

УДК 612.111.014.46:574.262+616.89-008.441.13-06:616.155.1(048.8)

© Коллектив авторов

РОЛЬ ДЕФОРМАЦИЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ КЛЕТОК

В.С. Глушков¹, С.А. Сторожок¹, Л.Ф. Панченко², Е.Г. Силина¹

¹Тюменская государственная медицинская академия, 625023, Тюмень,
Одесская ул., 54, тел.: (3452) 22-59-00; факс: (3452) 20-62-00

²НИИ наркологии МЗ РФ, 121921, Москва, Малый Могильцевский пер., 3,
тел: (095) 241-94-46; факс: 241-95-90

В настоящее время не вызывает сомнений, что клетки способны реагировать не только на воздействие молекул биологически активных веществ, но и на механические возмущения со стороны окружающей среды. Особо следует выделить клеточные элементы стенок кровеносных сосудов и крови, которые подвергаются постоянному механическому воздействию со стороны сил давления крови и смещающихся слоев плазмы. Указанные механические воздействия приводят к деформации клеток крови и сосудистой стенки. Воздействие сил давления крови является причиной деформаций растяжения или сжатия цитоплазматических мембран клеток, так называемая stretch-деформация. В результате воздействия сил со стороны смещающихся слоев плазмы крови имеет место сдвиговая деформация клеток (shear stress). Результаты экспериментальных исследований различных авторов свидетельствуют о том, что в ответ на механические воздействия клетки крови и сосудистой стенки меняют свою функциональную активность.

Ключевые слова: сдвиговая деформация, биологические мембраны.

В настоящее время не вызывает сомнений, что клетки способны реагировать не только на воздействие молекул биологически активных веществ, но и на механические возмущения со стороны окружающей среды. Особо следует выделить клеточные элементы стенок кровеносных сосудов и крови, которые подвергаются постоянному механическому воздействию со стороны сил давления крови и смещающихся слоев плазмы. Указанные механические воздействия приводят к деформации клеток крови и сосудистой стенки. Воздействие сил давления крови является причиной деформаций растяжения или сжатия цитоплазматических мембран клеток, так называемая stretch-деформация. В результате воздействия сил со стороны смещающихся слоев плазмы крови имеет место сдвиговая деформация клеток. Результаты экспериментальных исследований различных авторов свидетельствуют о том, что в ответ на механические воздействия клетки крови и сосудистой стенки меняют свою функциональную активность. Клетки эндотелия сосудов, локализованные между циркулирующей кровью и сосудистой стенкой, подвергаются воздействию сдвиговой деформации, который является результатом тангенциального напряжения сосудистой стенки, обусловленного потоком крови. Величина и закономерности изменений сдвиговой деформации зависят от скорости кровотока, вязкости крови и геометрии сосудов. Сдвиговая деформация контролирует тонус

кровеносных сосудов, процессы ремоделирования сосудистой стенки, взаимодействие клеток крови с эндотелием, коагуляцию и фибринолиз [1,2]. Клетки эндотелия имеют механорецепторный механизм, что определяет их ключевую роль в зависящих от сдвиговой деформации изменениях в кровеносных сосудах. Результаты экспериментов, выполненных *in vivo* на животных, свидетельствуют о том, что shear stress контролирует структуру цитоскелета клеток эндотелия и их функцию, форму клеток, их пространственную ориентацию, процессы репарации и миграции, проницаемость мембран клеток для макромолекул [3]. В экспериментах, выполненных *in vitro* на культуре клеток эндотелия аорты животных в условиях воздействия сдвиговой деформации, было показано, что shear stress регулирует в клетках эндотелия экспрессию многочисленных генов, контролирующих синтез молекул адгезии, факторов роста, супероксиддисмутазы, эндотелиальной NO-синтетазы, α и β субъединиц интегрин, моноцитарного хемоаттрактанта - протеина-1 (MCP-1), эндотелина и других веществ [4-12]. Регуляция сдвиговой деформацией экспрессии генов осуществляется через различные пути передачи сигнала, включая активацию киназ (киназа фокальной адгезии, фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), митоген-активируемые протеинкиназы (MAPs), протеинкиназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK), и c-Jan N-терминальной киназы (JNK) [13-17]). Клетки сердечно-сосудистой системы реагируют на гемодинамические возмущения как на воздействие химических факторов. В процессе трансдукции эндотелий кровеносных сосудов преобразует механические стимулы во внутриклеточные биохимические сигналы. Молекулярные механизмы, обеспечивающие способность клеток эндотелия воспринимать и отвечать на механические воздействия, остаются во многом неясными [18].

В работах различных исследователей приводятся экспериментальные доказательства важной роли белка интегрин в реализации ответа клеток эндотелия на воздействие сдвиговой деформации [15,18-21]. Интегрин (α , β -гетеродимер) относится к трансмембранным гликопротеинам; он исполняет роль рецептора адгезии, обеспечивает связи внеклеточного матрикса с белками цитоскелета и внутриклеточных регуляторных молекул. В клетках млекопитающих идентифицированы 18 α и 8 β субъединиц интегрин. Каждая из субъединиц имеет длинный внеклеточный домен, трансмембранный участок и короткий цитоплазматический домен (20-70 аминокислотных остатков). Внеклеточные домены интегрин взаимодействует с белками внеклеточного матрикса - фибронектином, витронектином, ламинином, коллагеном и фактором Виллибранда [22-24]. Цитоплазматические домены α и β -субъединиц интегрин взаимодействуют с сигнальными молекулами, регулируют внутриклеточные пути передачи сигнала и организацию структуры цитоскелета [25-29]. Молекулы интегрин играют центральную роль в регуляции процессов адгезии, миграции, пролиферации клеток и контролируют апоптоз. Интегрины опосредуют передачу сигнала через мембраны клеток в обоих направлениях. То есть имеет место передача сигнала в двух направлениях: через цитоплазматические мембраны клеток от внеклеточного матрикса к внутриклеточным структурам и обратно. Связывание лигандов внеклеточного матрикса с молекулами интегрин обеспечивает передачу сигнала в клетку. В результате может иметь место реорганизация структуры цитоскелета, экспрессия генов, активация процессов пролиферации клеток [17]. Взаимодействие интегрин с внеклеточным матриксом зависит от латеральной подвижности гетеродимеров и их кластеризации в липидном матриксе мембраны, которые, в свою очередь, определяются конформационными изменениями α и β -гетеродимеров. Этот процесс контролируется взаимодействием интегрин с регуляторными белками RhoA, Cdc42 и Rac, которые относятся к семейству малых G-белков. В ответ на действие регуляторных стимулов эти белки переходят из неактивной, GDP-связанной формы, в активную, GTP-связанную форму и активируют внутриклеточные

регуляторные протеинкиназные каскады [31,32]. RhoA, Cdc42 и Rac выполняют различные роли в регуляции структуры актинового цитоскелета клеток эндотелия кровеносных сосудов. RhoA контролирует фокальную адгезию и формирование актиновых пучков, Cdc42 регулирует формирование псевдоподий. От активности Rac зависит рельеф поверхности мембраны [33,34].

Интегрины также участвуют в передаче сигнала из клеток к местам их взаимодействия с лигандами внеклеточного матрикса, определяя аффинность молекул, участвующих в этом процессе, и соответственно обеспечивается регуляция адгезии клеток [35].

Цитоплазматические домены β -интегринов исполняют центральную роль в реализации механизма передачи сигнала через цитоплазматические мембраны клеток в двух направлениях. Этот механизм опосредуется через прямые ассоциации β -интегринов с сигнальными и структурными молекулами. Выявлено не менее 21 белка, взаимодействующего с цитоплазматическими доменами одного или более β -интегринов. К числу этих белков относятся актин-связывающие, сигнальные и другие белки (табл. 1) [30].

Таблица 1. Белки, связанные с интегринными (по [30] с изменениями).

Белки:	Типы интегринов:
<i>Актин-связывающие белки:</i>	
Талин	$\beta_{1A}, \beta_{1D}, \beta_2, \beta_3$
Филамин	$\beta_{1A}, \beta_2, \beta_3, \beta_7$
α -актинин	β_{1A}, β_2
F-актин	α_2
Миозин	β_3
Скелемин	β_1, β_3
<i>Сигнальные белки:</i>	
ILK	β_1, β_3
FAK	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$
Цитохезин-1	β_2
Цитохезин-3	β_2
<i>Другие белки:</i>	
Паксиллин	$\beta_{1A}, \beta_3, \alpha_4$
Grb2	β_3
Shc	β_3
β_3 -эндонексин	β_3
TAP-20	β_3
CIB	β_5
Кальретикулин	α_{1b}
Кавеолин-1	α
Rack1	α
WAP-1	$\beta_1, \beta_2, \beta_5$
JAB1	β_7
Мелюзин	β_2
MIBP	$\beta_{1A}, \beta_{1B}, \beta_{1D}$
ICAP-1	β_{1A}, β_{1D}
CD98	β_{1A}
DRAL/FHL2	β_{1A}, β_3
	$\alpha_{3A}, \alpha_{3B}, \alpha_{7A}, \beta$

После взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом происходит агрегация молекул интегрина в цитоплазматической мембране и формируются белковые кластеры. Это служит сигналом к запуску процесса фосфорилирования различных внутриклеточных белков. Кластеры интегрина концентрируются в специальных органеллах клеток – ”фокальных контактах”, в которых также локализуются молекулы актина, актин-связывающие, адапторные, регуляторные и другие белки [25,36].

В фокальных контактах с молекулами интегрина взаимодействуют, по крайней мере, три вида сигнальных молекул:

1. киназа фокального контакта;
2. интегрин-связанная киназа;
3. цитохезины [30].

После взаимодействия интегрина с лигандами внеклеточного матрикса и его кластеризации в цитоплазматической мембране в фокальных контактах было выявлено быстрое фосфорилирование тирозинсодержащего фрагмента в молекуле белка с молекулярной массой 120 кДа. Этот белок является нерецепторной цитозольной тирозинкиназой, который концентрируется в фокальных контактах после кластеризации молекул интегрина. Вследствие этого её назвали киназой фокального контакта (FAK) [17]. FAK играет важную роль в механизмах внутриклеточной передачи сигнала от молекул интегрина к регуляторным белкам.

Интегрин-связанная киназа (ILK) является серин-треониновой протеинкиназой, которая непосредственно взаимодействует с цитоплазматическими доменами β_1 и β_3 субединицами интегринов. ILK участвует в регуляции процессов адгезии клеток, сборке экстрацеллюлярного матрикса из молекул фибронектина, а также регулирует экспрессию генов через активацию факторов транскрипции [37].

Цитохезины обеспечивают обмен гуаниновых нуклеотидов для молекул ARF(ADP-ribosylation factors), относящихся к семейству малых GTPаз [38]. Показана важная роль цитохезинов в регуляции формы клеток и их адгезивных свойств [39].

В работе Chen e.a. (1999) рассматриваются два возможных механизма механотрансдукции в клетках эндотелия в ответ на сдвиговую деформацию. В указанной работе было показано, что 12 дин/см² индуцирует быстрое фосфорилирование киназы печени плода (Flk-1), относящейся к рецепторам тирозин-киназы (TRKs). Затем происходит связывание Flk-1 с адапторным белком Shc, который, в свою очередь, взаимодействует с комплексом цитозольных белков Grb2 (growth factor receptor-binding protein 2) и Sos. Последний функционирует как фактор обмена нуклеотидов для молекул Ras - малых G-белков. Происходит связывание Ras с GTP, что приводит к передаче сигнала в клеточное ядро через ERK и JNK, активации факторов транскрипции и экспрессии генов. Второй механизм механотрансдукции в клетках эндотелия в ответ на shear stress реализуется через ассоциацию $\alpha_v\beta_3$ и β_1 интегринов с Shc, что сопровождается связыванием последних с комплексом Grb2+Sos и далее события развиваются аналогично механизму механотрансдукции, который реализуется через активацию Flk-1 (рис. 1).

Вопрос о важной роли интегринов в реализации механизмов механочувствительности в клетках эндотелия обсуждается также в работе Shyu и Chien (2000). Интегрины опосредуют механотрансдукцию через многочисленные протеинкиназы (FAK, c-Src, Fyn, Raf, MEK, ERK), адапторные молекулы (Cas, Shc, PAX, Crk, Grb2, Cav-1), факторы обмена нуклеотидов (Sos, C3G) и G-белки (Ras, Rap1) (рис. 2).

Два возможных механизма механотрансдукции в эндотелиальных клетках в ответ на сдвиговую деформацию (по [15] с изменениями). Первый механизм включается после фосфорилирования одного из рецепторов тирозин-киназы – Flk-1, а второй механизм опосредуется через ассоциацию интегринов $\alpha\beta3$ и $\beta1$. Оба механизма реализуются через идентичные внутриклеточные пути передачи сигнала к геному клетки и включают адапторные белки Shc и Grb2, а также Sos (guanine nucleotide exchange factor), Ras-G белок и протеинкиназы – ERK и JNK. Взаимодействие Flk-1 с Shc реализуется очень быстро, но регуляторные эффекты являются кратковременными. Напротив, ассоциация интегринов с Shc обеспечивает экспрессию генома в течение длительного времени.

Сокращения: AP-1 - transcription factor activator protein 1, TRE 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element, MCP-1 monocyte chemotactic protein-1.

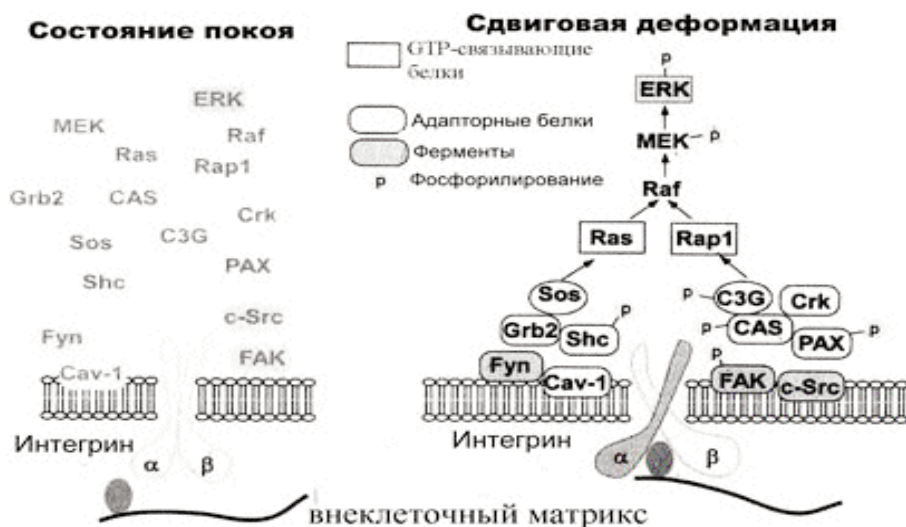


Схема интегрин-опосредуемого механизма механочувствительности клеток эндотелия кровеносных сосудов. В статических условиях молекулы интегринов имеют конформацию, при которой они неактивны, а различные сигнальные молекулы дефосфорилированы и не ассоциированы в сигнальные комплексы. В результате действия сдвиговой деформации на мембраны клеток эндотелия имеют место конформационные изменения молекул интегринов и возрастает их сродство к белкам внеклеточного матрикса. Специфические взаимодействия α и β субъединиц конформированных молекул интегрин активизирует два пути внутриклеточной коммуникации через FAK/c-Src и Cav-1/Fyn, которые конвергируют на уровне Raf (серин/треониновая киназа), MEK (киназа, фосфорилирующая белки по остаткам серина и тирозина) и ERK.

477

играет ключевую роль в механизме, обеспечивающим сохранение циркулирующими лейкоцитами сферической формы, без образования псевдоподий, что необходимо для их беспрепятственного прохождения через микроциркуляторное русло. При воспалительных реакциях наблюдается адгезия лейкоцитов к эндотелию капилляров и их миграции в ткани. Таким образом, существуют физиологические механизмы, обеспечивающие реакцию лейкоцитов на shear stress, которые блокируются в условиях воспалительного процесса. Установлено, что медиаторы воспаления подавляют ответ лейкоцитов на сдвиговую деформацию. Циклический гуанозин-монофосат (сGMP) и его аналоги, а также оксид азота (NO) восстанавливают способность лейкоцитов реагировать на сдвиговую деформацию при воспалении [40,41].

Тромбоциты реагируют на воздействие сдвиговой деформации увеличением выхода молекул ADP в плазму крови, активацией процессов агрегации и адгезии на поверхность сосудистой стенки [42,43]. Показана важная роль пуриновых рецепторов мембран тромбоцитов в возникновении указанных эффектов [44].

Таким образом, все выше изложенное свидетельствует о том, что сдвиговая деформация мембран является регуляторным стимулом, который наряду с действием биологически активных молекул играет важную роль в регуляции функций клеток крови и эндотелия кровеносных сосудов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davies P.F. (1995) *Physiol. Rev.*, **75**, 519-560.
2. Go Y.M., Park H.Y., Maland M.C., Darley-Usmar V.M., Stoyanov B., Wetzker R., Jo H.J. (1998) *Am. J. Physiol.*, **275**, 1898-1904.
3. Langille B.L. (1996) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 834-841.
4. Liu S.-C., Derick L.H., Palek J. (1987) *J. Cell Biol.*, **104**, 527-536.
5. Diamond S.L., Eskin S.G., McIntire L.V. (1989) *Science*, **243**, 1483-1485.
6. Ohtsuka A., Ando J., Korenaga R., Kamiya A., Toyama-Sorimachi N., Miyasaka M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 303-310.
7. Malek A.M., A.L. Greene, S. Izumo (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5999-6003.
8. Malek A.M., Gibbons G.H., Dzau V.J., Izumo S. (1993) *J. Clin. Invest.*, **92**, 2012-2021.
9. Malek A.M., Jackman R., Rosenberg R.D., Izumo S. (1994) *Circ. Res.*, **74**, 852-860.
10. Morita T., Yoshizumi M., Kurihara H., Maemura K., Nagai R., and Yazaki Y. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 256-262.
11. Nagel T., Resnik N., Atkinson W.J., Dewey C.F.J., Gimbrone M.A. Jr. (1994) *J. Clin. Invest.*, **94**, 885-891.
12. Urbich C., Walter D.H., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2000) *Circ. Res.*, **87**, 683-689.
13. Li S., Kim M., Hu Y.L., Jalali S., Schlaepfer D.D., Hunter T., Chien S., Shyy J.Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 30455-30462.
14. Jalali S., Li Y.-S., Sotoudeh M., Yuan S., Li S., Chien S., Shyy J. Y.-J. (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 227-234.
15. Chen K.-D., Li Y.-S., Kim M., Li S., Yuan S., Chien S., Shyy J. Y.-J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 18393-18400.
16. Boudreau N.J., Jones P.L. (1999) *Biochem. J.*, **339**, 481-488.
17. Cary L.A., Guan J. (1999) *Front. in Biosci.*, **4**, 102-113.
18. Tzima E., del Pozo M.A., Shattil S.J., Chien S., Schwartz M.A. (2001) *EMBO J.*, **20**, 4639-4647.
19. Liu Y., Chen B. P.-C., Lu M., Zhu Y., Stermann M.B., Chien S., Shyy J. Y.-J. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 76-81.
20. Alenghat F.J., Ingber D.E. (2002) *Science's STKE*, **119**, pe6-6.
21. Shyy J., Chien S. (2002) *Circ Res.*, **91**, 769-775.
22. Janmey P. (1995) *Handbook of Biological Physics*, vol 1, pp. 805-849.
23. Ren X.D., Kiessens W.B., Schwartz M.A. (1999) *EMBO J.*, **18**, 578-585.

24. *Loster K., Vossmeier D., Hofman W., Reutter W., Danker K.* (2001) *Biochem. J.*, **356**, 233-240.
25. *Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M.* (1996) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **12**, 463-518.
26. *Giancotti F.G., Ruoslahti E.* (1999) *Science*, **285**, 1028-1032.
27. *Hynes R.O.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2588-2590.
28. *Hynes R.O.* (1999) *Trends Cell Biol.*, **9**, M33-37.
29. *Schoenwaelder S.M., Burridge K.* (1999) *Cur. Opin. Cell Biol.*, **11**, 274-286.
30. *Liu S., Calderwoods D.A., Ginsberg M.H.* (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 3563-3571.
31. *Ridley A.J., Hall A.* (1992) *Cell*, **70**, 389-399.
32. *Keely P., Parise L., Juliano R.* (1998) *Trends Cell Biol.*, **8**, 101-106.
33. *Lim L., Manser E., Leung T., Hall C.* (1996) *Eur. J Biochem.*, **242**, 171-185.
34. *Van Aelst L., D'Souza-Schorey C.* (1997) *Genes. Dev.*, **11**, 2295-2322.
35. *Schwartz M.A., Schaller M.D., Ginsberg M.H.* (1995) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **11**, 549-599.
36. *Zamir E., Katz B.Z., Aota S., Yamada K.M., Geiger B., Kam Z.* (1999) *J. Cell Sci.*, **112**, 1655-1669.
37. *Yoganathan T.N., Costello P., Chen X., Jabali M., Yan J., Leung D., Zhang Z., Yee A., Dedhar S., Sanghera J.* (2000) *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1115-1119.
38. *Ogasawara M., Kim S.C., Adamik R., Togawa A., Ferrans V.J., Takeda K., Kirby M., Moss J., Vaughan M.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 3221-3230.
39. *Geiger C., Nagel W., Boehm T., van Kooyk Y., Figdor C.G., Kremmer E., Hogg N., Zetlmann L., Dierks H., Weber K.S.C., Kolanus W.* (2000) *EMBO J.*, **19**, 2525-2536.
40. *Moazzam F., DeLano F.A., Zweifach B. W., Schmid-Schonbein G.W.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5338-5343.
41. *Fukuda S., Yasu T., Predescu D.N., Schmid-Schonbein G.W.* (2000) *Circ. Res.*, **86**, e13-18.
42. *Kawano K., Yoshino H., Aoki N., Udagawa H., Watanuku A., e.a.* (2002) *Clin. Cardiol.*, **25**, 154-160.
43. *Kroll M.H., Hellums J.D., McIntire L.V., Schafer A.I. Moake J.L.* (1996) *Blood*, **88**, 1525-1541.
44. *Turner N.A., Moake J.L., McIntire L.V.* (2001) *Blood*, **98**, 3340-3345.

Поступила: 20. 11. 2004.

ROLE OF MEMBRANE DEFORMATIONS IN REGULATION OF FUNCTIONS
OF CELLS

V.S. Glushkov¹, S.A. Storozhok¹, L.F. Panchenko², E.G. Silina¹

¹Tyumen State Medical Academy, Odesskaja str. 54, Tyumen, 625023, Russia,
tel.: (3452) 225900, fax: (3452) 206200

²Research Inst. for Addiction, Ministry for Health Care, Russian Federation, Moscow 121921,
Malyi Mogiltzevskiy str. 3, tel. (095) 2419446, fax 2419590

There is evidence that cells respond not only to biologically active substances, but also to external mechanical effects. This is especially important for cellular elements of vascular walls and blood. Mechanical treatment cause so-called stretch-deformation of plasma membranes and forces generated by shift of plasma layers induce shear stress. Good experimental evidence exists that mechanical effects influence functional activity of vascular wall and blood cells.

Key words: membranes, shear stress.