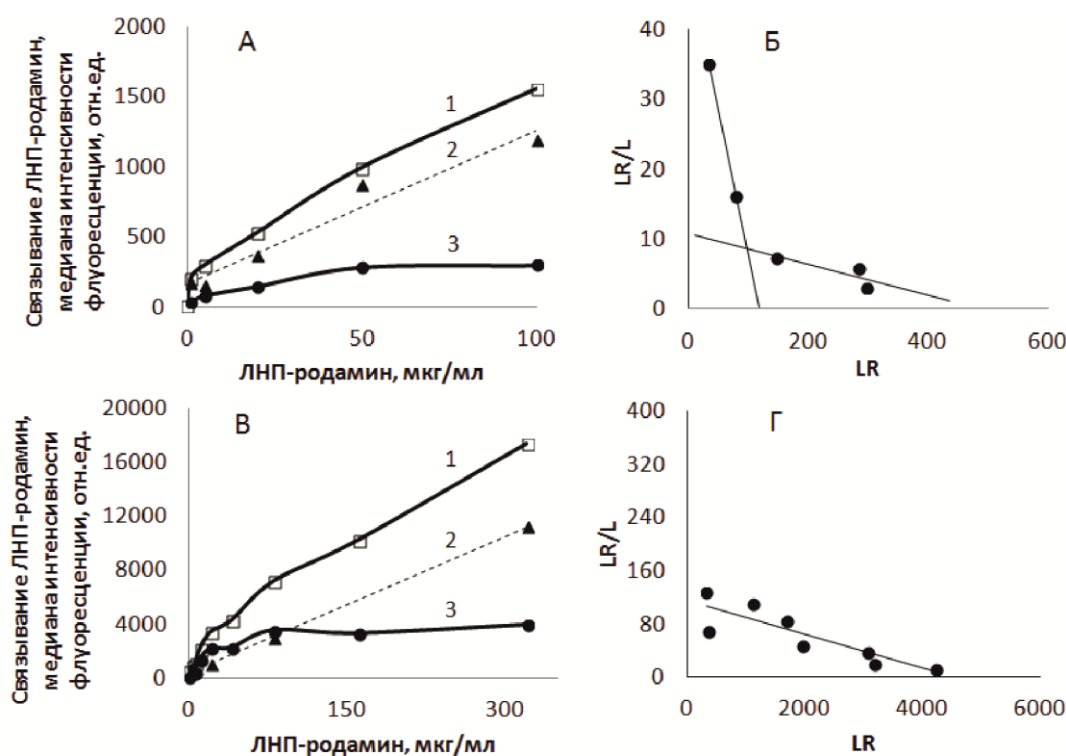


Рисунок 3.6. Связывание ЛНП на живых клетках HEK293T, не трансфицированных плазмидой (А, Б), и на клоне, стабильно продуцирующем Т-кадгерин-YFP (В, Г). 1 – общее связывание, 2 – линейная зависимость неспецифического связывания, 3 – специфическое связывание.

Клетки со стабильной экспрессией Т-кад-YFP значительно сильнее связывали ЛНП и экспериментальные данные специфического связывания, описывались моделью с одним центром связывания ($Kd = 40$ мкг/мл) как при использовании нелинейного регрессионного анализа, так и в координатах Скэтчарда (рис. 3.6, Г). Это свидетельствует о количественном преобладании Т-кадгерина над рецептором LDLR на мембране таких клеток.

Использование второй генетической конструкции pIRESneo1-T-cad-TFP позволило сделать неожиданное наблюдение: две химерные

конструкции Т-кадгерина, которые различались лишь последовательностями FR, по-разному локализовались в клетке и имели различную молекулярную массу (рис. 3.5, Б, В). Нативный Т-кадгерин имеет массу 130 кДа (рис.3.5, PP-EC1-EC5) и 105 кДа (EC1-EC5) [31] и локализуется на плазматической мембране и везикулах внутри клетки (рис. 3.5, В). Химерный белок Т-cad-TFR отличается по массе от нативного на массу FR и, по-видимому, также обнаруживается в клетке в виде двух форм PP-EC1-EC5-FR и EC1-EC5-FR, локализуясь на мембране и в везикулах (рис. 3.5, Б, В). Однако белок Т-cad-YFP на иммуноблоте детектируется в виде одной полосы, а в клетке обнаруживается в ЭПР (рис. 3.5, Б, В, рис.3.7).

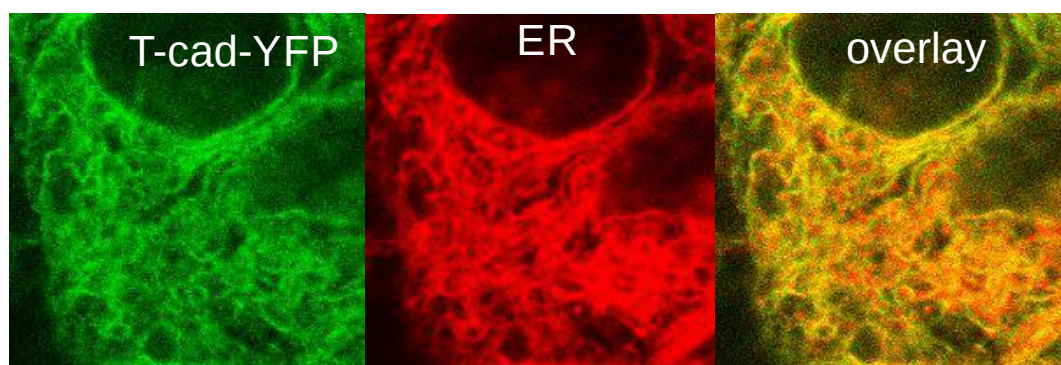


Рисунок 3.7 Внутриклеточная локализация Т-cad-YFP(зелёный) в живых клетках HEK293, эндоплазматический ретикулум(ER) которых окрашен специфическим флуоресцентным зондом (ER-Tracker Red, красный). Спарва представлено наложение флуоресцентных изображений. Желтый цвет указывает на солокализацию двух флуоресцентных меток.

Вероятно, у Т-cad-YFP нарушен фолдинг, что приводит к нарушению его транспорта на мембрану. Для проверки предположения о мисфолдинге химерного белка были построены трёхмерные молекулярные модели Т-cad-YFP, Т-cad-TFR и нативного Т-кадгерина на основе их первичной последовательности. Для этого был использован описанный ранее подход на основе поиска гомологичных последовательностей и распознавания их укладки [244]. Структура Т-cad-YFP отличалась от Т-кадгерина и Т-cad-TFR (рис. 3.8). В группе Ranscht также была получена флуоресценная химера Т-кад с красным флуоресцентным белком (RFP) между EC4 и EC5 доменами Т-

кадгерина. У этой химеры также была слабо выражена мембранная локализация и на иммуноблоте не было видно двух форм белка [75]. Эти и наши данные говорят о том, что, FP значительно влияет на сворачивание, созревание и внутриклеточный транспорт Т-кадгерина.

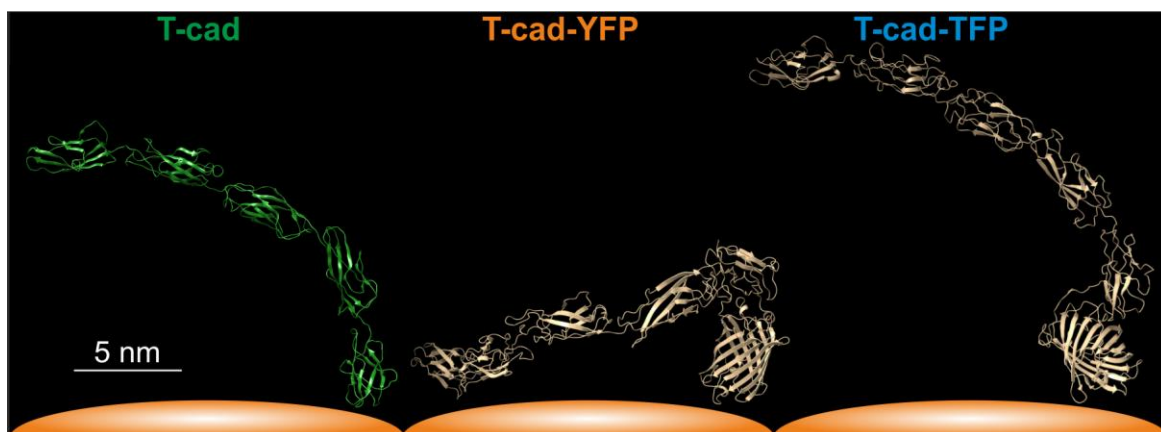


Рисунок 3.8. Сравнение конформаций EC1-EC5 доменов нативного Т-кадгерина (T-cad) и химерных белков T-cad-YFP и T-cad-TFP, построенных на основе моделирования сервисом Phyre2 [244] и визуализированных посредством Chimera [245], снизу оранжевым цветом изображена мембрана.

В связи с этим, нами был выбран принципиально другой подход флуоресцентного мечения, который позволяет снизить массу и размер флуоресцентной метки и, тем самым, минимизировать влияние на структуру и свойства рецептора. Этот метод основан на вставке короткого тега (S6-пептида) с последующим ферментативным ковалентным присоединением флуоресцентно меченого субстрата [233]. Преимуществами такого подхода являются [247]: 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. 3.9, 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. 3.9, 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.

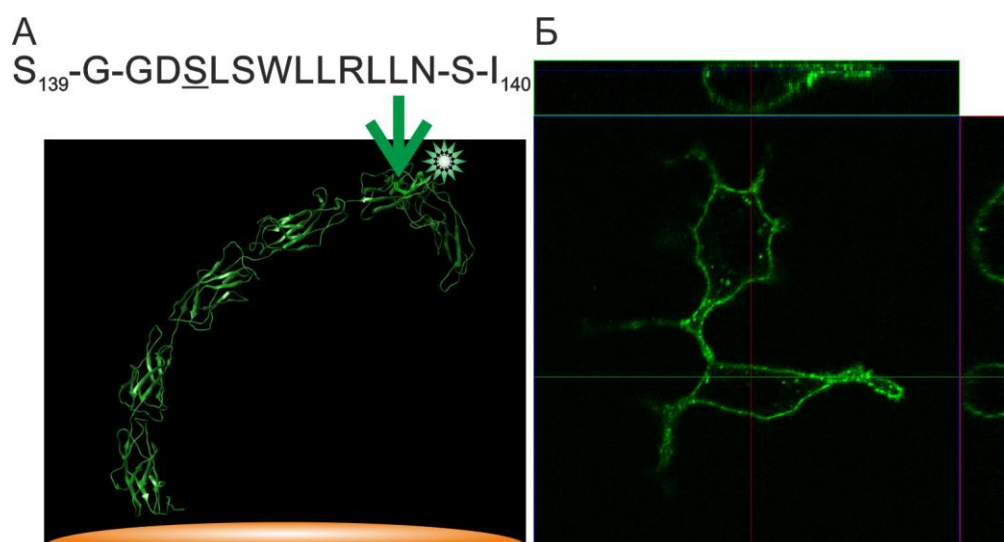


Рисунок 3.9. Новый подход к внесению флуоресцентной метки в последовательность Т-кадгерина позволяет сохранять структуру белка и его мембранную локализацию. А. Трёхмерная модель Т-кадгерина со вставкой S6-пептида (сверху представлена его последовательность; место вставки между EC1 доменом и пропептидом обозначено стрелкой; флуоресцентная метка, которая присоединяется к серину(выделен нижним подчёркиванием), изображена в виде зелёной звезды). Б. Мембранная локализация химеры Т-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.

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 (рис. 3.10, А). Амплитуда Ca^{2+} - ответа на ЛНП в клетках с T-cad-S6 также достоверно не отличалась от таковой у клеток с нативным Т-кадгерином (рис 3.10, Б). При этом антитела против Т-кадгерина узнавали T-cad-S6, а ферментативное мечение было селективно (рис.3.10).

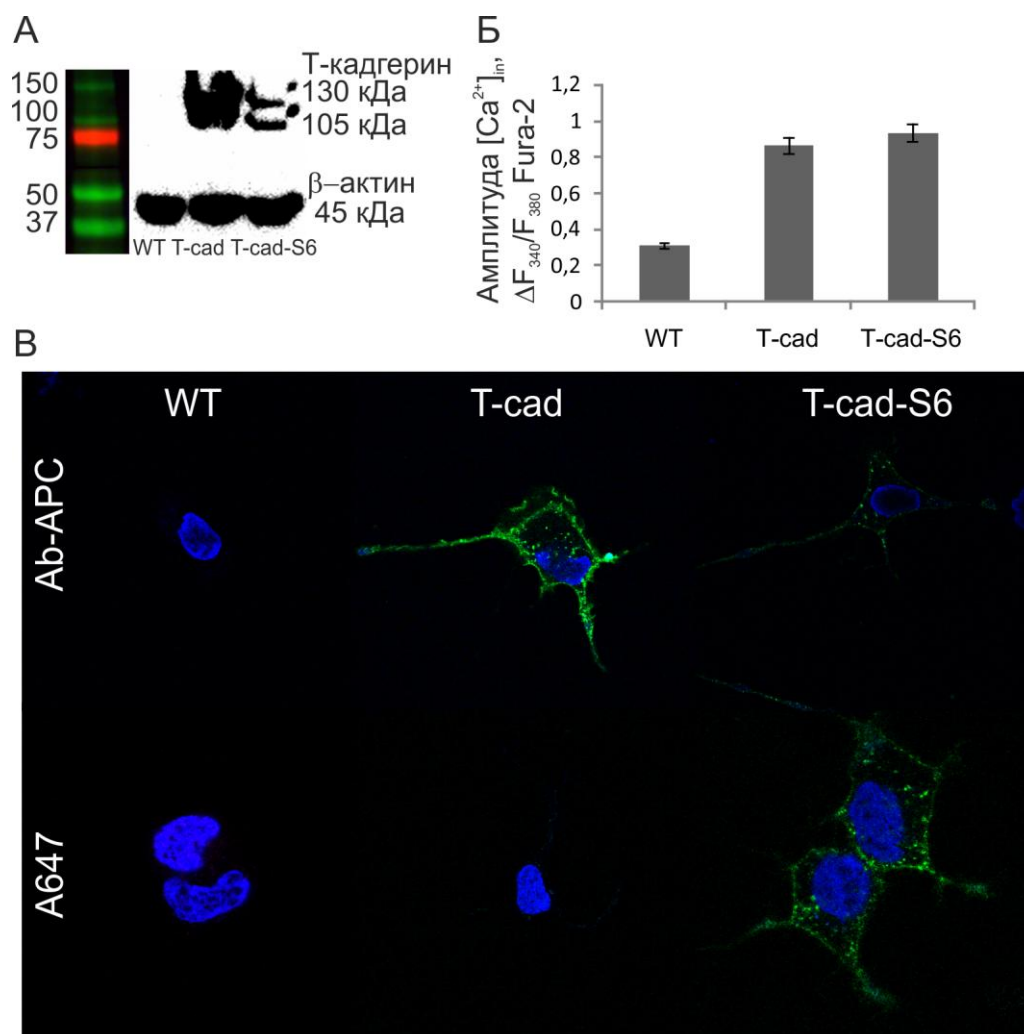


Рисунок 3.10. Сравнительный анализ клеток дикого типа (WT), экспрессирующих T-cad и T-cad-S6. А. Иммуноблот лизатов трёх типов клеток: молекулярные массы полос T-cad и T-cad-S6 схожи. Б. ЛНП-индуцируемый Ca^{2+} -ответ в трёх типах клеток: дикого типа, T-cad и T-cad-S6 неотличим. В. Узнавание антителами клеток T-cad и T-cad-S6 и селективное мечение T-cad-S6.

В совокупности эти данные показывают, что выбранный нами способ флуоресцентного мечения полностью сохраняет свойства нативного белка и подходит для анализа его димеризации с помощью FRET.

3.4. Измерение FRET между молекулами Т-кадгерина на мембране живых клеток.

Клетки с T-cad-S6 инкубировали в присутствии эквимольных количеств CoA547 (субстрат с донорным красителем DY-547) и CoA647 (субстрат с акцепторным красителем DY-647P1) (спектры представлены на рис. 3.11), а также фермента, который специфично ковалентно присоединял

одну из этих молекул красителя на серин в составе S6-пептида (рис. 2.4). В результате такой инкубации были получены клетки, на поверхности которых в равных количествах присутствуют две формы Т-кадгерина, меченные одним из двух красителей. С помощью анализа FRET между этими красителями мы регистрировали димеризацию Т-кадгерина в присутствии и в отсутствие лигандов. Эффективность FRET зависит от расстояния между донором и акцептором и R_0 - фёрстеровский радиус пары флуорофоров [209] (формула 1.1 описывает случай двух молекул).

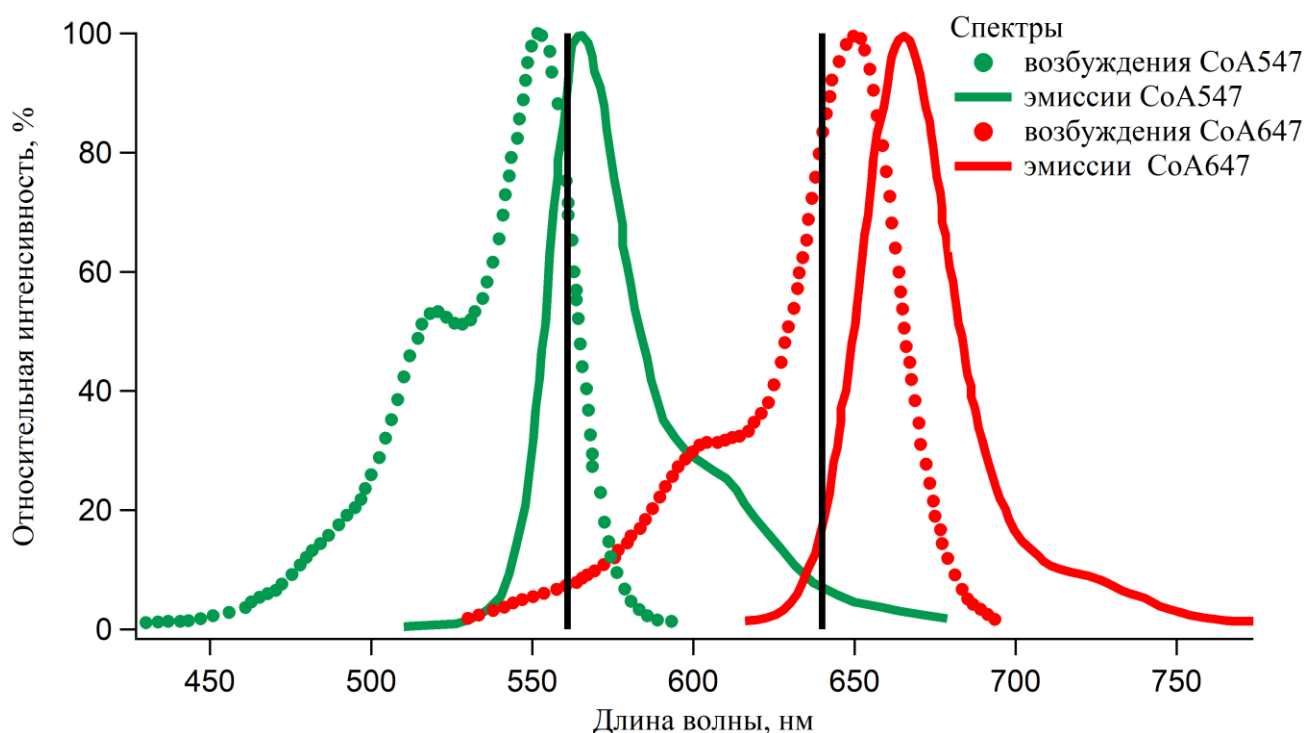


Рисунок 3.11. Спектры возбуждения (обозначены точками) и эмиссии (сплошная линия) используемых флуорохромов. Чёрными вертикальными линиями обозначены используемые лазерные линии.

Нами была произведена оценка R_0 для использованной пары донор-акцептор по формуле (1.2). Дипольные моменты донора DY-547 и акцептора DY-647P1, благодаря их малой массе и гибкому линкеру (рис.2.4.), могут принимать произвольные ориентации, в отличие от тяжёлых FP [248], поэтому $\kappa^2=2/3$. Показатель преломления среды, в которой находились клетки, согласно нашим измерениям на рефрактометре, был равен 1,335. По данным производителя квантовый выход флуоресценции донора DY-547 в

виде свободной кислоты в растворе составляет 0,1. Коэффициент экстинкции акцептора DY-647P1 в максимуме равен $250000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Интеграл перекрывания спектров донора и акцептора был рассчитан по формуле:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda,$$

где $F_D(\lambda)$ спектр флуоресценции донора, площадь которого нормирована на 1, ε_A спектр поглощения акцептора и составил $3,81 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^6/\text{моль}$, а фёрстеровский радиус $R_0 - 4,4 \text{ нм}$.

Экспериментально эффективность FRET была измерена методом обесцвечивания акцептора, при котором измеряется интенсивность флуоресценции донора при наличии FRET (I_{pre}) и после удаления акцептора, фотообесцвечивания мощным лазерным облучением (I_{post}). С помощью этого метода было установлено, что на поверхности живых клеток в среде без лигандов эффективность FRET составляет в среднем $11,8 \pm 1,8\%$, а в присутствии сыворотки (в которой есть оба лиганда Т-кадгерина) $24,2 \pm 0,2\%$. Это говорит об увеличении димеров Т-кадгерина в присутствие лиганда.

Метод обесцвечивания акцептора позволяет быстро оценить эффективность FRET, однако не позволяет измерить кинетику образования димеров при добавлении лиганда, поскольку происходит необратимое фотообесцвечивание акцептора. Сам процесс обесцвечивания занимал в нашем случае продолжительное время (минуту), что тоже не позволяет достаточно точно измерять процессы, происходящие в живой клетке.

Для кинетических измерений FRET мы использовали регистрацию стимулированной эмиссии акцептора т.е. эмиссию акцептора при возбуждении донора. 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 на конфокальных флуоресцентных

изображениях опытных образцов с донором и акцептором по формуле, предложенной в работе [241].

Добавление лигандов, ЛНП и Адипо, привело к увеличению показателя 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, экспериментальная кривая была аппроксимирована моноэкспоненциальной зависимостью с характерным временем 34,8 с (рис. 3.12).

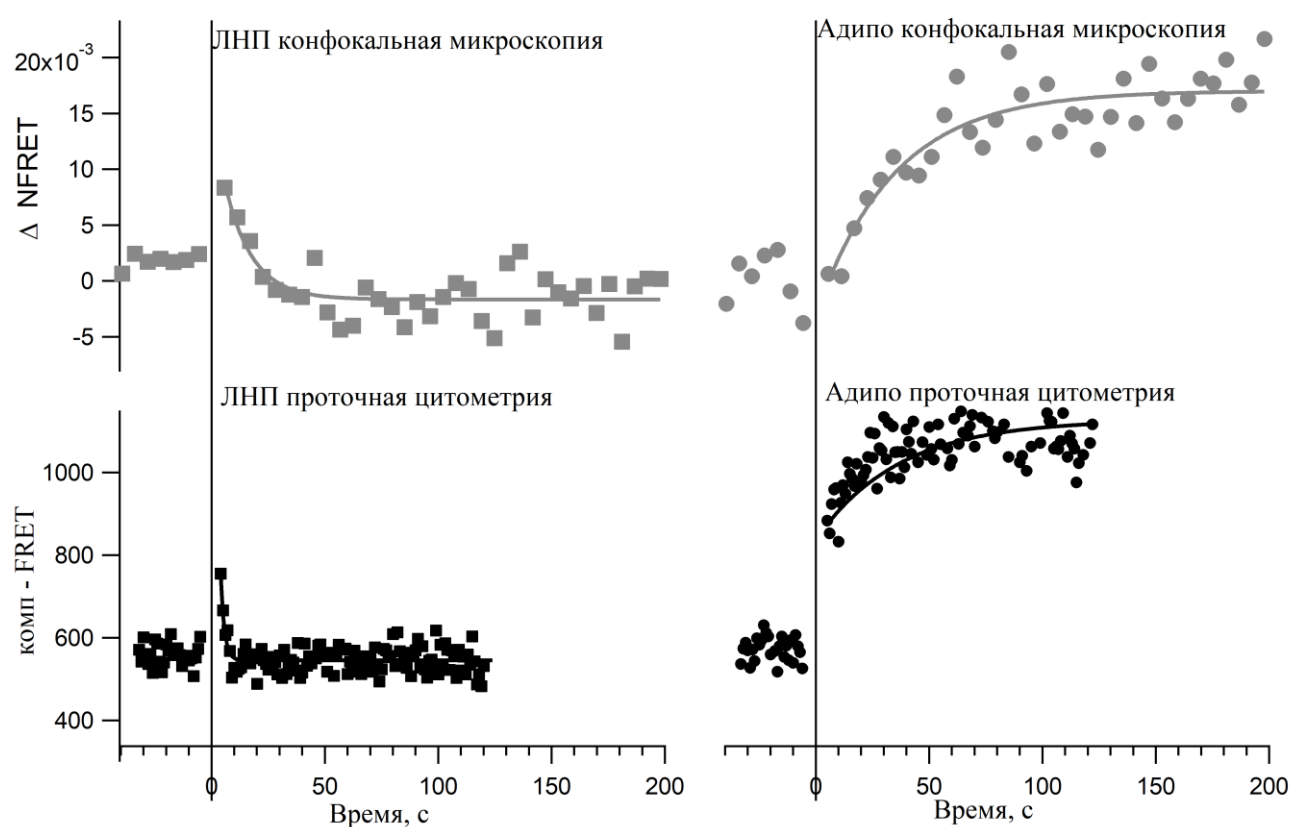


Рисунок 3.12. Кинетика изменения расстояния Т-кадгерин-Т-кадгерин на мембране живых клеток при добавлении ЛНП и Адипо в момент времени 0. Верхний ряд: изменение показателя FRET по сравнению с базовой линией (конфокальная—лазерная сканирующая микроскопия). Каждая точка соответствует усреднённому значению 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 $y_0 + A \cdot \exp(x \cdot \ln \tau)$, описывающие экспериментальные данные.

Кинетика лиганд-зависимого образования кластеров Т-кадгерин-Т-кадгерин также была измерена 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. 3.12).

Совместное добавление ЛНП и Адипо приводило к такому же значению FRET, как и при добавлении Адипо (измерение проводили после двух минут инкубации с лигандами)(рис.3.13). Таким образом, ЛНП в концентрации 25 мкг/мл не уменьшают количество стабильных димеров Т-кадгерина, образованных при добавлении Адипо 10 мкг/мл. При таком соотношении лигандов, в основном, образуются комплексы Т-кадгерин-Адипо, в которых Т-кадгерин находится в димерной форме. Ровно такие же концентрации ЛНП и Адипо мы использовали в экспериментах по изучению кальциевой сигнализации, которые показали отсутствие Т-кадгерин-зависимого увеличения $[Ca^{2+}]_{in}$ (рис. 3.4).

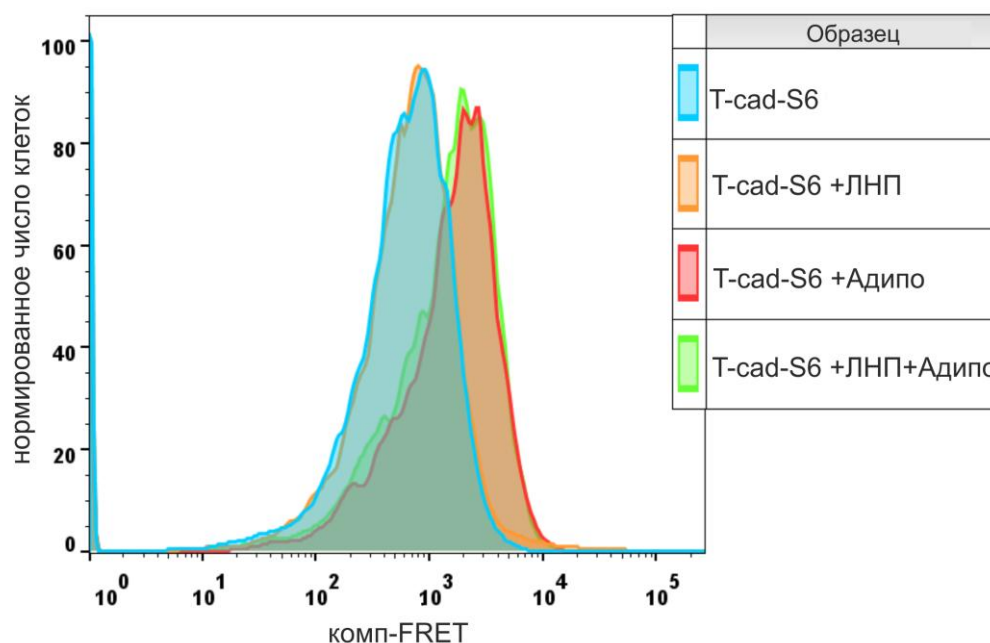


Рисунок.3.13 Гистограмма интенсивности компенсированного сигнала FRET без (T-cad-S6) и с добавлением лигандов. После двух минут инкубации с ЛНП, Адипо или ЛНП+Адипо сигнал FRET в образце с ЛНП был неотличим от контрольного, а с ЛНП+Адипо – от образца с одним Адипо.

3.5. Возможный молекулярный механизм взаимодействия Т-кадгерина с ЛНП и адипонектином.

Таким образом, Т-кадгерин образует димеры как при взаимодействии со своим низкоафинным лигандом ЛНП (100 нМ = 50 мкг/мл [18]), так и с высокоафинным Адипо (меньше 6 нМ [20, 36]). Однако ЛНП за секунды запускает IP_3 - Ca^{2+} сигнализацию, а Адипо её не запускает (рис. 3.2, рис. 3.4, рис. 3.14 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 Адипо с димером Т-кадгерина оказывается в более долгоживущих, но ингибирующих сигнализацию рафтах – кавеолах (рис. 3.14).

ЛНП-индуцируемый сигнальный каскад Т-кадгерина напоминает каскад CD59: димеры ГФИ-заякоренного белка стабилизируют рафт, в который рекрутируются Gai и SFK; их ассоциация приводит к активации SFK и фосфолипазы C, в результате которой образуется IP_3 , который, в свою очередь, открывает Ca^{2+} -каналы ЭПР (рис. 3.14, Б). Участие этих белков в

ЛНП-индуцируемой сигнализации доказано ингибиторным анализом [2, 5, 10, 11]. Такие короткоживущие малые рафты (единичные рафты менее 50 нм существуют несколько с) имеют плоскую форму и стабилизируются за счёт димеров ГФИ-заякоренных белков (рис. 3.18, планарный рафт) [19].

Лиганд-рецепторный комплекс Адипо-Т-кадгерин, вероятно, имеет большую аффиность 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 [249]. Ранее было показано, что Т-кадгерин и Адипо действительно обнаруживаются во фракциях мембран с кавеолином [69, 250, 251]. 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 [252].

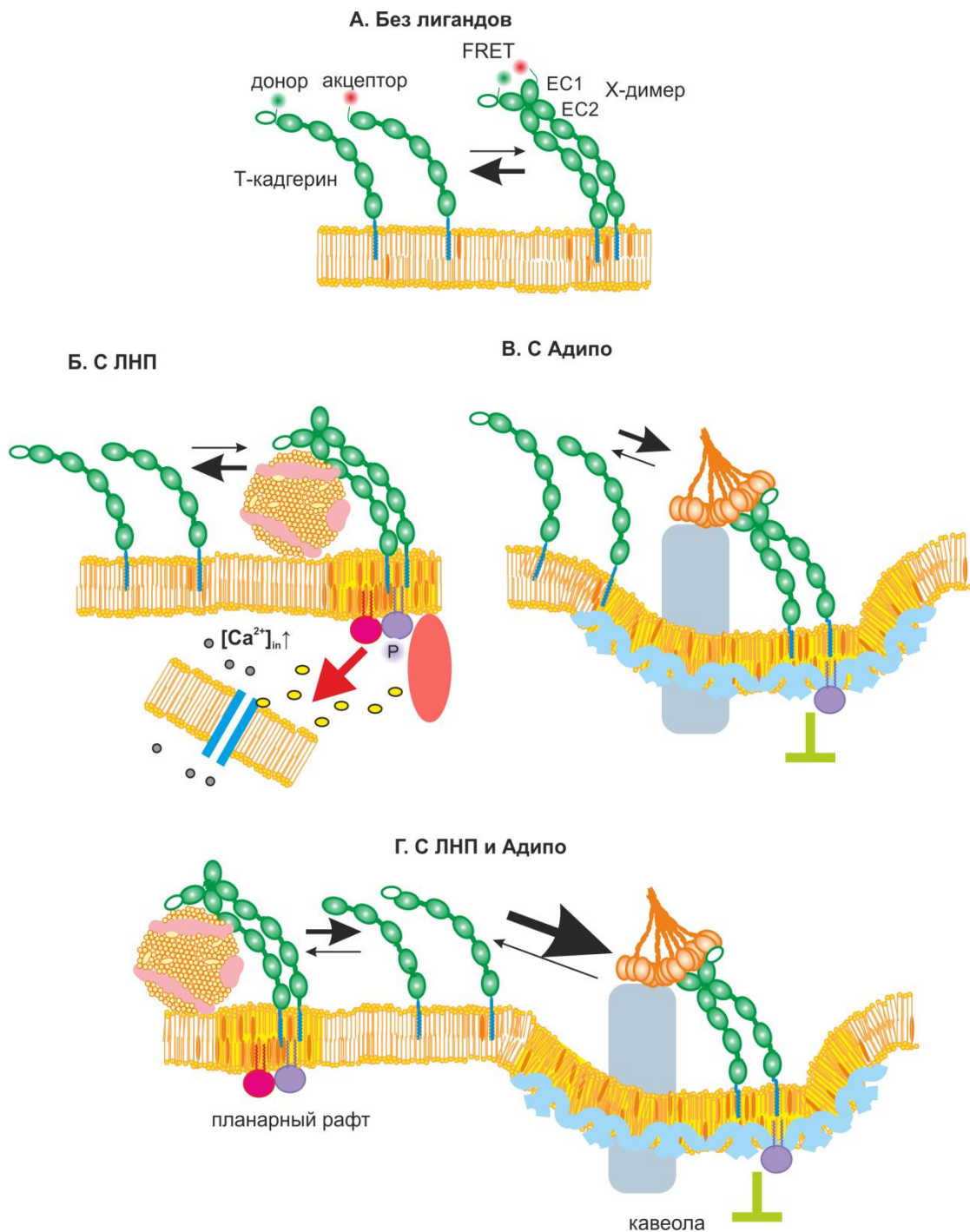


Рисунок 3.14. Модель, описывающая распределение Т-кадгерина на поверхности мембраны до и после стимуляции физиологическими лигандами. А. В отсутствии лигандов Т-кадгерин локализован в неупорядоченных участках мембраны. Б. При взаимодействии с ЛНП Т-кадгерин перераспределяется в или формирует в своем основании плоский рафт, который служит платформой для запуска сигнализации через Ga α 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[250, 251]. Г. В присутствии ЛНП и Адипо за счет большей аффинности Адипо преобладает локализация Т-кадгерина в кавеолах.

Оценочный расчёт количества лиганд-рецепторных комплексов на основе констант равновесия Т-кадгерина с лигандами и их концентраций ($[ЛНП]=1,56 \text{ мкМ}=0,8 \text{ г/л}$ и $[Адипо]=12,5 \text{ мкМ}$) при физиологических условиях показал, что почти весь Т-кадгерин в норме находится в связанной с Адипо форме (менее 1% связано с ЛНП). Разнонаправленное изменение концентрации лигандов при ожирении ($[ЛНП]$ увеличивается до 1,7 мМ и $[Адипо]$, уменьшается до 7,8 мМ) может приводить к увеличению количества комплексов Т-кадгерин-ЛНП, которого по экспериментальным данным достаточно для запуска внутриклеточной сигнализации (ЛНП в концентрациях от 15 мкг/мл вызывают кальциевый ответ [2, 10]).



Рисунок 3.15. Т-кадгерин как рецептор-переключатель внутриклеточной сигнализации в клетках сердца и сосудов. В норме почти весь Т-кадгерин связан с адипонектином, тогда как при ожирении количество комплексов Т-кадгерина с ЛНП возрастает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предпринята попытка объяснить необычный феномен: наличия противоположных физиологических эффектов двух естественных лигандов одного рецептора. В крови постоянно присутствуют липопротеиды низкой плотности, обладающие атерогенным действием, и адипонектин, обладающий антиатерогенным действием, защищающим сердце и сосуды. Т-кадгерин является белком, который может специфично связывать обе эти молекулы [13, 20]. Ассоциации сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний с полиморфизмом гена Т-кадгерина и его преимущественная экспрессия в сердечно-сосудистой системе указывают на важнейшую роль этого рецептора в функционировании клеток сердца и сосудов [29]. Хорошо известна достоверная корреляция метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний, однако причинно-следственные связи и молекулярно-клеточные механизмы остаются предметом детального изучения. Т-кадгерин является важным кандидатом, способным регулировать кардиометаболические процессы. Тем не менее, молекулярные механизмы трансдукции им внутриклеточного сигнала остаются загадкой, поскольку у него нет трансмембранной и цитоплазматической части и на мембране он закреплён при помощи ГФИ-якоря.

В настоящей работе было впервые показано образование димеров ГФИ-заякоренного рецептора Т-кадгерина под действием двух лигандов: липопротеидов низкой плотности и высокомолекулярной формы адипонектина. Для этого нами были разработаны оригинальные методы мечения белка и измерения FRET на мембране живых клеток, как при помощи микроскопии, так и при помощи проточной цитометрии. Оптимизированный нами метод на основе коротких пептидных тэгов и ферментативного конъюгирования флуоресцентных меток с мембранными белками представляется перспективным, в особенности для изучения динамики димеризации малых и/или ГФИ-заякоренных мембранных белков с помощью FRET. На сегодняшний день это один из немногих подходов для

изучения прижизненной динамики липидированных белков, которые обладают высокой латеральной подвижностью в мембране. Нам удалось наблюдать за процессами сближения молекул на мембране живых клеток на расстояния меньше 10 нм с миллисекундным разрешением, используя коммерчески доступное оборудование.

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. Таким образом, адипонектин выступает в роли физиологического кальциевого антагониста. Какую биологическую роль играет этот необычный природный антагонизм, предстоит ещё выяснить на модельных животных и клиническом материале.

Результаты настоящей работы важны и для понимания принципов работы мембранных рецепторов. Мы показали, что связывание с одним и тем же ГФИ-заякоренным рецептором двух лигандов приводит к разным ответам за счёт формирования различных лиганд-рецепторных комплексов. Дальнейшие исследования лиганд-рецепторного связывания, образования димеров Т-кадгерина и детальный механизм запуска внутриклеточной сигнализации представляются перспективными как с научной, так и с практической точек зрения. Уже сейчас есть ряд патентов, авторы которых предлагают воздействовать на Т-кадгерин для имитации его взаимодействия с адипонектином и получения терапевтического эффекта [153, 253, 254].

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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность моим научным руководителям, Всеволоду Арсеньевичу Ткачуку и Георгию Владимировичу Шаронову, за возможность научного творчества, помощь в освоении различных методов и научных материалов, а также за их терпение и поддержку.

Хотелось бы выразить особую признательность Александру Владимировичу Балацкому, который стимулировал меня к написанию диссертационной работы и оказывал постоянную поддержку.

Большую благодарность выражаю Ксении Андреевне Рубиной, Екатерине Владимировне Сёминой и Дмитрию Викторовичу Стамбольскому, диссертационные работы которых были посвящены исследованию Т-кадгерина, за предоставленные материалы и наработки прошлых лет.

Благодарю Александру Ивановну Баглай и Марию Александровну Кулебякину, которые помогали мне в проведении некоторых экспериментов, а также всех сотрудников лаборатории генных и клеточных технологий и кафедры биохимии и молекулярной медицины ФФМ МГУ за их методическую помощь и обсуждение результатов (особенно хочется отметить помощь Юрия Петровича Рубцова, Петра Алексеевича Тюрина-Кузьмина, Натальи Игоревны Калининой, Дмитрия Николаевича Пенькова, Александра Дмитриевича Егорова, Данияра Таалайбековича Дыйканова, Константина Юрьевича Кулебякина, Вероники Юрьевны Сысоевой, Татьяны Владимировны Лопатиной, Павла Игоревича Макаревича). Крайне признательна сотруднику ФФМ МГУ Сергею Валентиновичу Буравкову за помощь в освоении конфокального микроскопа LSM780 и сотруднику НИИ Канцерогенеза РОНЦ им Н.Н. Блохина Виктору Вячеславовичу Татарскому за помощь в освоении системы Pathway855. Выражаю благодарность сотрудникам Института экспериментальной кардиологии за их участие в совместных семинарах и возможность использования некоторого оборудования: Елене Викторовне Парфёновой, Александру Вячеславовичу Воротникову, Екатерине Сергеевне Зубковой и Ирине Борисовне

Белоглазовой. Рада, что имела возможность работать и обсуждать работу с сотрудниками кафедры биофизики физического факультета МГУ Свешниковой Анастасией Никитичной, Пантелеевым Михаилом Александровичем и Атауллахановым Фазоилом Иноятовичем.

Благодарю Белоусова Всеволода Вадимович, оппонента настоящей диссертационной работы, за обсуждение полученных результатов на научных мероприятиях и согласие ознакомиться с диссертационной работой. Также выражаю благодарность за готовность стать оппонентами ведущих специалистов в области функционирования мембранных рецепторов Павла Владимировича Авдонина и Сергея Николаевича Орлова.

Огромное спасибо за замечания к работе и автореферату хочу сказать заведующему кафедрой биофизики биологического факультета МГУ, Андрею Борисовичу Рубину, а также Петру Алексеевичу, Наталье Игоревне, Александру Владимировичу, Дмитрий Николаевичу и моему одногруппнику Артёму Владимировичу Дюба.

За приобретение первых навыков работы в лаборатории и научных результатов я хочу поблагодарить сотрудников ИБХФ и ИХФ РАН, особенно Михаила Аркадьевича Островского, Ольгу Александровну Смитиенко, Татьяну Борисовну Фельдман, Виктора Андреевича Надточенко, Ивана Викторовича Шелаева, Федора Евгеньевича Гостева.

Также благодарна моей семье и всем тем, кто дал мне образование и привил любовь к науке.

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.), РНФ (14-24-00086, руководитель Ткачук В.А.) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, 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. **Web of Science, Scopus, RSCI**
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. **Web of Science, Scopus, RSCI**
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. **Web of Science, Scopus**
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. **RSCI**

Тезисы и статьи в сборниках:

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. **Web of Science, Scopus**
6. Covalent labeling of cell-surface glycosylphosphatidylinositol-anchored receptors for study of dimerization and oligomerization in living cells by FRET/ **M. N. Balatskaya**, G. V. Sharonov, A. I. Baglay, V. A. Tkachuk // Тезисы

постерных докладов 2-я Школа ADFLIM. — Университетский центр СПбГУ, 2017. — Р. 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. *RSCI*

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. *RSCI*

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 "Перспективынаправленияфизико-химическойбиологииибиотехнологии" –, 2017. – С. 9-9. *RSCI*

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. 93-93. *RSCI*

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. *Scopus*

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. – T. 28165 –Journal of Extracellular Vesicles, 2015. –28165 **Scopus**

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 Believing – Imaging the Processes of Life –Mera-Druck GmbH Sandhausen, Germany, 2013. – C. 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein J. L., Brown M. S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis // *Annual Review of Biochemistry*. – 1977. – Т. 46. – С. 897-930.
2. Buhler F. R., Tkachuk V. A., Hahn A. W., Resink T. J. Low- and high-density lipoproteins as hormonal regulators of platelet, vascular endothelial and smooth muscle cell interactions: relevance to hypertension // *Journal of Hypertension*. Supplement. – 1991. – Т. 9, № 6. – С. S28-36.
3. Bochkov V., Tkachuk V., Buhler F., Resink T. Phosphoinositide and calcium signalling responses in smooth muscle cells: comparison between lipoproteins, Ang II, and PDGF // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1992. – Т. 188, № 3. – С. 1295-304.
4. Orlov S., Resink T. J., Bernhardt J., Ferracin F., Buhler F. R. Vascular smooth muscle cell calcium fluxes. Regulation by angiotensin II and lipoproteins // *Hypertension*. – 1993. – Т. 21, № 2. – С. 195-203.
5. Resink T. J., Rybin V., Bernhardt J., Orlov S., Buhler F. R., Tkachuk V. A. Cellular signalling by lipoproteins in cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats // *J Vasc Res*. – 1993. – Т. 30, № 3. – С. 169-80.
6. Bochkov V. N., Tkachuk V. A., Hahn A. W., Bernhardt J., Buhler F. R., Resink T. J. Concerted effects of lipoproteins and angiotensin II on signal transduction processes in vascular smooth muscle cells // *Arterioscler Thromb*. – 1993. – Т. 13, № 9. – С. 1261-9.
7. Bochkov V. N., Tkachuk V. A., Kuzmenko Y. S., Borisova Y. L., Buhler F. R., Resink T. J. Characteristics of low and high density lipoprotein binding and lipoprotein-induced signaling in quiescent human vascular smooth muscle cells // *Molecular Pharmacology*. – 1994. – Т. 45, № 2. – С. 262-70.

8. Bjorkerud S., Bjorkerud B. Lipoproteins are major and primary mitogens and growth promoters for human arterial smooth muscle cells and lung fibroblasts in vitro // *Arterioscler Thromb.* – 1994. – Т. 14, № 2. – С. 288-98.
9. Drobnik W., Mollers C., Resink T., Schmitz G. Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in response to HDL3 and LDL is markedly reduced in cultured fibroblasts from Tangier patients // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1995. – Т. 15, № 9. – С. 1369-77.
10. Kipmen-Korgun D., Osibow K., Zoratti C., Schraml E., Greilberger J., Kostner G., Jürgens G., Graier W. T-Cadherin Mediates Low-Density Lipoprotein-Initiated Cell Proliferation Via the Ca²⁺-Tyrosine Kinase-Erk 1/2 Phathway // *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* – 2005. – Т. 45, № 5. – С. 418-430.
11. Ткачук В.А. С. Д. В., Рубина К.А., Семина Е.В., Сторожевых Т.П., Черенков В., Иванов Д.Б., Войно-Ясенецкая Т.А., Парфенова Е.В. Т-кадгерин как новый рецептор липопротеидов плазмы крови, влияющий на клеточную миграцию // *Технологии живых систем.* – 2005. – Т. 2, № 1-2. – С. 27-36.
12. Rubina K., Talovskaya E., Cherenkov V., Ivanov D., Stambolsky D., Storozhevykh T., Pinelis V., Shevelev A., Parfyonova Y., 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. – Т. 273, № 1-2. – С. 33-41.
13. Tkachuk V., Bochkov V., Philippova M., Stambolsky D. Identification of atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin // *FEBS Lett* –1998. – Т. 421. – С. 208-212.
14. Ranscht B., Dours-Zimmermann M. T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region // *Neuron.* – 1991. – Т. 7, № 3. – С. 391-402.
15. Harrison O. J., Jin X., Hong S., Bahna F., Ahlsen G., Brasch J., Wu Y., Vendome J., Felsovalyi K., Hampton C. M., Troyanovsky R. B., Ben-Shaul A., Frank J., Troyanovsky S. M., Shapiro L., Honig B. The extracellular architecture

- of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins // Structure. – 2011. – T. 19, № 2. – C. 244-56.
16. Ciatto C., Bahna F., Zampieri N., VanSteenhouse H. C., Katsamba P. S., Ahlsen G., Harrison O. J., Brasch J., Jin X., Posy S., Vendome J., Ranscht B., Jessell T. M., Honig B., Shapiro L. T-cadherin structures reveal a novel adhesive binding mechanism // Nat Struct Mol Biol –2010. – T. 17, № 3. – C. 339-47.
 17. Resink T., Kuzmenko, Kern F., Stambolsky D., Bochkov V., Tkachuk V., Erne P., Niermann T. LDL binds to surface-expressed human T-cadherin in transfected HEK293 cells and influences homophilic adhesive interaction // FEBS Lett –1999.
 18. Tkachuk V. A., Kuzmenko Y. S., Resink T. J., Stambolsky D. V., Bochkov V. N. Atypical Low-Density-Lipoprotein Binding-Site That May Mediate Lipoprotein-Induced Signal-Transduction // Molecular Pharmacology. – 1994. – T. 46, № 6. – C. 1129-1137.
 19. Suzuki K. G., Kasai R. S., Hirose K. M., Nemoto Y. L., Ishibashi M., Miwa Y., Fujiwara T. K., Kusumi A. Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function // Nat Chem Biol. – 2012. – T. 8, № 9. – C. 774-83.
 20. Hug C., Wang J., Ahmad N. S., Bogan J. S., Tsao T. S., Lodish H. F. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin // Proc Natl Acad Sci U S A –2004. – T. 101, № 28. – C. 10308-13.
 21. Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Hotta K., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T., Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. // Biochem Biophys Res Commun. – 1999. – T. 425, № 3. – C. 560-4.
 22. Kobayashi H., Ouchi N., Kihara S., Walsh K., Kumada M., Abe Y., Funahashi T., Matsuzawa Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high

- molecular weight form of adiponectin // *Circ Res.* – 2004. – T. 94, № 4. – C. e27-31.
23. Pajvani U. B., Hawkins M., Combs T. P., Rajala M. W., Doebber T., Berger J. P., Wagner J. A., Wu M., Knopps A., Xiang A. H., Utzschneider K. M., Kahn S. E., Olefsky J. M., Buchanan T. A., Scherer P. E. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity // *J Biol Chem.* – 2004. – T. 279, № 13. – C. 12152-62.
 24. Fujishima Y., Maeda N., Matsuda K., Masuda S., Mori T., Fukuda S., Sekimoto R., Yamaoka M., Obata Y., Kita S., Nishizawa H., Funahashi T., Ranscht B., Shimomura I. Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis // *FASEB Journal.* – 2017. – T. 31, № 4. – C. 1571-1583.
 25. Denzel M. S., Scimia M. C., Zumstein P. M., Walsh K., Ruiz-Lozano P., Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice // *J Clin Invest* –2010. – T. 120, № 12. – C. 4342-4352.
 26. Matsuda K., Fujishima Y., Maeda N., Mori T., Hirata A., Sekimoto R., Tsushima Y., Masuda S., Yamaoka M., Inoue K., Nishizawa H., Kita S., Ranscht B., Funahashi T., Shimomura I. Positive feedback regulation between adiponectin and T-cadherin impacts adiponectin levels in tissue and plasma of male mice // *Endocrinology.* – 2014.10.1210/en.2014-1618. – C. en20141618.
 27. Parker-Duffen J. L., Nakamura K., Silver M., Kikuchi R., Tigges U., Yoshida S., Denzel M. S., Ranscht B., Walsh K. T-cadherin Is Essential for Adiponectin-mediated Revascularization // *J Biol Chem.* – 2013. – T. 288, № 34. – C. 24886-24897.
 28. Ivanov D., Philippova M., Antropova J., Gubaeva F., Iljinskaya O., Tararak E., Bochkov V., Erne P., Resink T., Tkachuk V. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature // *Histochem Cell Biol.* – 2001. – T. 115, № 3. – C. 231-242.

29. 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. – T. 52, № 2. – C. 103-118.
30. 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 // *Mol Cell Biochem*. – 2014. – T. 387, № 1-2. – C. 39-53.
31. Stambolsky D. V., Kuzmenko Y. S., Philippova M. P., Bochkov V. N., Bespalova Z. D., Azmuko A. A., Kashirina N. M., Vlasik T. N., Tkachuk V. A., Resink T. J. Identification of 130 kDa cell surface LDL-binding protein from smooth muscle cells as a partially processed T-cadherin precursor // *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. – 1999. – T. 1416, № 1-2. – C. 155-160.
32. Ozawa M., Kemler R. Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin // *J Cell Biol*. – 1990. – T. 111, № 4. – C. 1645-50.
33. Maret D., Gruzglin E., Sadr M. S., Siu V., Shan W., Koch A. W., Seidah N. G., Del Maestro R. F., Colman D. R. Surface expression of precursor N-cadherin promotes tumor cell invasion // *Neoplasia*. – 2010. – T. 12, № 12. – C. 1066-80.
34. Haussinger D., Ahrens T., Aberle T., Engel J., Stetefeld J., Grzesiek S. Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography // *EMBO J*. – 2004. – T. 23, № 8. – C. 1699-708.
35. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2002. – T. 3, № 10. – C. 753-66.
36. Fukuda S., Kita S., Obata Y., Fujishima Y., Nagao H., Masuda S., Tanaka Y., Nishizawa H., Funahashi T., Takagi J., Maeda N., Shimomura I. The unique prodomain of T-cadherin plays a key role in adiponectin binding with the essential extracellular cadherin repeats 1 and 2 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017.10.1074/jbc.M117.780734.

37. Dames S. A., Bang E., Haussinger D., Ahrens T., Engel J., Grzesiek S. Insights into the low adhesive capacity of human T-cadherin from the NMR structure of Its N-terminal extracellular domain // *J Biol Chem* –2008. – T. 283, № 34. – C. 23485-95.
38. Nollet F., Kools P., van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members // *J Mol Biol.* – 2000. – T. 299, № 3. – C. 551-72.
39. Patel S. D., Chen C. P., Bahna F., Honig B., Shapiro L. Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family // *Curr Opin Struct Biol.* – 2003. – T. 13, № 6. – C. 690-8.
40. Tanihara H., Sano K., Heimark R. L., St John T., Suzuki S. Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin // *Cell Adhes Commun.* – 1994. – T. 2, № 1. – C. 15-26.
41. Nagar B., Overduin M., Ikura M., Rini J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization // *Nature.* – 1996. – T. 380, № 6572. – C. 360-4.
42. Pokutta S., Herrenknecht K., Kemler R., Engel J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding // *Eur J Biochem.* – 1994. – T. 223, № 3. – C. 1019-26.
43. Boggon T. J., Murray J., Chappuis-Flament S., Wong E., Gumbiner B. M., Shapiro L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms // *Science.* – 2002. – T. 296, № 5571. – C. 1308-13.
44. Harrison O. J., Bahna F., Katsamba P. S., Jin X., Brasch J., Vendome J., Ahlsen G., Carroll K. J., Price S. R., Honig B., Shapiro L. Two-step adhesive binding by classical cadherins // *Nat Struct Mol Biol.* – 2010. – T. 17, № 3. – C. 348-57.
45. Ozaki C., Obata S., Yamanaka H., Tominaga S., Suzuki S. T. The extracellular domains of E- and N-cadherin determine the scattered punctate localization in

- epithelial cells and the cytoplasmic domains modulate the localization // *J Biochem.* – 2010. – T. 147, № 3. – C. 415-25.
46. Vestal D. J., Ranscht B. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion // *J Cell Biol.* – 1992. – T. 119, № 2. – C. 451-461.
 47. Sharonov G. V., Balatskaya M. N., Tkachuk V. A. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins as Regulators of Cortical Cytoskeleton // *Biochemistry.* – 2016. – T. 81, № 6. – C. 636-50.
 48. Sacristian M. P., Vestal D. J., Dours-Zimmermann M. T., Ranscht B. T-Cadherin 2: Molecular Characterization, Function in Cell Adhesion, and Coexpression With T-Cadherin and N-Cadherin // *Journal of Neuroscience Research.* – 1993. – T. 34. – C. 664-680.
 49. Haselton F. R., Heimark R. L. Role of cadherins 5 and 13 in the aortic endothelial barrier // *J Cell Physiol.* – 1997. – T. 171, № 3. – C. 243-51.
 50. Philippova M., Joshi M. B., Kyriakakis E., Pfaff D., Erne P., Resink T. J. A guide and guard: The many faces of T-cadherin // *Cellular Signalling* – 2009. – T. 21, № 7. – C. 1035-1044.
 51. Liu T., Qian W. J., Gritsenko M. A., Camp D. G., 2nd, Monroe M. E., Moore R. J., Smith R. D. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry // *J Proteome Res.* – 2005. – T. 4, № 6. – C. 2070-80.
 52. Chen R., Jiang X., Sun D., Han G., Wang F., Ye M., Wang L., Zou H. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry // *J Proteome Res.* – 2009. – T. 8, № 2. – C. 651-61.
 53. Winterhalter P. R., Lommel M., Ruppert T., Strahl S. O-glycosylation of the non-canonical T-cadherin from rabbit skeletal muscle by single mannose residues // *FEBS Letters.* – 2013. – T. 587, № 22. – C. 3715-21.
 54. Doyle D. D., Goings G. E., Upshaw-Earley J., Page E., Ranscht B., Palfrey H. C. T-cadherin is a major glycoposphoinositol-anchored protein associated with

- noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – T. 273, № 12. – C. 6937-6943.
55. Bai S., Datta J., Jacob S. T., Ghoshal K. Treatment of PC12 cells with nerve growth factor induces proteasomal degradation of T-cadherin that requires tyrosine phosphorylation of its cadherin domain // *J Biol Chem* –2007. – T. 282, № 37. – C. 27171-80.
 56. Ranscht B., Bronner-Fraser M. T-cadherin expression alternates with migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo // *Development*. – 1991. – T. 111, № 1. – C. 15-22.
 57. Fredette B. J., Miller J., Ranscht B. Inhibition of motor axon growth by T-cadherin substrata // *Development*. – 1996. – T. 122, № 10. – C. 3163-71.
 58. Fredette B. J., Ranscht B. T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway // *J Neurosci*. – 1994. – T. 14, № 12. – C. 7331-46.
 59. Hayano Y., Zhao H., Kobayashi H., Takeuchi K., Norioka S., Yamamoto N. The role of T-cadherin in axonal pathway formation in neocortical circuits // *Development*. – 2014. – T. 141, № 24. – C. 4784-93.
 60. Takeuchi T., Ohtsuki Y. Recent progress in T-cadherin (CDH13, H-cadherin) research // *Histol Histopathol*. – 2001. – T. 16, № 4. – C. 1287-93.
 61. Hulpiau P., van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2009. – T. 41, № 2. – C. 349-69.
 62. Takeuchi T., Misaki A., Liang S. B., Tachibana A., Hayashi N., Sonobe H., Ohtsuki Y. Expression of T-cadherin (CDH13, H-Cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells // *J Neurochem*. – 2000. – T. 74, № 4. – C. 1489-97.
 63. Lee S. W. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer // *Nat Med*. – 1996. – T. 2, № 7. – C. 776-782.
 64. Kudrjashova E., Bashtrikov P., Bochkov V., Parfyonova Y., Tkachuk V., Antropova J., Iljinskaya O., Tararak E., Erne P., Ivanov D., Philippova M.,

- Resink T. J. Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis // *Histochem Cell Biol.* – 2002. – T. 118, № 4. – C. 281-290.
65. Kuzmenko Y., Kern F., Bochkov V., Tkachuk V., Resink T. Density- and proliferation status-depedent expression of T-acdherin, a novel lipoprotein-binding glycoprotein: a function in negative regulation of smooth muscle cell growth? // *FEBS Lett* –1998. – T. 434, № 1-2. – C. 183-187.
 66. Ivanov D., Philippova M., Allenspach R., Erne P., Resink T. T-cadherin upregulation correlates with cell-cycle progression and promotes proliferation of vascular cells // *Cardiovasc Res* –2004. – T. 64, № 1. – C. 132-43.
 67. Wyder L., Vitaliti A., Schneider H., Hebbard L. W., Moritz D. R., Wittmer M., Ajmo M., Klemenz R. Increased expression of H/T-cadherin in tumor-penetrating blood vessels // *Cancer Res.* – 2000. – T. 60, № 17. – C. 4682-8.
 68. Philippova M., Ivanov D., Tkachuk V., Erne P., Resink T. J. Polarisation of T-cadherin to the leading edge of migrating vascular cells in vitro: a function in vascular cell motility? // *Histochem Cell Biol* –2003. – T. 120, № 5. – C. 353-360.
 69. Philippova M. P., Bochkov V. N., Stambolsky D. V., Tkachuk V. A., Resink T. J. T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domains of vascular smooth muscle cells // *FEBS Lett.* – 1998. – T. 429, № 2. – C. 207-10.
 70. Kyriakakis E., Philippova M., Joshi M. B., Pfaff D., Bochkov V., Afonyushkin T., Erne P., Resink T. J. T-cadherin attenuates the PERK branch of the unfolded protein response and protects vascular endothelial cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis // *Cellular Signalling.* – 2010. – T. 22, № 9. – C. 1308-16.
 71. Zhou S., Matsuyoshi N., Liang S. B., Takeuchi T., Ohtsuki Y., Miyachi Y. Expression of T-cadherin in Basal keratinocytes of skin // *J Invest Dermatol.* – 2002. – T. 118, № 6. – C. 1080-4.

72. Anikina T. A., Sysoeva V. Y., Rubina K. A., Radzinsky V. E. Expression of mesenchymal cellular markers in the endometrium in health and in proliferative uterine diseases // *Akusherstvo i Ginekologiya*. – 2016. – T. 9_2016. – C. 79-86.
73. Niemann T., Kern F., Erne P., Resink T. The glycosyl phosphatidylinositol anchor of human T-cadherin binds lipoproteins // *Biochem Biophys Res Commun* –2000. – T. 276, № 3. – C. 1240-7.
74. Listyo A., Brand Y., Setz C., Radojevic V., Resink T., Levano S., Bodmer D. T-cadherin in the mammalian cochlea // *Laryngoscope*. – 2011. – T. 121, № 10. – C. 2228-33.
75. Tyrberg B., Miles P., Azizian K. T., Denzel M. S., Nieves M. L., Monosov E. Z., Levine F., Ranscht B. T-cadherin (Cdh13) in association with pancreatic beta-cell granules contributes to second phase insulin secretion // *Islets*. – 2011. – T. 3, № 6. – C. 327-337.
76. Koller E., Ranscht B. Differential targeting of T- and N-cadherin in polarized epithelial cells // *J Biol Chem*. – 1996. – T. 271, № 47. – C. 30061-30067.
77. Hou J. C., Shigematsu S., Crawford H. C., Anastasiadis P. Z., Pessin J. E. Dual regulation of Rho and Rac by p120 catenin controls adipocyte plasma membrane trafficking // *J Biol Chem*. – 2006. – T. 281, № 33. – C. 23307-12.
78. Liu B. H., Wang P. H., Wang Y. C., Cheng W. M., Mersmann H. J., Ding S. T. Fasting regulates the expression of adiponectin receptors in young growing pigs // *J Anim Sci* –2008. – T. 86, № 12. – C. 3377-84.
79. Kostopoulos C. G., Spiroglou S. G., Varakis J. N., Apostolakis E., Papadaki H. H. Adiponectin/T-cadherin and apelin/APJ expression in human arteries and periadventitial fat: implication of local adipokine signaling in atherosclerosis? // *Cardiovasc Pathol*. – 2014. – T. 23, № 3. – C. 131-8.
80. Riou P., Saffroy R., Chenailler C., Franc B., Gentile C., Rubinstein E., Resink T., Debuire B., Piatier-Tonneau D., Lemoine A. Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma // *FASEB J* –2006. – T. 20, № 13. – C. 2291-2301.

81. Joshi M. B., Philippova M., Ivanov D., Allenspach R., Erne P., Resink T. J. T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis // *FASEB J.* – 2005. – T. 19, № 12. – C. 1737-9.
82. Philippova M., Banfi A., Ivanov D., Gianni-Barrera R., Allenspach R., Erne P., Resink T. Atypical GPI-anchored T-cadherin stimulates angiogenesis in vitro and in vivo // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* –2006. – T. 26, № 10. – C. 2222-30.
83. Rubina K., Kalinina N., Potekhina A., Efimenko A., Semina E., Poliakov A., Wilkinson D. G., Parfyonova Y., Tkachuk V. T-cadherin suppresses angiogenesis in vivo by inhibiting migration of endothelial cells // *Angiogenesis* –2007. – T. 10, № 3. – C. 183-95.
84. Ghosh S., Joshi M. B., Ivanov D., Feder-Mengus C., Spagnoli G. C., Martin I., Erne P., Resink T. J. Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell-tumor cell interactions: a role for T-cadherin in tumor angiogenesis // *FEBS Lett* –2007. – T. 581, № 23. – C. 4523-4528.
85. Joshi M. B., Ivanov D., Philippova M., Erne P., Resink T. J. Integrin-linked kinase is an essential mediator for T-cadherin-dependent signaling via Akt and GSK3beta in endothelial cells // *FASEB J* –2007. – T. 21, № 12. – C. 3083-95.
86. Semina E. V., Rubina K. A., Rutkevich P. N., Voyno-Yasenetskaya T. A., Parfyonova Y. V., Tkachuk V. A. T-cadherin activates Rac1 and Cdc42 and changes endothelial permeability // *Biochemistry (Mosc).* – 2009. – T. 74, № 4. – C. 362-70.
87. Andreeva A. V., Kutuzov M. A., Tkachuk V. A., Voyno-Yasenetskaya T. A. T-cadherin is located in the nucleus and centrosomes in endothelial cells // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2009. – T. 297, № 5. – C. C1168-1177.
88. Joshi M. B., Kyriakakis E., Pfaff D., Rupp K., Philippova M., Erne P., Resink T. J. Extracellular cadherin repeat domains EC1 and EC5 of T-cadherin are essential for its ability to stimulate angiogenic behavior of endothelial cells // *FASEB J* –2009. – T. 23, № 11. – C. 4011-4021.

89. Andreeva A. V., Han J., Kutuzov M. A., Profirovic J., Tkachuk V. A., Voyno-Yasenetskaya T. A. T-cadherin modulates endothelial barrier function // *J Cell Physiol* –2010. – T. 223, № 1. – C. 94-102.
90. Kyriakakis E., Maslova K., Philippova M., Pfaff D., Joshi M. B., Buechner S. A., Erne P., Resink T. J. T-Cadherin is an auxiliary negative regulator of EGFR pathway activity in cutaneous squamous cell carcinoma: impact on cell motility // *J Invest Dermatol.* – 2012. – T. 132, № 9. – C. 2275-85.
91. Philippova M., Joshi M. B., Pfaff D., Kyriakakis E., Maslova K., Erne P., Resink T. J. T-cadherin attenuates insulin-dependent signalling, eNOS activation, and angiogenesis in vascular endothelial cells // *Cardiovasc Res.* – 2012. – T. 93, № 3. – C. 498-507.
92. Kyriakakis E., Maslova K., Frachet A., Ferri N., Contini A., Pfaff D., Erne P., Resink T. J., Philippova M. Cross-talk between EGFR and T-cadherin: EGFR activation promotes T-cadherin localization to intercellular contacts // *Cell Signal.* – 2013. – T. 25, № 5. – C. 1044-53.
93. Philippova M., Pfaff D., Kyriakakis E., Buechner S. A., Iezzi G., Spagnoli G. C., Schoenenberger A. W., Erne P., Resink T. J. T-cadherin loss promotes experimental metastasis of squamous cell carcinoma // *European Journal of Cancer.* – 2013. – T. 49, № 8. – C. 2048-58.
94. Frismantiene A., Pfaff D., Frachet A., Coen M., Joshi M. B., Maslova K., Bochaton-Piallat M. L., Erne P., Resink T. J., Philippova M. Regulation of contractile signaling and matrix remodeling by T-cadherin in vascular smooth muscle cells: constitutive and insulin-dependent effects // *Cellular Signalling.* – 2014. – T. 26, № 9. – C. 1897-908.
95. Maslova K., Kyriakakis E., Pfaff D., Frachet A., Frismantiene A., Bubendorf L., Ruiz C., Vlajnic T., Erne P., Resink T. J., Philippova M. EGFR and IGF-1R in regulation of prostate cancer cell phenotype and polarity: opposing functions and modulation by T-cadherin // *FASEB Journal.* – 2015. – T. 29, № 2. – C. 494-507.

96. Frismantiene A., Dasen B., Pfaff D., Erne P., Resink T. J., Philippova M. T-cadherin promotes vascular smooth muscle cell dedifferentiation via a GSK3 β -inactivation dependent mechanism // *Cellular Signalling*. – 2016. – T. 28, № 5. – C. 516-30.
97. Pencina M. J., D'Agostino R. B., Zdrojewski T., Williams K., Thanassoulis G., Furberg C. D., Peterson E. D., Vasan R. S., Sniderman A. D. Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C // *Eur J Prev Cardiol*. – 2015. – T. 22, № 10. – C. 1321-7.
98. Orlova E. V., Sherman M. B., Chiu W., Mowri H., Smith L. C., Gotto A. M., Jr. Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1999. – T. 96, № 15. – C. 8420-5.
99. Block L. H., Knorr M., Vogt E., Locher R., Vetter W., Groscurth P., Qiao B. Y., Pometta D., James R., Regenass M., et al. Low density lipoprotein causes general cellular activation with increased phosphatidylinositol turnover and lipoprotein catabolism // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1988. – T. 85, № 3. – C. 885-9.
100. Nofer J. R., Tepel M., Kehrel B., Wierwille S., Walter M., Seedorf U., Zidek W., Assmann G. Low-density lipoproteins inhibit the Na⁺/H⁺ antiport in human platelets. A novel mechanism enhancing platelet activity in hypercholesterolemia // *Circulation*. – 1997. – T. 95, № 6. – C. 1370-7.
101. Allen S., Khan S., Al-Mohanna F., Batten P., Yacoub M. Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells // *Journal of Clinical Investigation*. – 1998. – T. 101, № 5. – C. 1064-75.
102. Bochkov V. N., Rozhkova T. A., Matchin Yu G., Lyakishev A. A., Bochkova N. A., Borisova Yu L., Kukharchuk V. V., Tkachuk V. A. LDL- and agonist-induced Ca(2⁺)-mobilization in platelets of healthy subjects and in patients with

- familial hyperlipoproteinemia type II // *Thromb Res.* – 1991. – T. 61, № 4. – С. 403-9.
103. Bochkov V. N., Voino-Yasenetskaya T. A., Tkachuk V. A. Epinephrine potentiates activation of human platelets by low density lipoproteins // *Biochim Biophys Acta.* – 1991. – T. 1097, № 2. – С. 123-7.
 104. Bochkov V. N., Matchin Y. G., Fuki I. V., Lyakishev A. A., Tkachuk V. A. Platelets in patients with homozygous familial hypercholesterolemia are sensitive to Ca^{2+} -mobilizing activity of low density lipoproteins // *Atherosclerosis.* – 1992. – T. 96, № 2-3. – С. 119-24.
 105. Resink T. J., Bochkov V. N., Tkachuk V. A., Buhler F. R., Hahn A. W. Lipoproteins and angiotensin II exert synergistic effects on signalling processes in vascular smooth muscle cells // *J Hypertens Suppl.* – 1993. – T. 11, № 5. – С. S110-1.
 106. Resink T. J., Bochkov V. N., Hahn A. W., Philippova M. P., Buhler F. R., Tkachuk V. A. Low- and high-density lipoproteins as mitogenic factors for vascular smooth muscle cells: individual, additive and synergistic effects // *J Vasc Res.* – 1995. – T. 32, № 5. – С. 328-38.
 107. Seewald S., Nickenig G., Ko Y., Vetter H., Sachinidis A. Low density lipoprotein enhances the thrombin-induced growth of vascular smooth muscle cells // *Cardiovascular Research.* – 1997. – T. 36, № 1. – С. 92-100.
 108. Gonzalez-Timon B., Gonzalez-Munoz M., Z Z., S L., E.M M. Native and oxidized low density lipoproteins oppositely modulate the effects of insulin-like growth factor I on VSMC // *Cardiovascular Research.* – 2004. – T. 61, № 2. – С. 247-255.
 109. Бочков В. Н. Влияние липопротеидов на сигнальные и транскрипционные системы клеток крови и сосудистой стенки //. – 2005.
 110. Bochkov V. N., Tkachuk V. A., Philippova M. P., Stambolsky D. V., Buhler F. R., Resink T. J. Ligand selectivity of 105 kDa and 130 kDa lipoprotein-binding proteins in vascular-smooth-muscle-cell membranes is unique // *Biochemical Journal.* – 1996. – T. 317 (Pt 1). – С. 297-304.

111. Kuzmenko Y. S., Bochkov V. N., Philippova M. P., Tkachuk V. A., Resink T. J. Characterization of an atypical lipoprotein-binding protein in human aortic media membranes by ligand blotting // *Biochemical Journal*. – 1994. – T. 303 (Pt 1). – C. 281-7.
112. Betteridge D. J., Cooper M. B., Saggerson E. D., Prichard B. N., Tan K. C., Ling E., Barbera G., McCarthy S., Smith C. C. Platelet function in patients with hypercholesterolaemia // *European Journal of Clinical Investigation*. – 1994. – T. 24 Suppl 1. – C. 30-3.
113. Bochkov V. N., Kuz'menko E. S., Rezink T., Tkachuk V. A. ["Classical" apo B,E-receptor does not mediate the activating effect of low density lipoproteins on the second messenger system in human platelets and vascular smooth muscle cells] // *Biokhimiia*. – 1994. – T. 59, № 9. – C. 1330-9.
114. Nakano Y., Tobe T., Choi-Miura N. H., Mazda T., Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma // *J Biochem*. – 1996. – T. 120, № 4. – C. 803-12.
115. Nakano Y., Shoji A., Arakawa A., Iizuka Y., Kikuchi Y., Kobayashi M., Tobe T. Adiponectin does not bind to gelatin: a new and easy way to purify high-molecular-weight adiponectin from human plasma // *Journal of Lipid Research*. – 2010. – T. 51, № 1. – C. 210-5.
116. Scherer P. E., Williams S., Fogliano M., Baldini G., Lodish H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes // *J Biol Chem*. – 1995. – T. 270, № 45. – C. 26746-9.
117. Maeda K., Okubo K., Shimomura I., Funahashi T., Matsuzawa Y., Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1) // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1996. – T. 221, № 2. – C. 286-9.
118. Hu E. L. P., Spegelman B.M. AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – T. 271, № 18. – C. 10697-10703.

119. Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Terauchi Y., Kubota N., Hara K., Mori Y., Ide T., Murakami K., Tsuboyama-Kasaoka N., Ezaki O., Akanuma Y., Gavrilova O., Vinson C., Reitman M. L., Kagechika H., Shudo K., Yoda M., Nakano Y., Tobe K., Nagai R., Kimura S., Tomita M., Froguel P., Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity // *Nat Med.* – 2001. – T. 7, № 8. – C. 941-6.
120. Kojima S., Funahashi T., Sakamoto T., Miyamoto S., Soejima H., Hokamaki J., Kajiwarra I., Sugiyama S., Yoshimura M., Fujimoto K., Miyao Y., Suefuji H., Kitagawa A., Ouchi N., Kihara S., Matsuzawa Y., Ogawa H. The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction // *Heart.* – 2003. – T. 89, № 6. – C. 667.
121. Kumada M., Kihara S., Sumitsuji S. Association of Hypoadiponectinemia With Coronary Artery Disease in Men // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – T. 23, № 1. – C. 85-89.
122. Fruebis J., Tsao T. S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M. R., Yen F. T., Bihain B. E., Lodish H. F. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – T. 98, № 4. – C. 2005-10.
123. Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Imai Y., Shimozawa N., Hioki K., Uchida S., Ito Y., Takakuwa K., Matsui J., Takata M., Eto K., Terauchi Y., Komeda K., Tsunoda M., Murakami K., Ohnishi Y., Naitoh T., Yamamura K., Ueyama Y., Froguel P., Kimura S., Nagai R., Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis // *Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – T. 278, № 4. – C. 2461-8.
124. Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome // *J Clin Invest.* – 2006. – T. 116, № 7. – C. 1784-92.

125. Kadowaki T., Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors // *Endocrine Reviews*. – 2005. – T. 26, № 3. – C. 439-51.
126. Radjainia M., Wang Y., Mitra A. K. Structural polymorphism of oligomeric adiponectin visualized by electron microscopy // *J Mol Biol*. – 2008. – T. 381, № 2. – C. 419-30.
127. Berg A. H., Combs T. P., Scherer P. E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism // *Trends Endocrinol Metab*. – 2002. – T. 13, № 2. – C. 84-9.
128. Waki H., Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Uchida S., Kita S., Hara K., Hada Y., Vasseur F., Froguel P., Kimura S., Nagai R., Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin // *J Biol Chem*. – 2003. – T. 278, № 41. – C. 40352-63.
129. Pajvani U. B., Du X., Combs T. P., Berg A. H., Rajala M. W., Schulthess T., Engel J., Brownlee M., Scherer P. E. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity // *J Biol Chem*. – 2003. – T. 278, № 11. – C. 9073-85.
130. Wang Y., Lam K. S., Chan L., Chan K. W., Lam J. B., Lam M. C., Hoo R. C., Mak W. W., Cooper G. J., Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – T. 281, № 24. – C. 16391-400.
131. Schraw T., Wang Z. V., Halberg N., Hawkins M., Scherer P. E. Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics // *Endocrinology*. – 2008. – T. 149, № 5. – C. 2270-82.
132. Hotta K., Funahashi T., Arita Y., Takahashi M., Matsuda M., Okamoto Y., Iwahashi H., Kuriyama H., Ouchi N., Maeda K., Nishida M., Kihara S., Sakai N., Nakajima T., Hasegawa K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Nakamura T., Yamashita S., Hanafusa T., Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients //

- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2000. – T. 20, № 6. – C. 1595-9.
133. Nishizawa H., Shimomura I., Kishida K., Maeda N., Kuriyama H., Nagaretani H., Matsuda M., Kondo H., Furuyama N., Kihara S., Nakamura T., Tochino Y., Funahashi T., Matsuzawa Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein // *Diabetes*. – 2002. – T. 51, № 9. – C. 2734-41.
 134. Xu A., Chan K. W., Hoo R. L., Wang Y., Tan K. C., Zhang J., Chen B., Lam M. C., Tse C., Cooper G. J., Lam K. S. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – T. 280, № 18. – C. 18073-80.
 135. Daniele A., De Rosa A., De Cristofaro M., Monaco M. L., Masullo M., Porcile C., Capasso M., Tedeschi G., Oriani G., Di Costanzo A. Decreased concentration of adiponectin together with a selective reduction of its high molecular weight oligomers is involved in metabolic complications of myotonic dystrophy type 1 // *European Journal of Endocrinology*. – 2011. – T. 165, № 6. – C. 969-75.
 136. De Rosa A., Monaco M. L., Capasso M., Forestieri P., Pilone V., Nardelli C., Buono P., Daniele A. Adiponectin oligomers as potential indicators of adipose tissue improvement in obese subjects // *European Journal of Endocrinology*. – 2013. – T. 169, № 1. – C. 37-43.
 137. Horakova D., Azeem K., Benesova R., Pastucha D., Horak V., Dumbrovska L., Martinek A., Novotny D., Svagera Z., Hobzova M., Galuszkova D., Janout V., Donevska S., Vrbkova J., Kollarova H. Total and High Molecular Weight Adiponectin Levels and Prediction of Cardiovascular Risk in Diabetic Patients // *Int J Endocrinol*. – 2015. – T. 2015. – C. 545068.
 138. Pischon T., Hu F. B., Girman C. J., Rifai N., Manson J. E., Rexrode K. M., Rimm E. B. Plasma total and high molecular weight adiponectin levels and risk of coronary heart disease in women // *Atherosclerosis*. – 2011. – T. 219, № 1. – C. 322-9.

139. Ling H., Waterworth D. M., Stirnadel H. A., Pollin T. I., Barter P. J., Kesaniemi Y. A., Mahley R. W., McPherson R., Waeber G., Bersot T. P., Cohen J. C., Grundy S. M., Mooser V. E., Mitchell B. D. Genome-wide linkage and association analyses to identify genes influencing adiponectin levels: the GEMS Study // *Obesity (Silver Spring)*. – 2009. – T. 17, № 4. – C. 737-44.
140. Wu Y., Li Y., Lange E. M., Croteau-Chonka D. C., Kuzawa C. W., McDade T. W., Qin L., Curocichin G., Borja J. B., Lange L. A., Adair L. S., Mohlke K. L. Genome-wide association study for adiponectin levels in Filipino women identifies CDH13 and a novel uncommon haplotype at KNG1-ADIPOQ // *Hum Mol Genet.* – 2010. – T. 19, № 24. – C. 4955-64.
141. Jee S. H., Sull J. W., Lee J. E., Shin C., Park J., Kimm H., Cho E. Y., Shin E. S., Yun J. E., Park J. W., Kim S. Y., Lee S. J., Jee E. J., Baik I., Kao L., Yoon S. K., Jang Y., Beatty T. H. Adiponectin concentrations: a genome-wide association study // *Am J Hum Genet.* – 2010. – T. 87, № 4. – C. 545-52.
142. Jo J., Sull J. W., Park E. J., Jee S. H. Effects of smoking and obesity on the association between CDH13 (rs3865188) and adiponectin among Korean men: the KARE study // *Obesity (Silver Spring)*. – 2012. – T. 20, № 8. – C. 1683-7.
143. Morisaki H., Yamanaka I., Iwai N., Miyamoto Y., Kokubo Y., Okamura T., Okayama A., Morisaki T. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population // *Hum Mutat.* – 2012. – T. 33, № 2. – C. 402-10.
144. Aslibekyan S., An P., Frazier-Wood A. C., Kabagambe E. K., Irvin M. R., Straka R. J., Tiwari H. K., Tsai M. Y., Hopkins P. N., Borecki I. B., Ordovas J. M., Arnett D. K. Preliminary evidence of genetic determinants of adiponectin response to fenofibrate in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2013. – T. 23, № 10. – C. 987-94.
145. Soccio T., Zhang Y. Y., Bacci S., Mlynarski W., Placha G., Raggio G., Di Paola R., Marucci A., Johnstone M. T., Gervino E. V., Abumrad N. A., Klein S., Trischitta V., Doria A. Common haplotypes at the adiponectin receptor 1

- (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes // *Diabetes*. – 2006. – T. 55, № 10. – C. 2763-70.
146. Siitonen N., Pulkkinen L., Lindstrom J., Kolehmainen M., Schwab U., Eriksson J. G., Ilanne-Parikka P., Keinanen-Kiukkaanniemi S., Tuomilehto J., Uusitupa M. Association of ADIPOR2 gene variants with cardiovascular disease and type 2 diabetes risk in individuals with impaired glucose tolerance: the Finnish Diabetes Prevention Study // *Cardiovasc Diabetol*. – 2011. – T. 10. – C. 83.
 147. Halvatsiotis I., Tsiotra P. C., Ikonomidis I., Kollias A., Mitrou P., Maratou E., Boutati E., Lekakis J., Dimitriadis G., Economopoulos T., Kremastinos D. T., Raptis S. A. Genetic variation in the adiponectin receptor 2 (ADIPOR2) gene is associated with coronary artery disease and increased ADIPOR2 expression in peripheral monocytes // *Cardiovasc Diabetol*. – 2010. – T. 9. – C. 10.
 148. Broedl U. C., Lehrke M., Fleischer-Brielmaier E., Tietz A. B., Nagel J. M., Goke B., Lohse P., Parhofer K. G. Genetic variants of adiponectin receptor 2 are associated with increased adiponectin levels and decreased triglyceride/VLDL levels in patients with metabolic syndrome // *Cardiovasc Diabetol*. – 2006. – T. 5. – C. 11.
 149. Dhillon P. K., Penney K. L., Schumacher F., Rider J. R., Sesso H. D., Pollak M., Fiorentino M., Finn S., Loda M., Rifai N., Mucci L. A., Giovannucci E., Stampfer M. J., Ma J. Common polymorphisms in the adiponectin and its receptor genes, adiponectin levels and the risk of prostate cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2011. – T. 20, № 12. – C. 2618-27.
 150. Cohen S. S., Gammon M. D., North K. E., Millikan R. C., Lange E. M., Williams S. M., Zheng W., Cai Q., Long J., Smith J. R., Signorello L. B., Blot W. J., Matthews C. E. ADIPOQ, ADIPOR1, and ADIPOR2 polymorphisms in relation to serum adiponectin levels and BMI in black and white women // *Obesity (Silver Spring)*. – 2011. – T. 19, № 10. – C. 2053-62.
 151. Peters K. E., Beilby J., Cadby G., Warrington N. M., Bruce D. G., Davis W. A., Davis T. M., Wiltshire S., Knuiman M., McQuillan B. M., Palmer L. J.,

- Thompson P. L., Hung J. A comprehensive investigation of variants in genes encoding adiponectin (ADIPOQ) and its receptors (ADIPOR1/R2), and their association with serum adiponectin, type 2 diabetes, insulin resistance and the metabolic syndrome // BMC Medical Genetics. – 2013. – T. 14. – C. 15.
152. Alobeidy B. F., Li C., Alzobair A. A., Liu T., Zhao J., Fang Y., Zheng F. The Association Study between Twenty One Polymorphisms in Seven Candidate Genes and Coronary Heart Diseases in Chinese Han Population // PLoS One. – 2013. – T. 8, № 6. – C. e66976.
153. Saudan P., Bachmann M. Methods and compositions for modulating the interaction between adiponectin and its receptor //, 2006.
154. Suzuki S., Wilson-Kubalek E. M., Wert D., Tsao T. S., Lee D. H. The oligomeric structure of high molecular weight adiponectin // FEBS Lett. – 2007. – T. 581, № 5. – C. 809-14.
155. Bouskila M., Pajvani U. B., Scherer P. E. Adiponectin: a relevant player in PPARgamma-agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity? // International Journal of Obesity. – 2005. – T. 29 Suppl 1. – C. S17-23.
156. Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., Murakami K., Ohteki T., Uchida S., Takekawa S., Waki H., Tsuno N. H., Shibata Y., Terauchi Y., Froguel P., Tobe K., Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R., Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects // Nature. – 2003. – T. 423, № 6941. – C. 762-9.
157. Yamauchi T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work // Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2014. – T. 28, № 1. – C. 15-23.
158. Iwabu M., Okada-Iwabu M., Yamauchi T., Kadowaki T. Adiponectin/adiponectin receptor in disease and aging // NPJ Aging Mech Dis. – 2015. – T. 1. – C. 15013.

159. Wang Z. V., Scherer P. E. Adiponectin, the past two decades // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2016. – T. 8, № 2. – C. 93-100.
160. Kosel D., Heiker J. T., Juhl C., Wottawah C. M., Bluher M., Morl K., Beck-Sickinger A. G. Dimerization of adiponectin receptor 1 is inhibited by adiponectin // *Journal of Cell Science*. – 2010. – T. 123, № Pt 8. – C. 1320-8.
161. Almabouada F., Diaz-Ruiz A., Rabanal-Ruiz Y., Peinado J. R., Vazquez-Martinez R., Malagon M. M. Adiponectin receptors form homomers and heteromers exhibiting distinct ligand binding and intracellular signaling properties // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – T. 288, № 5. – C. 3112-25.
162. Lee M. H., Klein R. L., El-Shewy H. M., Luttrell D. K., Luttrell L. M. The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth // *Biochemistry*. – 2008. – T. 47, № 44. – C. 11682-92.
163. Heldin C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction // *Cell*. – 1995. – T. 80, № 2. – C. 213-23.
164. Lemmon M. A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // *Cell*. – 2010. – T. 141, № 7. – C. 1117-34.
165. Chung I., Akita R., Vandlen R., Toomre D., Schlessinger J., Mellman I. Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells // *Nature*. – 2010. – T. 464, № 7289. – C. 783-7.
166. Low-Nam S. T., Lidke K. A., Cutler P. J., Roovers R. C., van Bergen en Henegouwen P. M., Wilson B. S., Lidke D. S. ErbB1 dimerization is promoted by domain co-confinement and stabilized by ligand binding // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2011. – T. 18, № 11. – C. 1244-9.
167. Farran B. An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers // *Pharmacological Research*. – 2017. – T. 117. – C. 303-327.
168. Gahbauer S., Bockmann R. A. Membrane-Mediated Oligomerization of G Protein Coupled Receptors and Its Implications for GPCR Function // *Front Physiol*. – 2016. – T. 7. – C. 494.

169. Lin H., Liu A. P., Smith T. H., Trejo J. Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors // *Pharmacological Reviews*. – 2013. – T. 65, № 4. – C. 1198-213.
170. Monnier C., Tu H., Bourrier E., Vol C., Lamarque L., Trinquet E., Pin J. P., Rondard P. Trans-activation between 7TM domains: implication in heterodimeric GABAB receptor activation // *EMBO Journal*. – 2011. – T. 30, № 1. – C. 32-42.
171. Kniazeff J., Prezeau L., Rondard P., Pin J. P., Goudet C. Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2011. – T. 130, № 1. – C. 9-25.
172. Meyer B. H., Segura J. M., Martinez K. L., Hovius R., George N., Johnsson K., Vogel H. FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – T. 103, № 7. – C. 2138-43.
173. Paulick M. G., Bertozzi C. R. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins // *Biochemistry*. – 2008. – T. 47, № 27. – C. 6991-7000.
174. Um J. W., Ko J. Neural Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Synaptic Specification // *Trends in Cell Biology*. – 2017. – T. 27, № 12. – C. 931-945.
175. Kinoshita T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. – 2014. – T. 90, № 4. – C. 130-43.
176. Makrythanasis P., Kato M., Zaki M. S., Saitsu H., Nakamura K., Santoni F. A., Miyatake S., Nakashima M., Issa M. Y., Guipponi M., Letourneau A., Logan C. V., Roberts N., Parry D. A., Johnson C. A., Matsumoto N., Hamamy H., Sheridan E., Kinoshita T., Antonarakis S. E., Murakami Y. Pathogenic Variants in PIGG Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia // *American Journal of Human Genetics*. – 2016. – T. 98, № 4. – C. 615-26.

177. Brown D. A., Rose J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface // *Cell*. – 1992. – T. 68, № 3. – C. 533-44.
178. Hanada K., Nishijima M., Akamatsu Y., Pagano R. E. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – T. 270, № 11. – C. 6254-60.
179. Schroeder R., London E., Brown D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – T. 91, № 25. – C. 12130-4.
180. Simons K., van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells // *Biochemistry*. – 1988. – T. 27, № 17. – C. 6197-202.
181. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // *Nature*. – 1997. – T. 387, № 6633. – C. 569-72.
182. Mayor S., Maxfield F. R. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment // *Molecular Biology of the Cell*. – 1995. – T. 6, № 7. – C. 929-44.
183. Schuck S., Honsho M., Ekroos K., Shevchenko A., Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – T. 100, № 10. – C. 5795-800.
184. Casadei B. R., Domingues C. C., de Paula E., Riske K. A. Direct visualization of the action of Triton X-100 on giant vesicles of erythrocyte membrane lipids // *Biophysical Journal*. – 2014. – T. 106, № 11. – C. 2417-25.
185. Kusumi A., Fujiwara T. K., Morone N., Yoshida K. J., Chadda R., Xie M., Kasai R. S., Suzuki K. G. Membrane mechanisms for signal transduction: the coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced

- compartments and dynamic protein complexes // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2012. – T. 23, № 2. – C. 126-44.
186. Pike L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function // *Journal of Lipid Research*. – 2006. – T. 47, № 7. – C. 1597-8.
 187. Klotzsch E., Schutz G. J. A critical survey of methods to detect plasma membrane rafts // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 2013. – T. 368, № 1611. – C. 20120033.
 188. Suzuki K. G., Fujiwara T. K., Edidin M., Kusumi A. Dynamic recruitment of phospholipase C gamma at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP3-Ca²⁺ signaling: single-molecule tracking study 2 // *Journal of Cell Biology*. – 2007. – T. 177, № 4. – C. 731-42.
 189. Suzuki K. G., Fujiwara T. K., Sanematsu F., Iino R., Edidin M., Kusumi A. GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G alpha for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1 // *J Cell Biol*. – 2007. – T. 177, № 4. – C. 717-30.
 190. Suzuki K. G. New insights into the organization of plasma membrane and its role in signal transduction // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2015. – T. 317. – C. 67-96.
 191. Sevcsik E., Brameshuber M., Folser M., Weghuber J., Honigmann A., Schutz G. J. GPI-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane // *Nature Communications*. – 2015. – T. 6. – C. 6969.
 192. Pike L. J. The challenge of lipid rafts // *Journal of Lipid Research*. – 2009. – T. 50 Suppl. – C. S323-8.
 193. Binder W. H., Barragan V., Menger F. M. Domains and rafts in lipid membranes // *Angewandte Chemie. International Edition in English*. – 2003. – T. 42, № 47. – C. 5802-27.
 194. Brown D. A. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals // *Physiology (Bethesda)*. – 2006. – T. 21. – C. 430-9.

195. Боздаганян М. Е., Шайтан К. В. Исследование структуры рафтов биологических мембран методами компьютерного моделирования // Клиническая практика (журнал ФМБА России). – 2016. № 4. – С. 9-14.
196. Galimzyanov T. R., Molotkovsky R. J., Bozdaganyan M. E., Cohen F. S., Pohl P., Akimov S. A. Elastic Membrane Deformations Govern Interleaflet Coupling of Lipid-Ordered Domains // *Physical Review Letters*. – 2015. – Т. 115, № 8. – С. 088101.
197. Zacharias D. A., Violin J. D., Newton A. C., Tsien R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells // *Science*. – 2002. – Т. 296, № 5569. – С. 913-6.
198. Benting J., Rietveld A., Ansorge I., Simons K. Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro // *FEBS Letters*. – 1999. – Т. 462, № 1-2. – С. 47-50.
199. Raghupathy R., Anilkumar A. A., Polley A., Singh P. P., Yadav M., Johnson C., Suryawanshi S., Saikam V., Sawant S. D., Panda A., Guo Z., Vishwakarma R. A., Rao M., Mayor S. Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins // *Cell*. – 2015. – Т. 161, № 3. – С. 581-94.
200. Head B. P., Patel H. H., Insel P. A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – Т. 1838, № 2. – С. 532-45.
201. Honigsmann A., Pralle A. Compartmentalization of the Cell Membrane // *Journal of Molecular Biology*. – 2016. – Т. 428, № 24 Pt A. – С. 4739-4748.
202. Kusumi A., Suzuki K. G., Kasai R. S., Ritchie K., Fujiwara T. K. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2011. – Т. 36, № 11. – С. 604-15.
203. Niemela P. S., Ollila S., Hyvonen M. T., Karttunen M., Vattulainen I. Assessing the nature of lipid raft membranes // *PLoS Computational Biology*. – 2007. – Т. 3, № 2. – С. e34.

204. Bozdaganyan M. E., Shaitan K. V. Raft Formation in Biological Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study // *Biochemistry, Supplemental Series A*. – 2014. – T. 8, № 4. – С. 290-296.
205. Bennett W. F., Tieleman D. P. Computer simulations of lipid membrane domains // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – T. 1828, № 8. – С. 1765-76.
206. Eggeling C., Honigsmann A. Closing the gap: The approach of optical and computational microscopy to uncover biomembrane organization // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – T. 1858, № 10. – С. 2558-2568.
207. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // *Annalen der Physik*. – 1948. – T. 437. – С. 55-75.
208. Sun Y., Wallrabe H., Seo S. A., Periasamy A. FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth // *Chemphyschem*. – 2011. – T. 12, № 3. – С. 462-74.
209. Principles of Fluorescence Spectroscopy. / Lakowicz J. R. – 2 изд.: Springer US, 1999.
210. Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler // *Annual Review of Biochemistry*. – 1978. – T. 47. – С. 819-46.
211. Kenworthy A. K., Edidin M. Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer // *Journal of Cell Biology*. – 1998. – T. 142, № 1. – С. 69-84.
212. Varma R., Mayor S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface // *Nature*. – 1998. – T. 394, № 6695. – С. 798-801.
213. Sharma P., Varma R., Sarasij R. C., Ira, Gousset K., Krishnamoorthy G., Rao M., Mayor S. Nanoscale Organization of Multiple GPI-Anchored Proteins in Living Cell Membranes // *Cell*. – 2004. – T. 116, № 4. – С. 577-589.
214. Caiolfa V. R., Zamai M., Malengo G., Andolfo A., Madsen C. D., Sutin J., Digman M. A., Gratton E., Blasi F., Sidenius N. Monomer dimer dynamics and

- distribution of GPI-anchored uPAR are determined by cell surface protein assemblies // *Journal of Cell Biology*. – 2007. – Т. 179, № 5. – С. 1067-82.
215. Tavares E., Macedo J. A., Paulo P. M., Tavares C., Lopes C., Melo E. P. Live-cell FRET imaging reveals clustering of the prion protein at the cell surface induced by infectious prions // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – Т. 1842, № 7. – С. 981-91.
216. Eden G., Archinti M., Furlan F., Murphy R., Degryse B. The urokinase receptor interactome // *Current Pharmaceutical Design*. – 2011. – Т. 17, № 19. – С. 1874-89.
217. Philippova M., Ivanov D., Joshi M. B., Kyriakakis E., Rupp K., Afonyushkin T., Bochkov V., Erne P., Resink T. J. Identification of proteins associating with glycosylphosphatidylinositol- anchored T-cadherin on the surface of vascular endothelial cells: role for Grp78/BiP in T-cadherin-dependent cell survival // *Mol Cell Biol* –2008. – Т. 28, № 12. – С. 4004-4017.
218. 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 Пушкино, 2017. – С. 404-409.
219. Nakamura S., Takizawa H., Shimazawa M., Hashimoto Y., Sugitani S., Tsuruma K., Hara H. Mild endoplasmic reticulum stress promotes retinal neovascularization via induction of BiP/GRP78 // *PLoS One*. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. e60517.
220. Rambold A. S., Muller V., Ron U., Ben-Tal N., Winklhofer K. F., Tatzelt J. Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions // *EMBO Journal*. – 2008. – Т. 27, № 14. – С. 1974-84.
221. Nemoto Y. L., Morris R. J., Hijikata H., Tsunoyama T. A., Shibata A. C. E., Kasai R. S., Kusumi A., Fujiwara T. K. Dynamic Meso-Scale Anchorage of GPI-Anchored Receptors in the Plasma Membrane: Prion Protein vs. Thy1 // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – Т. 75, № 3-4. – С. 399-412.

222. Cairrao E., Santos-Silva A. J., Alvarez E., Correia I., Verde I. Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels // *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal.* – 2009. – Т. 45, № 3-4. – С. 175-84.
223. Ulrich-Merzenich G., Metzner C., Bhonde R. R., Malsch G., Schiermeyer B., Vetter H. Simultaneous isolation of endothelial and smooth muscle cells from human umbilical artery or vein and their growth response to low-density lipoproteins // *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal.* – 2002. – Т. 38, № 5. – С. 265-72.
224. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Т. 227, № 5259. – С. 680-5.
225. Семина Е.В. Р. К. А., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И., Григорьева О.А., Иванова Д.П., Егоров А.Д., Дыйканов Д.Т., Балацкая М.Н. Современные методы лабораторных исследований в регенеративной медицине. / Под ред. Семина Е.В. С. В. Ю., Рубина К.А., Калинина Н.И. – Москва, 2014. – 108 с.
226. Kogan A. E., Filatov V. L., Kolosova O. V., Katrukha I. A., Mironova E. V., Zhuravleva N. S., Nagibin O. A., Kara A. N., Bereznikova A. V., Katrukha A. G. Oligomeric adiponectin forms and their complexes in the blood of healthy donors and patients with type 2 diabetes mellitus // *J Immunoassay Immunochem.* – 2013. – Т. 34, № 2. – С. 180-96.
227. German J. B., Smilowitz J. T., Zivkovic A. M. Lipoproteins: When size really matters // *Curr Opin Colloid Interface Sci.* – 2006. – Т. 11, № 2-3. – С. 171-183.
228. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum // *J Clin Invest.* – 1955. – Т. 34, № 9. – С. 1345-53.
229. Oncley J. L., Harvie N. R. Lipoproteins--a current perspective of methods and concepts // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1969. – Т. 64, № 3. – С. 1107-18.

230. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Т. 193, № 1. – С. 265-75.
231. Hoofnagle. Lipoproteomics: Using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins // *Journal of lipid research*. – 2009.
232. Ai H. W., Henderson J. N., Remington S. J., Campbell R. E. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging // *Biochemical Journal*. – 2006. – Т. 400, № 3. – С. 531-40.
233. Zhou Z., Cironi P., Lin A. J., Xu Y., Hrvatin S., Golan D. E., Silver P. A., Walsh C. T., Yin J. Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases // *ACS Chemical Biology*. – 2007. – Т. 2, № 5. – С. 337-46.
234. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. – 1990. – Т. 96, № 1. – С. 23-8.
235. 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. – С. 56-63.
236. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // *Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – Т. 260, № 6. – С. 3440-50.
237. Sharonov G. V., Mozgovaja 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.
238. Berney C., Danuser G. FRET or no FRET: a quantitative comparison // *Biophysical Journal*. – 2003. – Т. 84, № 6. – С. 3992-4010.

239. Gordon G. W., Berry G., Liang X. H., Levine B., Herman B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy // *Biophysical Journal*. – 1998. – Т. 74, № 5. – С. 2702-13.
240. Douglas C. Youvan, Christopher M. Silva, Edward J. Bylina, William J. Coleman, Michael R. Dilworth, Yang M. M. Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivatives on Nickel Chelating Beads // *Biotechnology et alia*. – 1997. – Т. 3. – С. 1-18.
241. Xia Z., Liu Y. Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes // *Biophysical Journal*. – 2001. – Т. 81, № 4. – С. 2395-402.
242. 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 // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – Т. 14, № 10. – С. 2045-2057.
243. Kelley L. A., Sternberg M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server // *Nature Protocols*. – 2009. – Т. 4, № 3. – С. 363-71.
244. Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., Sternberg M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // *Nature Protocols*. – 2015. – Т. 10, № 6. – С. 845-58.
245. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis // *J Comput Chem*. – 2004. – Т. 25, № 13. – С. 1605-12.
246. Schutz G. J., Kada G., Pastushenko V. P., Schindler H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy // *EMBO Journal*. – 2000. – Т. 19, № 5. – С. 892-901.
247. Балацкая М. Н., Баглай А. И., Шаронов Г. В., Ткачук В. А. Механизм сигнализации гликозилфосфатидилинозитид-заякоренного рецептора Т-

- кадгерина при связывании с липопротеидами низкой. – Пушино, 2017. – С. 117-122.
248. Vogel S. S., Nguyen T. A., van der Meer B. W., Blank P. S. The impact of heterogeneity and dark acceptor states on FRET: implications for using fluorescent protein donors and acceptors // PLoS ONE. – 2012. – Т. 7, № 11. – С. e49593.
 249. Lipid Rafts and Caveolae: From Membrane Biophysics to Cell Biology. / Fielding C. J.: Wiley, 2006.
 250. Wang Y., Wang X., Jasmin J. F., Lau W. B., Li R., Yuan Y., Yi W., Chuprun K., Lisanti M. P., Koch W. J., Gao E., Ma X. L. Essential role of caveolin-3 in adiponectin signalsome formation and adiponectin cardioprotection // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2012. – Т. 32, № 4. – С. 934-42.
 251. Liu G. Z., Liang B., Lau W. B., Wang Y., Zhao J., Li R., Wang X., Yuan Y., Lopez B. L., Christopher T. A., Xiao C., Ma X. L. High glucose/High Lipids impair vascular adiponectin function via inhibition of caveolin-1/AdipoR1 signalsome formation // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – Т. 89. – С. 473-85.
 252. Cheng J. P. X., Nichols B. J. Caveolae: One Function or Many? // Trends in Cell Biology. – 2016. – Т. 26, № 3. – С. 177-189.
 253. Hug C., Lodish H. F. Use Of T-Cadherin As A Target // 2005.
 254. Ranscht B, Danzel M. Methods and compositions related to the interaction of T-cadherin and adiponectin // 2010.