

РЕОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ

© А. С. Шахов, В. Б. Дугина, И. Б. Алиева¹

*Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;*

¹ *электронный адрес: irina_alieva@belozersky.msu.ru*

Эндотелиальные клетки, плотно прилегающие друг к другу и выстилающие внутреннюю поверхность всех сосудов организма, обеспечивают регуляцию проницаемости сосудистой стенки и обмен между циркулирующей в сосудах кровью и тканевой жидкостью тех органов, в которых эти сосуды расположены. В условиях *in vitro* монослой эндотелиоцитов сохраняет основную — барьерную — функцию нативного эндотелия, в связи с чем его можно использовать как модельную систему в экспериментах по исследованию взаимодействия цитоскелетных и адгезионных структур эндотелиоцитов. В настоящей работе культивируемый монослой клеток эндотелия вены человека использовали для количественной оценки изменений цитоскелета эндотелиальных клеток от момента расплывания и образования первых межклеточных контактов до формирования конфлюэнтного монослоя. Система актиновых филаментов в клетках венозного эндотелия представлена кортикальной сетью актина и пучками актиновых стресс-фибрилл, организованных параллельно субстрату. В клетках экспрессируются две основные немускульные изоформы актина — β - и γ -цитоплазматические актины. При мечении антителами против β -актина обнаруживаются пучки актиновых фибрилл, в то время как антитела против γ -актина выявляют кортикальную и ламеллярную сети. Для оценки состояния структур актинового цитоскелета анализировали интенсивность их флуоресценции в районе свободного края и в области контакта с соседней клеткой. Интенсивность флуоресценции β -актиновых структур оказалась выше в областях контакта. Интенсивность флуоресценции γ -актиновых структур была наибольшей на ведущих краях ламелл и наименьшей — на стабильных краях в клетках с большой протяженностью межклеточных контактов. Формирование эндотелиального монослоя сопровождалось изменениями в системе микротрубочек: их количество увеличивалось на краю клетки, причем количество микротрубочек в районе уже сформированных межклеточных контактов всегда было выше, чем в области свободной ламеллы клетки.

Ключевые слова: эндотелий, цитоскелет эндотелиальных клеток, γ -актин, β -актин, микротрубочки.

Эндотелий образован специализированными клетками — эндотелиоцитами, которые монослоем выстилают внутреннюю поверхность сосудов. Эндотелий функционирует как селективный проницаемый барьер между циркулирующей в сосудах кровью и тканевой жидкостью тех органов, в которых сосуды расположены, принимая, таким образом, участие в регуляции транспорта макромолекул и движении клеток крови сквозь стенку сосуда. Целостность эндотелия сосудов любого органа критична для сохранения его функции. Так, эндотелий роговицы глаза обеспечивает ее нормальную проницаемость и обмен с соединительнотканной стромой (Jalimarada et al., 2009), а эндотелий сосудов легкого регулирует движение жидкостей, макромолекул и лейкоцитов в интерстиций и воздушное пространство альвеол (Garcia et al., 1995; Lum, Malik, 1996).

Эндотелиальный барьер динамичен и очень чувствителен к воздействию различных стимулов как естественного физиологического, так и патологического проис-

хождения. Основная роль в осуществлении барьерной функции принадлежит эндотелиальному цитоскелету. Изменение его нормальной архитектуры приводит к изменению формы эндотелиоцитов, появлению промежутков между плотно соприкасающимися клетками, а значит, к повышению сосудистой проницаемости (Garcia et al., 1995; Lum, Malik, 1996; Mehta, Malik, 2006).

Цитоскелет эндотелиоцитов, как и цитоскелет других типов клеток, представлен тремя типами филаментов, в его состав входят актиновые и промежуточные филаменты, а также микротрубочки. Вклад различных компонентов цитоскелета в изменение формы эндотелиоцитов исследован в неравной степени. Наименее исследована роль промежуточных филаментов, предположительно выполняющих функцию поддержания формы клетки, в то время как очевидная роль актиновых филаментов исследовалась достаточно активно (Garcia et al., 1995, 1996; Lum, Malik, 1996). Вовлеченность системы микротрубочек в этот процесс обнаружилась значительно позднее (Biruko-

va et al., 2004a, 2004b; Смурова, 2008а, 2008б). Микротрубочки в эндотелиоцитах высокодинамичны (Komarova et al., 2007; Alieva et al., 2013), многочисленные исследования подтверждают ведущую роль микротрубочек в нарушении эндотелиального барьера (Jalimarada et al., 2009; Lucas et al., 2012; Alieva et al., 2013).

Цитоплазматический актин в эндотелиоцитах организован в структуры трех видов — мембранный скелет, кортикальные кольцеобразные структуры и стресс-фибриллы (Prasain, Stevens, 2009). Мембранный скелет и стресс-фибриллы преимущественно составлены из относительно коротких филаментов, тогда как кортикальная сеть (оправа) состоит из длинных актиновых связок. Мембранный скелет определяет мембранную архитектуру и обеспечивает механическую устойчивость мембраны клетки. В состав мембранного скелета входят спектрин и закрепляющие его белки — F-актин, α -катенин, аддуцин и др. (Prasain, Stevens, 2009). Кортикальная актиновая сеть — прочная оправа из актиновых филаментов, которая стабилизируется посредством актин-связывающих и кросс-линкерных белков, таких как кортактин, филамин, спектрин, WASp, VASP и др. (Prasain, Stevens, 2009). Стресс-фибриллы расположены по всей цитоплазме клеток и состоят из коротких микрофиламентов с чередующейся полярностью. Стресс-фибриллы связаны α -актинином и другими актин-связывающими белками.

Известно, что высшие позвоночные продуцируют 6 изоформ актина: 4 мышечных и 2 неммышечных (Vandekerckhove, Weber, 1978). В неммышечных клетках экспрессируются две основные изоформы — β - и γ -цитоплазматические актины, различающиеся только по 4 аминокислотам на NH_2 -конце, но может экспрессироваться также и α -гладкомышечный актин. Неммышечные изоформы актина имеют свои особенности структурной организации в клетках разных типов (в том числе и в зависимости от подвижности клетки) и могут выполнять различные функции (Dugina et al., 2009). В фибробластах и эпителиальных клетках β -актин входит в состав стресс-фибрилл, циркулярных пучков и обнаруживается в районе межклеточных контактов (Dugina et al., 2009). В движущихся клетках γ -актин образует кортикальные и ламеллиподиальные сетчатые структуры, а в неподвижных обнаруживается в составе стресс-фибрилл.

Считается, что эндотелиоциты крупных сосудов в отличие от микроваскулярного эндотелия имеют одинаковую организацию цитоскелета и однотипно реагируют на внешние и внутренние воздействия. Организация цитоскелетных компонентов, например распределение изоформ актина, меняется при изменении функционального состояния клетки, а также при неопластической трансформации (Dugina et al., 2009; Шагиева и др., 2012). Цель настоящей работы — проанализировать и оценить количественно изменения, происходящие в строении цитоскелета эндотелиоцитов вены человека, в процессе формирования эндотелиального монослоя и сравнить их с результатами, полученными нами ранее для клеток эндотелия легочной артерии человека (Шахов и др., 2014).

Материал и методика

Культура клеток. В работе использовали две клеточные линии эндотелия человека — гибридную культуру эндотелиальных клеток EA.hy926 и клетки эндоте-

лия легочной артерии человека (НРАЕС). Клетки культуры EA.hy926 были получены путем слияния первичных эндотелиоцитов, выделенных из пупочной вены человека, и клеток тиогуанин-резистентного клона A549 (клетки карциномы легкого) человека. Согласно данным, предоставляемым производителем культуры и банком клеточных культур ATCC, клетки EA.hy926 способны проходить более ста циклов деления и проявляют все основные свойства, характерные для дифференцированного эндотелия. Клетки выращивали при 37 °C и 5 % CO_2 на среде DMEM (Sigma, США). Для экспериментов использовали клетки EA.hy926 на 6—10-м пассаже.

Клетки НРАЕС — нативная культура, представляющая собой первичные клетки, выделенные из легочной артерии человека. Культура клеток НРАЕС получена от компании Clonetics BioWhittaker Inc. (США). Клетки выращивали на среде EGM-2 (Clonetics BioWhittaker Inc., США) при 37 °C и 5 % CO_2 . Для экспериментов использовали клетки 6—10 пассажей.

Для иммунофлуоресцентного мечения клетки фиксировали двумя способами. Для мечения антителами к микротрубочкам фиксировали метанолом (Sigma, США) при -20 °C в течение 8 мин; для мечения антителами на изоформы актина — 1%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) на среде DMEM с буфером HEPES в течение 15 мин, затем ополаскивали PBS и фиксировали дополнительно метанолом 5 мин. Для мечения клеток НРАЕС на актин использовали фиксацию 2.5%-ным глутаровым альдегидом, затем метанолом (Sigma, США) при -20 °C 5 мин, после чего обрабатывали стеклом NaBH_4 (2 мг/мл).

Актиновые филаменты окрашивали при помощи мышиных моноклональных антител против цитоплазматических изоформ β - и γ -актина (Dugina et al., 2009). Для окрашивания микротрубочек в качестве первичных антител использовали моноклональные мышиные антитела к β -тубулину DM-1A (Sigma, США). В качестве вторичных антител использовали антимишинные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa 488 (Molecular Probes, США).

Для исследования полученных после иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов применяли микроскоп Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss MicroImaging, Германия), оснащенный камерой AxioCam HRm. Использовали объективы 63/1.2 Plan NeoFluar. Полученные изображения обрабатывали и монтировали, используя программу ImageJ.

Количественный анализ системы актиновых филаментов. Для анализа изменений в состоянии структур актинового цитоскелета при формировании монослоя анализировали интенсивность их флуоресценции на единицу площади. На флуоресцентных микрофотографиях в клетке выбирали участки площадью 10 μm^2 в районе свободного края и в области контактов с соседними клетками. В программе ImageJ измеряли среднюю интенсивность флуоресценции на выбранном участке. Участки выбирали на удалении не более 5 μm от края клетки.

Количественный анализ системы микротрубочек. Для анализа изменений в системе микротрубочек в программе ImageJ подсчитывали количество концов микротрубочек в районе свободной клеточной ламеллы и в районе адгезионных (межклеточных) контактов. Измерения проводили на участках длиной 10 и шириной 2 μm . Использовали два способа измерения. В первом

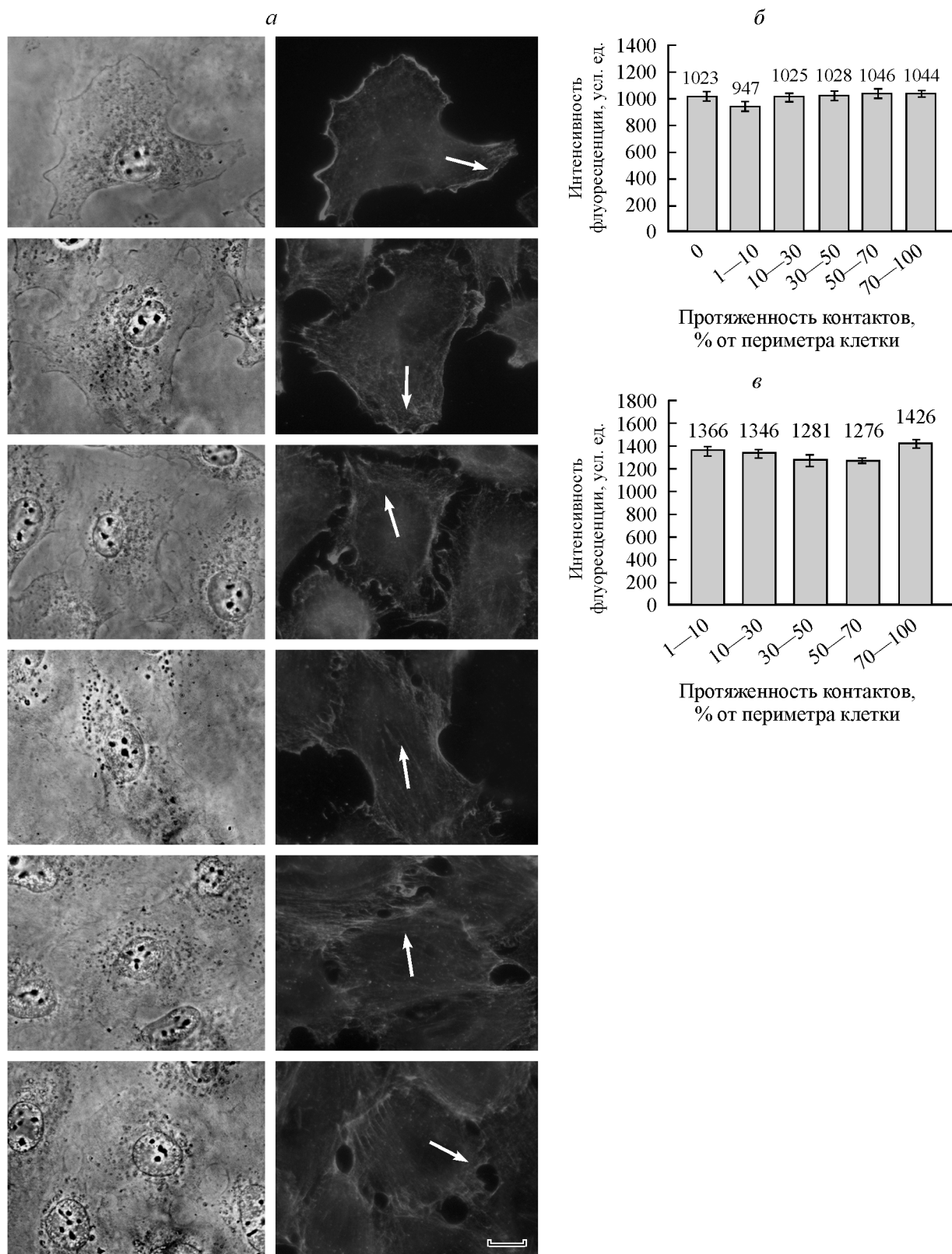


Рис. 1. β-Актин в клетках культуры EA.hy926 на разных стадиях формирования монослоя.

а: левый вертикальный ряд — фазово-контрастные микрофотографии, правый ряд — иммунофлуоресцентные микрофотографии. Масштабный отрезок — 10 мкм. Стрелками отмечены стресс-фибриллы. *б*, *в* — гистограммы интенсивности флуоресценции β-актина в зависимости от протяженности контактов в области ламеллы (*б*) и в районе контактов клеток друг с другом (*в*).

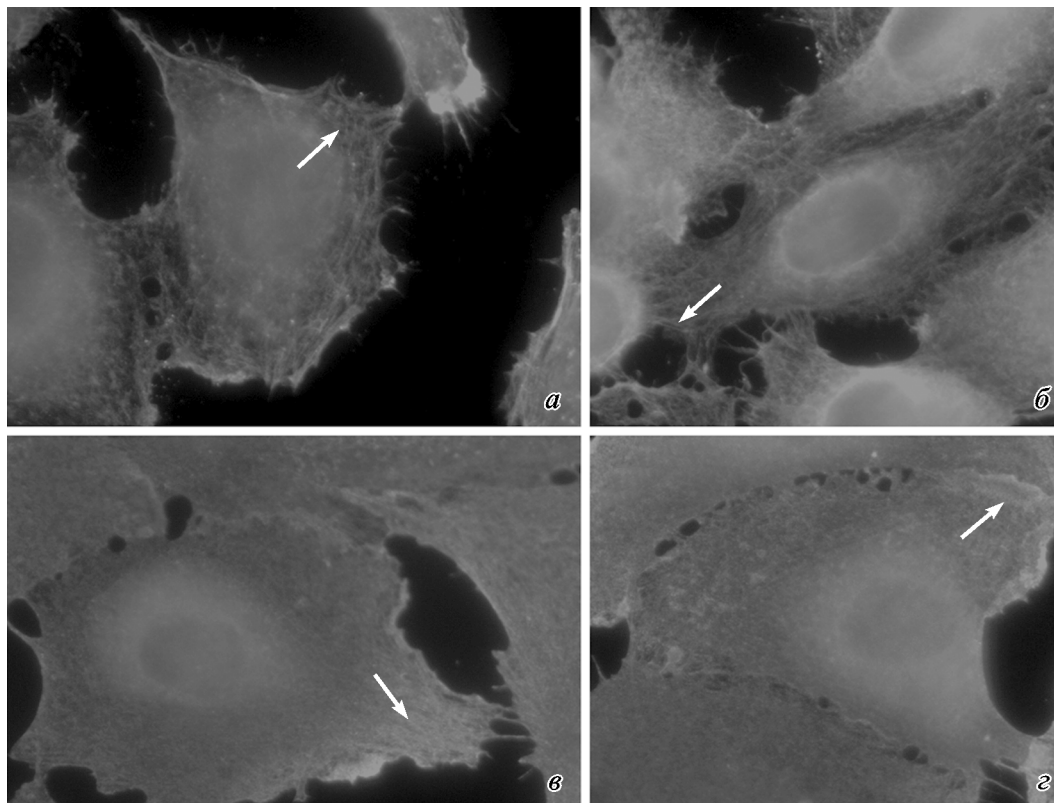


Рис. 2. γ -Актин в клетках культур EA.hy926 (а, б) и HPAEC (в, г).

Представлены клетки с протяженностью контактов с соседними 10—30 (а, в) и 50—70 (б, г) %. Стрелками отмечены участки актиновой сети.

случае, когда микротрубочки хорошо различимы визуально (на краю ламеллы, где цитоплазма достаточно тонкая), количество микротрубочек подсчитывали напрямую. Во втором случае, когда плотность расположения микротрубочек не позволяла точно идентифицировать их концы, в программе ImageJ подсчитывали количество микротрубочек по пикам их флуоресценции на цифровых изображениях. На отрезке длиной 10 и шириной 2 мкм выявлялись пики флуоресценции, лежащие выше измеренного в данном участке значения фона и соответствующие положению микротрубочек в данной области клетки. Для анализа количества микротрубочек учитывали пики флуоресценции, превышающие уровень фона на 25 % и более.

Статистическую обработку данных проводили в программах Sigma Plot 12.5 (SPSS Science, США) и Excel (Microsoft Corp., США). Для определения достоверности различий между анализируемыми выборками использовали *t*-тест (критерий Стьюдента), а также непараметрический U-test (критерий Уилкоксона—Манна—Уитни).

Результаты

Анализ системы актиновых филаментов в клетках культуры EA.hy926 на разных стадиях формирования монослоя. Для решения задач исследования выявляли пучки актиновых микрофиламентов и кортикальную сеть актиновых фибрилл методом иммунофлуоресцентного анализа, используя антитела против β - и γ -актина. Анализ проводили для одиночных клеток и клеток с разной протяженностью контак-

тов, вплоть до формирования конфлюэнтного монослоя. Всего было выделено шесть групп клеток: одиночные клетки и пять групп клеток, имеющих разную протяженность контактов с соседними: 1—10, 10—30, 30—50, 50—70 и 70—100 % от длины собственного периметра клетки.

Выраженная система β -актиновых филаментов характерна для эндотелиальных клеток с любой протяженностью контактов (рис. 1, а). При окрашивании на β -актин выявляли пучки стресс-фибрилл, а также округлые микрочастицы в цитоплазме клеток.

Оказалось, что на ранних стадиях формирования эндотелиального монослоя в одиночных клетках и клетках с небольшой протяженностью контактов наблюдаются β -актиновые филаменты в тех областях ламеллы, где контакт с соседней клеткой еще не установлен.

β -актиновые микрочастицы наблюдали как в одиночных клетках, так и в клетках, имеющих различную протяженность контактов с соседними клетками. Микрочастицы распределены по цитоплазме неравномерно, локализуются преимущественно около ядра клетки.

Пучки β -актиновых фибрилл располагаются в основном вдоль длинной оси клетки. Проведенный количественный анализ показал, что в клетках культуры EA.hy926 средняя интенсивность окрашивания изменялась на краю клетки (рис. 1, б): в районе межклеточных контактов интенсивность окрашивания была всегда больше, чем области свободного края.

При анализе изображений, полученных после окрашивания антителами против γ -актина (рис. 2; 3, а), выявляли сеть фибрилл. Визуально в клетках культуры EA.hy926 γ -актиновая сеть более выражена, чем в клетках HPAEC (рис. 2).

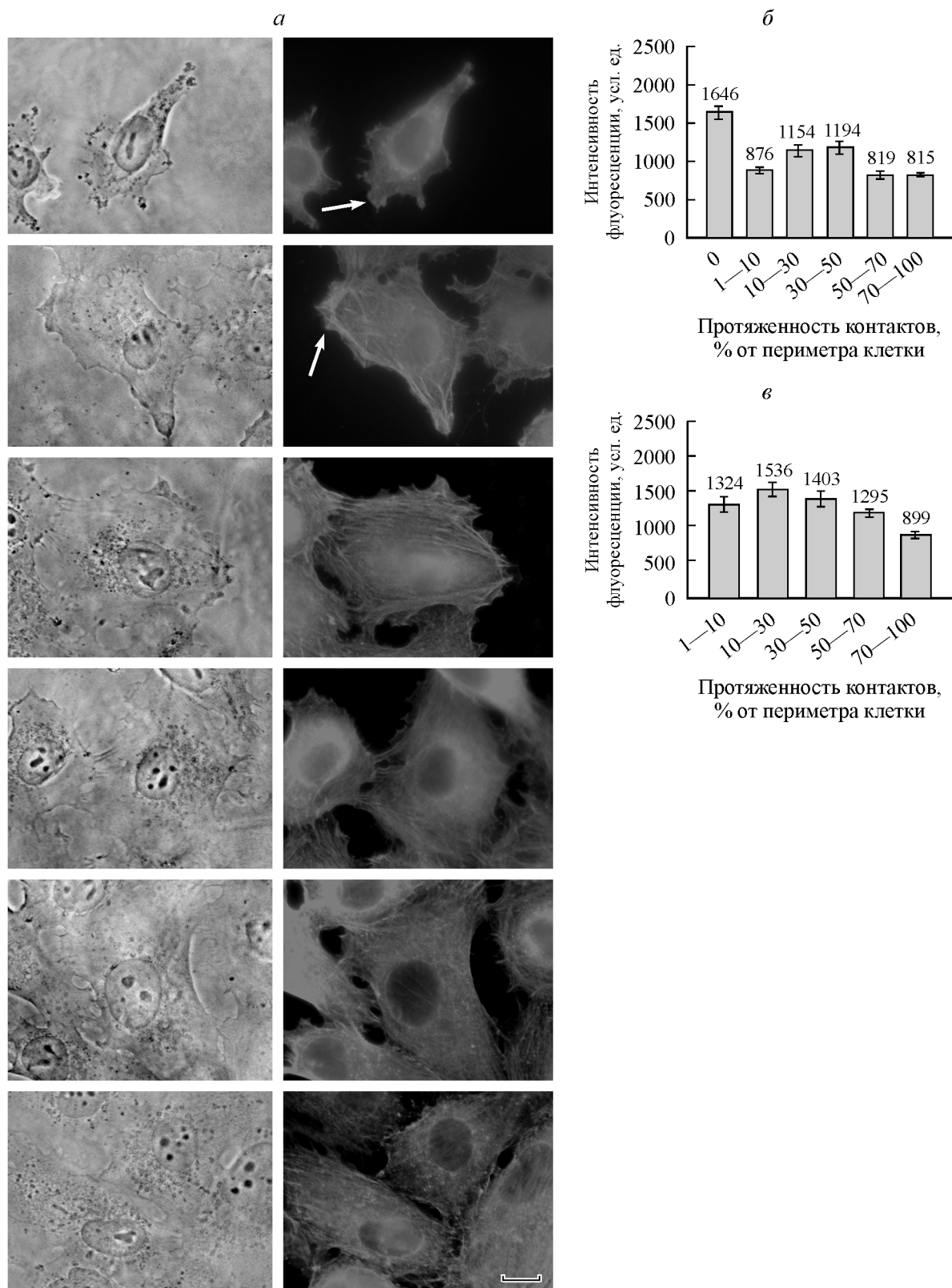


Рис. 3. γ -Актин в клетках EA.hy926 на разных стадиях формирования монослоя.

а: левый вертикальный ряд — фазово-контрастные микрофотографии, правый ряд — иммунофлуоресцентные микрофотографии. Стрелками отмечен γ -актин на ведущем крае. Масштабный отрезок — 10 мкм. *б*, *в* — гистограммы интенсивности флуоресценции γ -актина в зависимости от протяженности контактов в области ламеллы (*б*) и в районе контактов клеток друг с другом (*в*).

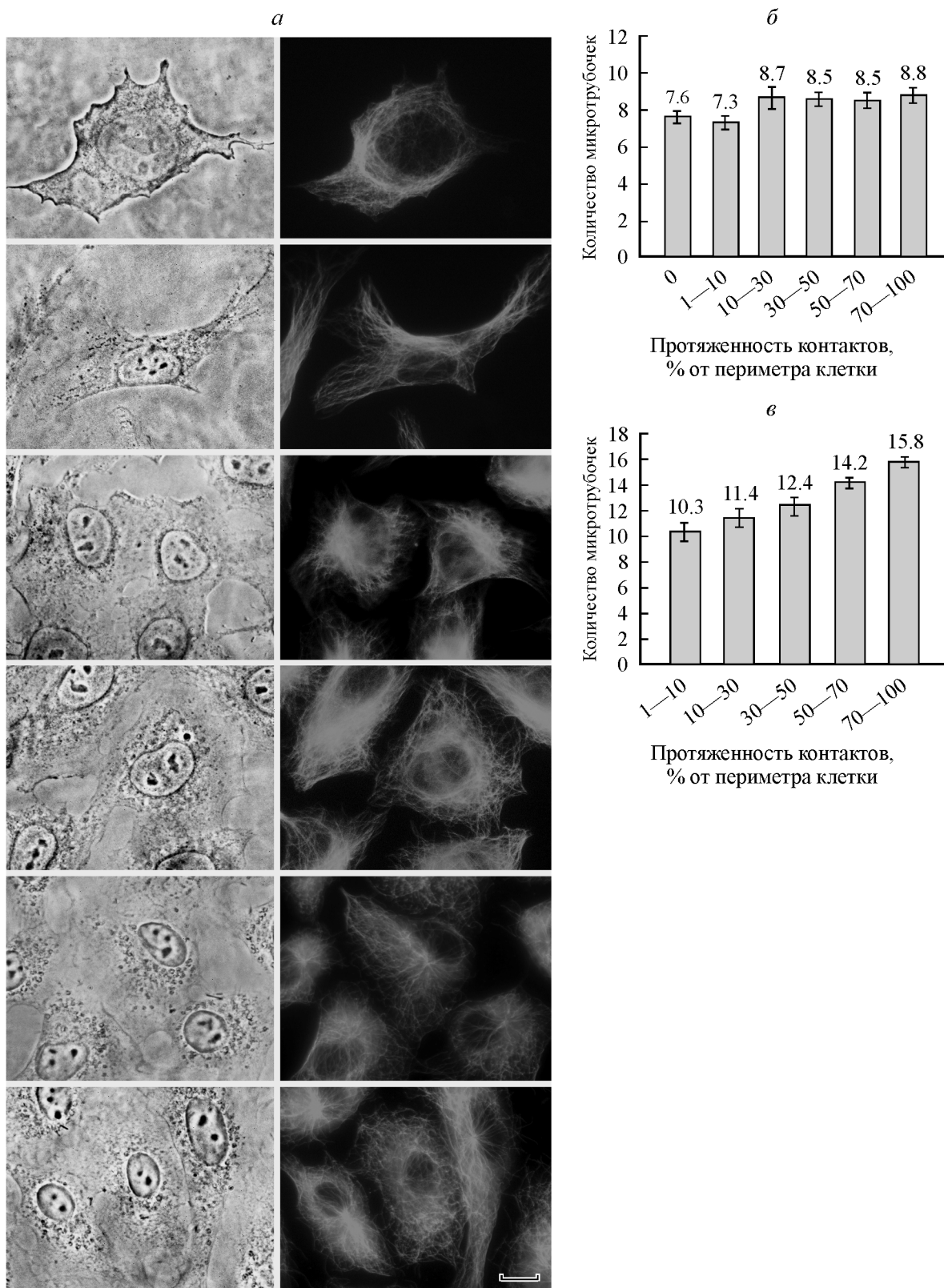


Рис. 4. Система микротрубочек в клетках EA.hy926 на разных стадиях формирования монослоя.

а: левый вертикальный ряд — фазово-контрастные микрофотографии, правый ряд — иммунофлуоресценция. Масштабный отрезок — 10 мкм. *б, в* — число микротрубочек в клетках культуры EA.hy926, имеющих различную протяженность контактов с соседними клетками в процессе формирования эндотелиального монослоя в области свободной ламеллы (*б*) и в области контактов между клетками (*в*).

Количественный анализ показал, что в одиночных клетках на ведущем крае интенсивность окрашивания больше, чем на свободных краях клеток, контактирующих с соседними (рис. 3, б).

Таким образом, можно заключить, что при формировании монослоя происходит концентрация β -актиновых филаментов в районе межклеточных контактов. Система γ -актиновых филаментов наиболее выражена на свободном крае одиночных клеток.

Анализ изменений системы микроотростков, происходящих при формировании монослоя в клетках культуры EA.hy926. Для проведения анализа также выделили шесть групп клеток: одиночные клетки и пять групп клеток, имеющих разную протяженность контактов с соседними: 1—10, 10—30, 30—50, 50—70 и 70—100 % от длины собственного периметра клетки. Анализировали микроотростки в области свободной ламеллы и в районе контактов с соседней клеткой (рис. 4, а—в).

Статистический анализ показал, что количество микроотростков в области ламеллы изменяется. В одиночных клетках и в клетках с протяженностью контакта 1—10 % среднее количество микроотростков совпадало (рис. 4, б): 7.6 ± 0.71 и 7.3 ± 0.75 микроотростков, соответственно. При дальнейшем увеличении области контакта (10—30 %) среднее количество микроотростков в районе свободной ламеллы росло, а затем не изменялось (30—100 %). В клетках с протяженностью контактов 10—30 % среднее количество микроотростков отличается от значения, полученного для клеток с протяженностью контактов до 10 % (8.67 ± 0.60 и 7.33 ± 0.36 соответственно; критерий Манна—Уитни, $P = 0.046$). Различий в количестве микроотростков между клетками четвертой, пятой и шестой групп не наблюдалось.

Анализ микроотростков в области контактов между соседними клетками показал, что наименьшее среднее количество микроотростков характерно для клеток с небольшой протяженностью контактов (1—10 %) (рис. 4, в). При дальнейшем формировании межклеточных контактов количество микроотростков в этой области постепенно растет, достигая максимума в клетках сформированного монослоя. Наблюдали различия в количестве микроотростков между клетками, имевшими протяженность контактов 1—10 и 50—70 % (10.33 ± 0.73 и 14.17 ± 0.31 соответственно; критерий Манна—Уитни, $P = 0.008$), 1—10 и 70—100 % (10.33 ± 0.73 и 15.80 ± 0.37 ; критерий Манна—Уитни, $P = 0.002$), а также 50—70 и 70—100 % (14.17 ± 0.31 и 15.80 ± 0.37 ; критерий Манна—Уитни, $P = 0.017$). В районе формирующегося контакта между клетками количество микроотростков на всех стадиях образования монослоя всегда выше, чем в области свободной ламеллы.

Таким образом, в процессе формирования эндотелиального монослоя происходит изменение количества микроотростков на краю клетки: количество микроотростков растет как в области свободной ламеллы, так и в районе контактов между соседними клетками. Увеличение количества микроотростков на периферии клетки происходит неравномерно. Наибольшее повышение происходит, когда около половины периметра клетки контактирует с соседней (протяженность контактов 30—50 %). Когда клетка сформировала значительные по длине контакты (70 % от своего периметра и более), количество микроотростков уже не изменяется.

Сравнение количества микроотростков в районе ламеллы и в области контактов с соседними клетками показало, что среднее количество микроотростков в области контактов всегда выше, чем в районе свободной ламеллы. Различия между количеством микроотростков в районе свободной ламеллы и в области контакта отмечали для клеток с любой протяженностью контактов, вплоть до момента образования эндотелиального монослоя.

Обсуждение

Эндотелиальная линия EA.hy926 сохраняет характеристики нормального эндотелия. В настоящей работе для количественной оценки изменений цитоскелета эндотелиальных клеток от момента распластывания клеток на стекле и образования первых межклеточных контактов до формирования конфлюэнтного монослоя мы использовали гибридную культуру EA.hy926 — клеточную линию, полученную в результате слияния нормальных первичных эндотелиоцитов вены человека (HUVEC) с клетками карциномы легкого A549. Культура EA.hy926 активно используется с 80-х годов прошлого века в биохимических исследованиях (Edgell et al., 1983) и достаточно хорошо охарактеризована. Показано, что в клетках культуры EA.hy926 выявляется широкий спектр клеточных маркеров, характерных для нативных эндотелиальных клеток; эндотелиоциты EA.hy926 формируют капиллярноподобные структуры на Матригеле (Unger et al., 2002), демонстрируя одну из наиболее важных характеристик нативного эндотелия. По данным банка клеточных культур ATCC, клетки EA.hy926 способны проходить более ста циклов деления и проявляют все основные функции и свойства, характерные для дифференцированного эндотелия.

Тем не менее, выбирая данную культуру объектом структурных исследований, необходимо было убедиться в том, что как сами клетки, так и их цитоскелет не обладают морфологическими особенностями и свойствами трансформированных клеток. Имеющиеся в литературе работы дают основание считать, что это действительно так — при сравнении клеток гибридной культуры EA.hy926 с культурой карциномы легкого A549 обнаружилось значительное различие в экспрессии многих белков (Lu et al., 2009). Физиологические тесты (исследование динамических характеристик подвижности этих клеток) также выявили значительные различия. Авторы показали, что EA.hy926 обладают большей направленной подвижностью (Lu et al., 2009). Клетки культуры EA.hy926 в отличие от клеток карциномы легкого A549 не приводили к появлению опухолей при введении их под кожу мышам. Более того, цитологические тесты показали, что актиновая система A549 имеет структуру, характерную для нормального эндотелия (Liu et al., 2013), т. е. в клетках формируются как кортикальная сеть, так и пучки актиновых филаментов. Сравнение общей морфологии и организации компонентов цитоскелета клеток EA.hy926 и нативных клеток эндотелия аорты человека демонстрирует сходство по большинству описываемых характеристик (Шахов и др., 2014). Таким образом, вышеперечисленные факты дают нам основание считать линию EA.hy926 нормальным эндотелием как по клеточным свойствам, так и по морфологии.

Реорганизация цитоскелета в клетках культуры EA.hy926 при формировании эндо-

телиального монослоя *in vitro*. Цитоскелет эндотелиоцитов, как и цитоскелет других типов клеток, состоит из промежуточных и актиновых филаментов, а также микротрубочек. Взаимодействие между перечисленными фибриллярными компонентами, а также взаимодействие фибриллярных компонентов с адгезивными структурами клетки являются ключевыми событиями для осуществления и регуляции многочисленных клеточных функций эндотелиоцитов, в том числе поддержания их формы и ее изменения в ответ на воздействие гуморальных факторов, миграции и локомоции в процессе васкулогенеза (Lee, Gotlieb, 2003; Prasain, Stevens, 2009).

Известно, что в эндотелиоцитах основным типом промежуточных филаментов являются виментиновые филаменты (Bruneel et al., 2003; Liu et al., 2010). Виментиновые филаменты связаны с фокальными контактами и стабилизируют связь эндотелиальных клеток с внеклеточным матриксом (Tsuruta, Jones, 2003). Возможно, виментиновые филаменты непосредственно связаны с актином (Esue et al., 2006). Также известно, что сеть виментиновых филаментов в эндотелиоцитах быстро разрушается при гипоксии, при этом параллельно происходят изменения и в системе актиновых филаментов (Liu et al., 2010). Как было показано ранее, распределение виментиновых филаментов в цитоплазме при формировании монослоя клеток эндотелия аорты человека принципиально не изменяется (Шахов и др., 2014). Аналогичные результаты были получены в настоящем исследовании для клеток эндотелия вены человека EA.hy926 (данные не приводятся).

В связи с активно ведущимися исследованиями структурных и функциональных особенностей немышечных изоформ актина, исследуя структуру актиновых филаментов в цитоплазме клеток EA.hy926 в процессе формирования монослоя, мы проанализировали отдельно изменения, затрагивающие β - и γ -актин.

В ряде работ продемонстрировано, что изоформы β - и γ -актина формируют в клетке разные типы структур, по-разному локализуются в цитоплазме и выполняют уникальные функции (Dugina et al., 2009; Varanwal et al., 2012; Lechuga et al., 2014). В фибробластах, эпителиальных и эндотелиальных клетках β -актин входит в состав стресс-фибрилл, циркулярных пучков и обнаруживается в районе межклеточных контактов, а γ -актин — в состав кортикальной сети актиновых филаментов (Dugina et al., 2009; Latham et al., 2013). В движущихся клетках γ -актин образует кортикальные и ламеллиподиальные сетчатые структуры, а в неподвижных обнаруживается в составе стресс-фибрилл. Таким образом, β -актиновые филаменты вовлечены в процессы клеточного сокращения, в то время как γ -актин обнаруживается в составе стресс-фибрилл только в неподвижных клетках, а в подвижных образует другие структуры (Dugina et al., 2009). Например, β -актин отвечает за обеспечение апикобазальной организации эпителиальных клеток (Varanwal et al., 2012), но обе немышечные изоформы отвечают за обеспечение барьерной функции эпителия и регулируют динамику клеточных контактов.

Локализация изоформ актина меняется при изменении функциональной активности клетки: при распластывании фибробластов γ -актин распределяется в виде кортикальной и ламеллярной сети, а β -актин локализован в кольцевых пучках и радиальных стресс-фибриллах в вентральной части клетки (Dugina et al., 2009). Эпителиальные клетки при распластывании имеют циркулярную

морфологию с кольцевыми протрузиями, образованными γ -актиновыми сетями, а β -актин организован в филоподиальные и кольцевые пучки в базальной части клетки. Обнаруженная сегрегация изоформ актина в разные компартменты и организация ими различных структур не являются уникальными для одного типа клеток. Учитывая вышесказанное, следует отметить, что организация γ -актиновой системы эндотелия имеет сходные характеристики с эпителиальными клетками (Dugina et al., 2009; Latham et al., 2013): в одиночных (потенциально подвижных на субстрате) эндотелиоцитах присутствуют выраженные стресс-фибриллы β -актина (рис. 1, *a*), γ -актин концентрируется на ведущем крае клетки (рис. 3, *a*). В монослое β -актин концентрируется в районе межклеточных контактов, а γ -актин распределен в краевых зонах равномерно.

Поскольку в процессе образования эндотелиального монослоя системы β - и γ -актиновых филаментов реорганизуются различным образом, полученные результаты позволяют предположить, что построенные из разных изоформ системы актиновых микрофиламентов, возможно, могут различаться и функционально.

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что система микротрубочек клеток EA.hy926 в процессе формирования монослоя претерпевает значительные изменения, которые происходят на периферии клетки. Наблюдается рост общего числа микротрубочек в районе краевых областей клетки по мере формирования эндотелиального монослоя, причем количество микротрубочек в районе контакта клетки с соседней превышало число микротрубочек в области свободной ламеллы на всех стадиях формирования эндотелиального монослоя. Аналогично изменяется система микротрубочек в эндотелиоцитах легочной артерии человека (Шахов и др., 2014), что позволяет говорить об универсальной реакции системы микротрубочек эндотелиоцитов крупных сосудов (артерий и вен) на формирование межклеточных контактов *in vitro*.

Повышенное количество микротрубочек в районе межклеточных контактов в процессе формирования эндотелиального монослоя может быть вызвано изменением активности самой centrosомы, являющейся основным центром полимеризации микротрубочек в эндотелиоцитах. Другой причиной может являться возможное взаимодействие концов микротрубочек с формирующимися контактами: заякоривание минус-концов микротрубочек в зоне межклеточных контактов, описанное ранее для эпителиальных клеток (Meng et al., 2008), или стабилизация плюс-концов микротрубочек в зоне VE-кадгериновых контактов (Gundersen et al., 2004). Физиологический смысл накопления плюс-концов микротрубочек в районе формирующихся межклеточных контактов понятен — динамичные плюс-концы микротрубочек способны регулировать положение VE-кадгериновых субъединиц в формирующемся контакте (Stehbens et al., 2006).

Особая роль взаимосвязи актиновых филаментов и микротрубочек для обеспечения барьерной функции эндотелиального монослоя. Известно, что фибриллярные компоненты цитоскелета клетки и ее адгезионные структуры функционируют взаимосвязанно. Существует структурная (Rodriguez et al., 2003; Bershinsky et al., 2006; Applewhite et al., 2010; Lopez et al., 2014) и функциональная (Birukova et al., 2004a, 2004b; Prasain, Stevens, 2009; Смурова и др., 2011; Alieva et al., 2013) связь между микротрубочками и

актиновыми филаментами; описана структурная связь между актиновыми филаментами и виментином (Cary et al., 1994; Esue et al., 2006), а также, возможно, между виментином и микротрубочками (Draberova, Draber, 1993; Liao, Gundersen, 1998). Белки семейств CLIP и APC вовлечены во взаимодействие плюс-концов микротрубочек с межклеточными контактами (Small, Kaverina, 2003; Lansbergen, Akhmanova, 2003; Mehta, Malik, 2006; Komarova et al., 2007), что обеспечивает многочисленные морфофункциональные реакции фибробластов. Взаимодействие компонентов цитоскелета с фокальными и межклеточными контактами регулируется посредством Rho GTPаз (Mehta, Malik, 2006).

Показано, что состояние системы микротрубочек напрямую влияет на организацию актинового цитоскелета. Разрушение микротрубочек освобождает активаторы факторов обмена гуаниловых нуклеотидов (RhoGEFs) от связанного тубулина, вызывая активацию RhoA и формирование стресс-фибрилл (Krendel et al., 2002), тогда как полимеризация микротрубочек изолирует киназу LIM1 и ограничивает ее доступ к актиновому цитоскелету (Makawa et al., 1999; Gorovoy et al., 2005). Epc1, фактор обмена Rap GTPаз, напрямую влияющий на динамику микротрубочек, активирует Rap, что приводит к увеличению кортикального актина (Sehrawat et al., 2008). Киназа LIM1 реорганизует кортикальную актиновую сеть в стресс-фибриллы фосфорилированием и ингибированием активности фактора деполимеризации актина — кофилина (Gorovoy et al., 2005). Известно также, что микротрубочки регулируют динамику межклеточных контактов, их компонент, белок β -катенин, связывается с белком-мотором микротрубочек динеином (Ligon et al., 2001).

В эндотелиоцитах взаимодействие описанных структур обеспечивает сжатие и расслабление клетки в процессе осуществления барьерной функции. Для эндотелиальных клеток наиболее изучены функциональные взаимодействия актинового цитоскелета с адгезивными комплексами (Burrige et al., 1988; Geiger et al., 2001). Описаны механизмы возникновения клеточных контактов при формировании эндотелиального монослоя, связанные с функцией актиновых филаментов (Hoelzle, Svitkina, 2012). Взаимодействие актинового цитоскелета и микротрубочек, как оказалось, принципиально для осуществления основной — барьерной — функции эндотелия. При нарушении барьерной функции под действием как внутренних, так и внешних факторов происходит разрушение микротрубочек, в результате чего запускается молекулярный каскад, приводящий к формированию мощных стресс-фибрилл (Смурова и др., 2008а, 2011; Alieva et al., 2013). Микротрубочки могут контролировать организацию актинового скелета клетки, локально изменяя сократимость актомиозина на концах стресс-фибрилл (Small, Kaverina, 2003). Таким образом, накопленные факты свидетельствуют о том, что система микротрубочек является ключевым звеном во взаимодействии с адгезивными структурами и обеспечении барьерной функции эндотелия.

В подавляющем большинстве описанных выше работ, в том числе и тех, в которых объектом исследования выступали эндотелиоциты, исследовали β -актиновые филаменты (Sehrawat et al., 2008). Проведенный в настоящей работе анализ вовлеченности разных изоформ актина в реорганизацию цитоскелета клеток эндотелия по мере формирования межклеточных контактов показал,

что обе системы немышечного актина (β и γ) подвержены значительным изменениям. Одновременно изменяется и организация системы микротрубочек на периферии клетки. Работы последних лет показывают, что во взаимодействии с актиновыми филаментами вовлечены динамичные микротрубочки (Lopez et al., 2014), и именно динамичные микротрубочки составляют большинство в клетках эндотелия (Alieva et al., 2013). Более того, оказалось, что γ -актин способен модулировать динамику микротрубочек, снижая скорость их разборки, снижая частоту пауз и частоту переключений фаз сборки—разборки (Po'uha et al., 2013). Полученные данные позволили авторам предположить наличие механической связи между γ -актиновыми филаментами и микротрубочками. Учитывая вышесказанное, а также полученные в данной работе данные, можно ожидать, что такая потенциальная связь, возможно, обеспечивает выполнение основной функции эндотелия.

Таким образом, двигателем процесса формирования эндотелиального монослоя крупных сосудов — артерий и вен — являются, по-видимому, микротрубочки. Системы γ - и β -актиновых филаментов, специфически организованные в эндотелиоцитах, также активно вовлечены в этот процесс, возможно благодаря существующей (но на настоящей момент не исследованной) механической связи с микротрубочками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-08550 и 12-04-00488).

Список литературы

- Смурова К. М., Бирюкова А. А., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2008а. Система микротрубочек при барьерной дисфункции эндотелия: деполимеризация на краю клетки и реорганизация во внутренней цитоплазме. Цитология. 50 (1) : 49—55. (Smurova K. M., Biryukova A. A., Verin A. D., Alieva I. B. 2008a. Microtubule system with barrier endothelial dysfunction: depolymerization at the edge of the cell and the internal reorganization of the cytoplasm. Cytology. 50 (1) : 49—55.)
- Смурова К. М., Бирюкова А. А., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2008б. Доз-зависимый эффект нокадазола на цитоскелет эндотелиальных клеток. Биол. мембраны. 25 (3) : 181—190. (Smurova K. M., Biryukova A. A., Verin A. D., Alieva I. B. 2008b. Dose-dependent effect of nocodazole on the cytoskeleton of endothelial cells. Biol. Membranes. 25 (3) : 181—190.)
- Смурова К. М., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2011. Эффект ингибирования Rho-киназы при барьерной дисфункции зависит от природы факторов, изменяющих проницаемость эндотелия. Цитология. 53 (4) : 359—366. (Smurova K. M., Verin A. D., Alieva I. B. 2011. The effect of inhibition of Rho-kinase with barrier dysfunction depends on the nature of the factors affecting the permeability of the endothelium. Cytology. 53 (4) : 359—366.)
- Шагиева Г. С., Домнина Л. В., Дугина В. Б. 2012. Механизмы эпителиально-мезенхимального перехода в культуре клеток рака шейки матки. Цитология. 54 (1) : 89—101. (Shagieva G. S., Domnina L. V., Dugina V. B. 2012. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in the cell culture of cervical cancer. Tsitologiya. 54 (1) : 89—101.)
- Шахов А. С., Верин А. Д., Алиева И. Б. 2014. Реорганизация цитоскелета эндотелиальных клеток при формировании функционального монослоя *in vitro*. Цитология. 56 (1) : 36—47. (Shakhov A. S., Verin A. D., Alieva I. B. 2014. Reorganization of endothelial cells cytoskeleton during formation of functional monolayer *in vitro*. Cell Tissue Biol. 8 (2) : 138—151.)
- Alieva I. B., Verin A. D. 2013. The functional role of the microtubule/microfilament cytoskeleton in the regulation of pulmonary

- vascular endothelial barrier. In: Endothelial cytoskeleton. New York: Sci. Publ. 116—145.
- Alieva I. B., Zemskov E. A., Smurova K. M., Kaverina I. N., Verin, A. D. 2013. The leading role of microtubules in endothelial barrier dysfunction: disassembly of peripheral microtubules leaves behind the cytoskeletal reorganization. *J. Cell. Biochem.* 114 (10) : 2258—2272.
- Applewhite D. A., Grode K. D., Keller D., Zadeh A. D., Slep K. C., Rogers S. L. 2010. The spectraplakins short stop is an actin — microtubule cross-linker that contributes to organization of the microtubule network. *Mol. Biol. Cell.* 21 : 1714—1724.
- Baranwal S., Naydenov N. G., Harris G., Dugina V., Morgan K. G., Chaponnier C., Ivanov A. I. 2012. Nonredundant roles of cytoplasmic β - and γ -actin isoforms in regulation of epithelial apical junctions. *Mol. Biol. Cell.* 23 (18) : 3542—3553.
- Bershadsky A. D., Ballestrem C., Carramusa L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A. Y., Verkhovskiy A. B., Shemesh T., Kozlov M. M. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur. J. Cell Biol.* 85 : 165—173.
- Birukova A. A., Birukov K. G., Smurova K. M., Kaibuchi K., Alieva I., Garcia J. G., Verin A. D. 2004a. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *FASEB J.* 18 : 1879—1890.
- Birukova A. A., Smurova K. M., Birukov K. G., Kaibuchi K., Garcia J. G., Verin A. D. 2004b. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc. Res.* 67 : 64—77.
- Bruneel A., Labas V., Mailloux A., Sharma S., Vinh J., Vaubourdel M., Baudin B. 2003. Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteomics.* 3 : 714—723.
- Burrige K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4 : 487—525.
- Cary R. B., Klymkowsky M. W., Evans R. M., Domingo A., Dent J. A., Backhus L. E. 1994. Vimentin's tail interacts with actin-containing structures *in vivo*. *J. Cell Sci.* 107 : 1609—1622.
- Dráberová E., Dráber P. 1993. A microtubule-interacting protein involved in coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules. *J. Cell Sci.* 106 : 1263—1273.
- Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G., Clement S., Chaponnier C. 2009. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J. Cell Sci.* 122 : 2980—2988.
- Edgell C. S., McDonald C. C., Graham J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Cell Biol.* 80 : 3734—3737.
- Esue O., Carson A. A., Tseng Y., Wirtz D. A. 2006. Direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *J. Biol. Chem.* 281 : 30393—30399.
- Garcia J. G., Davis H. W., Patterson C. E. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Physiol.* 163 : 510—522.
- Garcia J. G., Verin A. D., Schaphorst K. L. 1996. Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability *in vitro*. *Thromb. Haemost.* 22 : 309—315.
- Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K. M. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 : 793—805.
- Gorovoy M., Niu J., Bernard O., Profirovic J., Minshall R., Neamu R., Voyno-Yasenetskaya T. 2005. LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cell. *J. Biol. Chem.* 280 : 26533—26542.
- Gundersen G. G., Gomes E. R., Wen Y. 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 : 106—112.
- Hoelzle M. K., Svitkina T. 2012. The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 23 : 310—323.
- Jalimarada S. S., Shivanna M., Kini V., Mehta D., Srinivas S. P. 2009. Microtubule disassembly breaks down the barrier integrity of corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 89 : 333—343.
- Komarova Y. A., Mehta D., Malik A. B. 2007. Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci. STKE.* 412 : re8.
- Krendel M., Zenke F. T., Bokoch G. M. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 4 : 294—301.
- Lansbergen G., Akhmanova A. 2006. Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic.* 7 : 499—507.
- Latham S. L., Chaponnier C., Dugina V., Couraud P.-O., Grau G. E. R., Combes V. 2013. Cooperation between β - and γ -cytoplasmic actins in the mechanical regulation of endothelial micro-particle formation. *FASEB J.* 27 : 672—683.
- Lechuga S., Baranwal S., Li C., Naydenov N. G., Kuemmerle J. F., Dugina V., Ivanov A. I. 2014. Loss of γ -cytoplasmic actin triggers myofibroblast transition of human epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 25 : 3133—3146.
- Lee J. S. Y., Gotlieb A. I. 2005. Microtubules regulate aortic endothelial cell actin microfilament reorganization in intact and re-pairing monolayers. *Histol. Histopathol.* 20 : 455—465.
- Liao G., Gundersen G. G. 1998. Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments: selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *J. Biol. Chem.* 273 : 9797—9803.
- Ligon L. A., Karki S., Tokito M., Holzbaur E. L. F. 2001. PLAC-24: a novel protein that binds to dynein and localizes to cell-cell microtubules at adherens junctions. *Nature Cell Biol.* 3 : 913—917.
- Liu T., Guevara O. E., Warburton R. R., Hill N. S., Gaestel M., Kayyali U. S. 2010. Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 299 : 363—373.
- López M. P., Huber F., Grigoriev I., Steinmetz M. O., Akhmanova A., Koenderink G. H., Dogterom M. 2014. Actin-microtubule coordination at growing microtubule ends. *Nature Commun.* 5 : 4778.
- Lu Z. J., Ren Y. Q., Wang G. P., Song Q., Li M., Jiang S. S., Luo F. 2009. Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* doi: 10.1186/1756-9966-28-16.
- Lucas R., Yang G., Gorshkov B. A., Zemskov E. A., Sridhar S., Umaphathy N. S., Jezierska-Drutel A., Alieva I. B., Leustik M., Hos-sain H., Fischer B., Catravas J. D., Verin A. D., Pittet J. F., Caldwell R. B., Mitchell T. J., Cederbaum S. D., Fulton D. J., Mat-thay M. A., Caldwell R. W., Romero M. J., Chakraborty T. 2012. Protein kinase C- α and arginase I mediate pneumolysin-induced pulmonary endothelial hyperpermeability. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47 : 445—453.
- Lum H., Malik A. B. 1996. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74 : 787—800.
- Maekawa M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Sci. New York.* 285 : 895—898.
- Mehta D., Malik A. B. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 86 : 279—367.
- Meng W., Mushika Y., Ichii T., Takeichi M. 2008. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 135 : 948—959.
- Po'uha S. T., Honore S., Braguer D., Kavallaris M. 2013. Partial depletion of gamma-actin suppresses microtubule dynamics. *Cytoskeleton.* 70 : 148—160.
- Prasain N., Stevens T. 2009. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* 77 : 53—63.
- Rodriguez O. C., Schaefer A. W., Mandato C. A., Forscher P., Bement W. M., Waterman-Storer C. M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature Cell Biol.* 5 : 599—609.
- Shrawat S., Cullere X., Patel S., Italiano J., Mayadas T. N. 2008. Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function. *Mol. Biol. Cell.* 19 : 1261—1270.
- Small J. V., Kaverina I. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 40—47.

Smurova K. M., Birukova A. A., Verin A. D., Alieva I. B. 2008a. Dose-dependent effect of nocodazole on the cytoskeleton of endothelial cells. *Biologicheskie Membrany*. 25 : 181—190.

Smurova K. M., Birukova A. A., Verin A. D., Alieva I. B. 2008b. Microtubule system in endothelial barrier dysfunction: Disassembly of peripheral microtubules and microtubule reorganization in internal cytoplasm. *Cell Tiss. Biol.* 2 : 45—52.

Stehbens S. J., Paterson A. D., Crampton M. S., Shewan A. M., Ferguson C., Akhmanova A., Parton R. G., Yap A. S. 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J. Cell Sci.* 1199 : 1801—1811.

Tsuruta D., Jones J. C. 2003. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J. Cell Sci.* 116 : 4977—4984.

Unger R., Krump-Konvalinkova V., Peters K., Kirkpatrick C. J. 2002. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc. Res.* 64 : 384—397.

Vandekerckhove J., Weber K. 1978. At least six different actins are expressed in a higher animal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *Mol. Biol.* 126 : 783—802.

Поступила 25 XI 2014

THE REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON AND MICROTUBULE SYSTEM OF HUMAN ENDOTHELIAL VEIN IN THE INTERCELLULAR CONTACTS FORMATION

A. S. Shahov, V. B. Dugina, I. B. Alieva¹

Electron Microscopy Department, A. N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology,
Moscow State University;
e-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Endothelial cells are tightly fitted to each other and lining the interior surface of all vessels of living organism to provide vascular permeability regulation and interchange between the blood circulating in vessels and tissue fluids of those organs in which these vessels are located. *In vitro* endothelial monolayer conserve it's basic barrier function which is native for vessels endothelium. Based on this fact we used endothelial cells growing *in vitro* as a model system in experimental studies of cytoskeletal and adhesion cell components interaction. In current paper, cultured human vein endothelial cells monolayer was used to quantify cytoskeleton alterations in the of endothelial cells from spreading and formation of the first cell-cell contacts to confluent monolayer formation. The system of actin filaments formed two different cytoskeletal structures in the cells of venous endothelium: 1) cortical actin network; 2) actin stress fibers (bundles) arranged parallel to the substrate. Two actin isoforms, β - and γ -cytoplasmic (non-muscle) actins, are expressed in endothelial cells. The bundles of actin stress fibers were detected by immunofluorescent staining with antibody against β -actin, whereas antibodies against γ -actin identified cortical and lamellar networks. For assessment of the actin cytoskeleton organization it's fluorescence intensity on the area of $10 \mu\text{m}^2$ located (1) near the free edge, and (2) in the zone of cell-cell contacts were analyzed. Fluorescence intensity of β -actin structures was higher in the areas of cell-cell contact. The fluorescence of γ -actin structures was more intensive at the leading edges of the lamellae, and was the lowest on the stable edges of the cells with formed cell-cell contacts. The endothelial monolayer formation was accompanied by microtubule system alteration: the number of microtubules increased at the cell edge, and besides the microtubules quantity in the area of already formed cell-cell contact was always higher than in free lamella region.

Key words: endothelium, the cytoskeleton of endothelial cells, γ -actin, β -actin, microtubules.