

УДК 576.311

АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ – СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ НА СТРАЖЕ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ

Обзор

© 2019 А.С. Шахов, В.Б. Дугина, И.Б. Алиева*

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 05.10.2018

После доработки 22.11.2018

Принята к публикации 22.11.2018

Цитоплазматические актиновые структуры – обязательный компонент цитоскелета эукариотических клеток. Согласно классическим представлениям, актиновые структуры выполняют сократительные и двигательные функции, обеспечивая изменение формы клетки при ее распластывании, поляризации и движении как *in vitro*, так и в живом организме, с ранних стадий эмбриогенеза и в течение всей жизни многоклеточных организмов. Внутриклеточная организация различных типов актиновых структур, их биохимический состав и динамические свойства различаются в клетках разных типов, играя ключевую роль в выполнении специфических клеточных и тканевых функций. В обзоре представлены современные исследования организации и свойств актиновых структур, их взаимодействия с другими компонентами цитоскелета и адгезионными структурами клетки, а также рассматривается их роль в функциональной активности клеток эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндотелий, эндотелиоцит, цитоскелет, актиновые структуры цитоскелета, β -актин, γ -актин, эндотелиальные микрочастицы.

DOI: 10.1134/S0320972519040031

Эндотелиальные клетки (эндотелиоциты) – специализированные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность как крупных, так и мелких сосудов. В норме эндотелиоциты имеют уплощенную форму и плотно прилегают друг к другу, что позволяет им выполнять основную функцию эндотелия, заключающуюся в регуляции сосудистого тонуса и проницаемости сосудистой стенки. Эндотелиальный слой представляет собой своеобразный барьер, обеспечивающий регулируемый обмен между циркулирующей в сосудах кровью и тканевой жидкостью. Эндотелиальный барьер динамичен и крайне чувствителен к воздействию различных стимулов. Нарушение барьерной функции эндотелиальных клеток (дисфункция эндотелия) приводит к нерегулируемому перемещению жидкости, находящейся в просвете сосудов, в окружающие ткани, что нарушает работу соответствующих органов, приводя к различным патологиям, вплоть до летальных [1].

Принципиальную роль в выполнении барьерной функции играет цитоскелет эндотелиаль-

ных клеток, состоящий, как и у клеток других типов, из актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов. Все фибриллярные компоненты любых клеток функционируют взаимосвязано и скоординировано; известно также, что составляющие цитоскелета в той или иной степени взаимодействуют с адгезионными структурами клетки, причем эти взаимодействия имеют несколько уровней регуляции. Изменение нормальной структуры цитоскелета вызывает изменение формы эндотелиоцитов: клетки сокращаются, поджимаются, а между ними возникают промежутки – как следствие, сосудистая проницаемость повышается [2–6].

Главными компонентами, обеспечивающими сокращение клетки, являются ее актиновые структуры. В эндотелиальных клетках процесс полимеризации актина очень динамичен, время обмена актиновых микрофиламентов составляет несколько секунд [7], они эффективно регулируют форму клетки *in vivo* и *in vitro*. Динамичность обеспечивает быструю перестройку актиновых структур и переход от статического фенотипа, для которого типично наличие массивно-

* Адресат для корреспонденции.

го кортикального актинового кольца и минимального количества стресс-фибрилл, к т.н. активированному фенотипу, характеризующемуся слабовыраженным слоем кортикального актина (вплоть до его полного отсутствия) и наличием сжимающих клетку многочисленных стресс-фибрилл.

В целом ряде работ было показано [5], что актиновым структурам принадлежит важнейшая роль в обеспечении барьерной функции эндотелия. В частности, воздействие цитохалазина D, разрушающего актиновый цитоскелет, приводит к резкому увеличению проницаемости эндотелиального монослоя в культивируемых клетках [8], в то время как фаллоидин, стабилизирующий актин и предотвращающий его деполимеризацию, препятствует возникновению барьерной дисфункции [9]. Актиновые микрофиламенты вовлечены во взаимодействие с адгезионными структурами эндотелиоцита [10–14]. Формирование межклеточных промежутков в эндотелиальном слое регулируется балансом сил, сокращающих клетку в направлении ее центра, и сил, генерируемых межклеточными контактами и адгезионными контактами клетки с субстратом, совместно регулирующих форму клетки [14,15]. Обе конкурирующие силы в этой модели связаны через актиновые фибриллы, которые взаимодействуют с многочисленными мембранными адгезионными молекулами фокальных и межклеточных контактов. Таким образом, взаимодействие актина со многими белками (окклюдин, клаудин, нектин, катенин, винкулин и др.), входящими в состав адгезионных структур, которые обеспечивают прикрепление клетки к субстрату и контакт с соседними клетками в монослое, позволяет эндотелиоцитам осуществлять барьерную функцию [16–20]. Актиновым же структурам принадлежит ключевая роль в возникновении эндотелиальной дисфункции [5, 12, 15, 21].

В данной работе представлен обзор современных исследований об организации и свойствах актиновых структур, описанных в эндотелиоцитах, их взаимодействии с другими компонентами цитоскелета и адгезионными структурами клетки, а также их роли в функциональной активности клеток эндотелия.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ИЗОФОРМЫ АКТИНА И ИХ ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ

Биохимические исследования показали, что в организме животных присутствует шесть изоформ актина [22], четыре из которых характерны для клеток мышечных тканей различных ти-

пов, а две – β - и γ -цитоплазматические актины – являются немышечными [23]. Семейство белков актиновых филаментов высококонсервативно, при этом наибольшие различия в аминокислотной последовательности наблюдаются между мышечными и немышечными изоформами [23]. Последовательности аминокислот β - и γ -актина различаются лишь по четырем остаткам, расположенным на *N*-конце полипептидной цепи (номера 2–4 и 10) [22].

Морфологические исследования структур, которые формируются немышечными изоформами актина, стали активно проводиться в последнее десятилетие – в значительной степени благодаря тому, что были получены высокоспецифичные моноклональные антитела против цитоплазматических β - и γ -актина [24]. Оказалось, что в клетках различного происхождения описанные изоформы актина формируют разные актиновые структуры, причем β - и γ -актиновые структуры не только по-разному организованы в пространстве клеток, но и могут выполнять разные функции.

При исследовании эпителиальных клеток были продемонстрированы структурные и функциональные различия двух немышечных изоформ актина [24–26]. Выяснилось, что β -актин образует преимущественно стресс-фибриллы, в то время как разветвленная актиновая сеть в кортикальных областях клетки состоит из γ -актина (рис. 1, а, б). В районе ламеллиподий наблюдается колокализация цитоплазматических β - и γ -актина. В фибробластах и эпителиальных клетках β -актин входит в состав стресс-фибрилл, циркулярных пучков и обнаруживается в районе межклеточных контактов, а γ -актин – в составе кортикальной сети актиновых филаментов (рис. 1, в, г) [24]. Подобное распределение изоформ было обнаружено и в эндотелии [27].

К настоящему времени установлено, что ген β -актина является необходимым для выживания млекопитающих. Так, эмбрионы мышей, лишённые β -актина, имели гораздо меньший размер и погибали на ранних стадиях развития [28], а эмбрионы, в которых не экспрессируется γ -актин, с некоторой задержкой, но проходили пренатальный период развития, при этом после рождения среди таких эмбрионов наблюдался повышенный уровень смертности [29]. Мышечные эмбриональные фибробласты с нокаутом по β -актину чаще погибали апоптозом и демонстрировали сниженную подвижность по сравнению с нормальными клетками [28], но при этом происходила выраженная компенсаторная экспрессия α -гладкомышечного актина и активация Rho-сигнального пути. Ингибиторы ROCK восстанавливали подвижность клеток без β -актина.

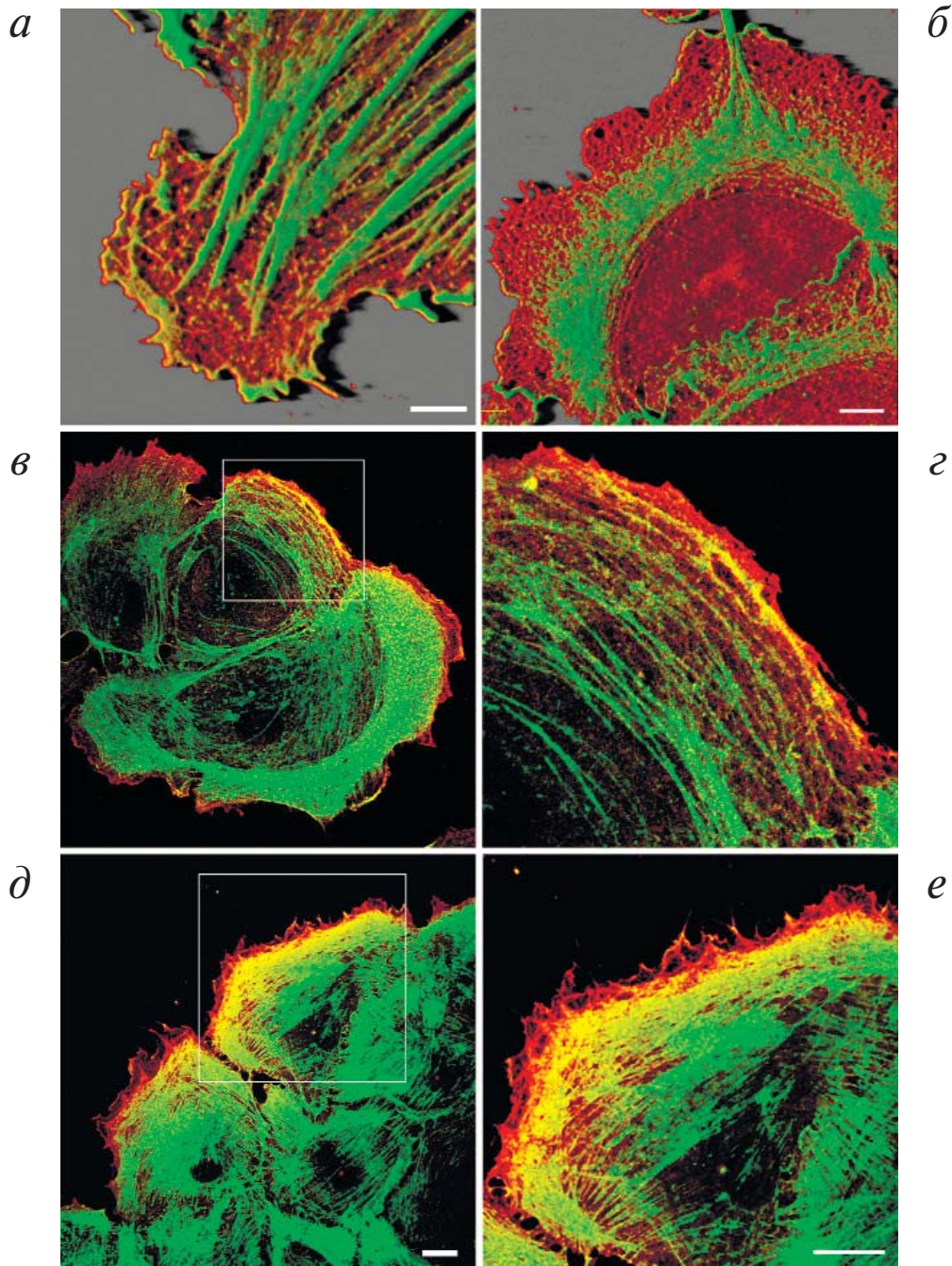


Рис. 1. Распределение β - и γ -актина в цитоплазме клеток различной тканевой принадлежности. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к β -актину (зеленый) и γ -актину (красный), конфокальная микроскопия. *a, б* – Распределение β - и γ -актина в фибробластах и эпителиальных клетках. *a* – Фрагменты ведущего края крысиного фибробласта линии REF при движении в экспериментальную рану; *б* – клетки эпителия почки собаки линии MDCK, распластывающиеся на субстрате; β -актин выявляется, в основном, в стресс-фибриллах у фибробластов (*a*) и кольцевых пучках микрофиламентов в эпителиальных клетках (*б*); γ -актин преимущественно выявляется в виде сети микрофиламентов в ламеллярной части клеток. Изображения получены с помощью 3D-реконструкции серийных оптических срезов, вид с ventральной стороны (масштаб: 5 мкм); *в, г* – различия в распределении β - и γ -актина в клетках эндотелия при распластывании. В клетках культуры эндотелия аорты β -актин образует кольцевые пучки, а γ -актин – ламеллярные сети микрофиламентов; *г* – увеличенный фрагмент ограниченного белой рамкой участка края клетки, представленной на рис. *в* – одиночный оптический x/y срез на базальном уровне клеток (масштаб 10 мкм); *д, е* – различия в распределении β - и γ -актина на ведущем крае клеток эндотелия при движении в рану. В клетках культуры эндотелия аорты сеть γ -актина ярко выражена в протрузиях ведущего края движущихся клеток, β -актин локализуется в пучках микрофиламентов и местах межклеточных контактов; *е* – увеличенный фрагмент ограниченного белой рамкой участка края клетки, представленной на рис. *д* – одиночный оптический x/y срез на базальном уровне клеток (масштаб: 10 мкм)

По-видимому, γ -актин является важным регулятором клеточной миграции [24, 26, 30, 31]. Нокдаун цитоплазматического γ -актина приводит к избыточному фосфорилированию кофилина и легкой цепи миозина, что является свидетельством активации Rho-киназы. При этом аналогичные изменения в фосфорилировании кофилина и миозина не характерны для нокдауна β -актина [30]. Показано, что β -актин играет важную роль в регуляции адгезионных контактов в эпителиальных клетках и определяет базоплазматическую полярность клетки [25]. Подавление синтеза β -актина у эндотелиоцитов вызывало утрату межклеточных контактов, в то время как подавление синтеза γ -актина провоцировало эпителиально-миофибробластный переход, сопровождающийся ростом количества стресс-фибрилл в клетке.

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 [24].

В клетках эндотелия β - и γ -актин выполняют аналогичную роль, они также вовлечены в осуществление барьерной функции.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

В эндотелиальных клетках актиновый цитоскелет представлен актиновыми стресс-фибриллами (рис. 1), кортикальной сетью актиновых фибрилл и мембранным скелетом [15]. Мембранный скелет располагается под плазматической мембраной, достигает толщины в несколько нанометров и состоит из относительно коротких филаментов, спектрина, анкирина и ряда других белков [15]. 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. [15]. Кортикальная актиновая сеть состоит из длинных актиновых филаментов. Кортикальная сеть стабилизируется посредством актин-связывающих белков, таких как кортактин, филамин, спектрин, WASP, VASP и др. [15]. Основной функцией мембранного скелета является поддержание формы клетки, в

то время как кортикальная сеть вовлечена во взаимодействия с соседней клеткой и внеклеточным матриксом. Стресс-фибриллы расположены по всей цитоплазме клеток и состоят из коротких микрофиламентов с чередующейся полярностью. Стресс-фибриллы — пучки актиновых фибрилл, связанные α -актинином и другими актин-связывающими белками; основная роль актиновых стресс-фибрилл эндотелиоцита — обеспечение движения и сокращения клетки [15].

Так же, как и в клетках иной тканевой принадлежности, изоформы β - и γ -актина формируют в эндотелиоцитах разные типы внутриклеточных структур. В эндотелиальных клетках легочной артерии человека (HRAEC) и клетках почечной вены человека (EAhy926) β -актин образует преимущественно стресс-фибриллы [32, 33]. При окрашивании специфическими антителами на β -актин выявлялись пучки стресс-фибрилл, а также округлые микрочастицы в цитоплазме клеток, в то время как разветвленная актиновая сеть в кортикальных областях клетки состояла из γ -актина. Плотность γ -актиновой сети в клетках культуры EA.hy926 выше, чем в клетках HRAEC [33].

Считается, что эндотелиоциты крупных сосудов, в отличие от микроваскулярного эндотелия, не только имеют одинаковую организацию цитоскелета, но и однотипно реагируют на внешние и внутренние воздействия. Действительно, распределение β - и γ -актиновых структур в эндотелиоцитах артерии и вены человека принципиально не различаются (рис. 2), хотя плотность актиновой сети может различаться [32, 33]. Организация цитоскелетных компонентов, например, распределение изоформ актина, меняется при изменении функционального состояния клетки [24, 34]. Действительно, 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 [32, 33]. β -Актиновые микрочастицы обнаруживаются как в одиночных клетках, так и в клетках, имеющих различную протяженность контактов с соседними клетками, при этом микрочастицы распределяются по цитоплазме неравномерно, локализуясь преимущественно около ядра клетки [33]. По мере формирования монослоя происходит концентрация β -актиновых филаментов в районе межклеточных контактов. В эндотелиоцитах γ -актиновая сеть наиболее выражена на свободном крае одиночных клеток (рис. 2). Поскольку на разных этапах образования эндотелиального монослоя морфология β - и γ -актиновых структур эндотелиоци-

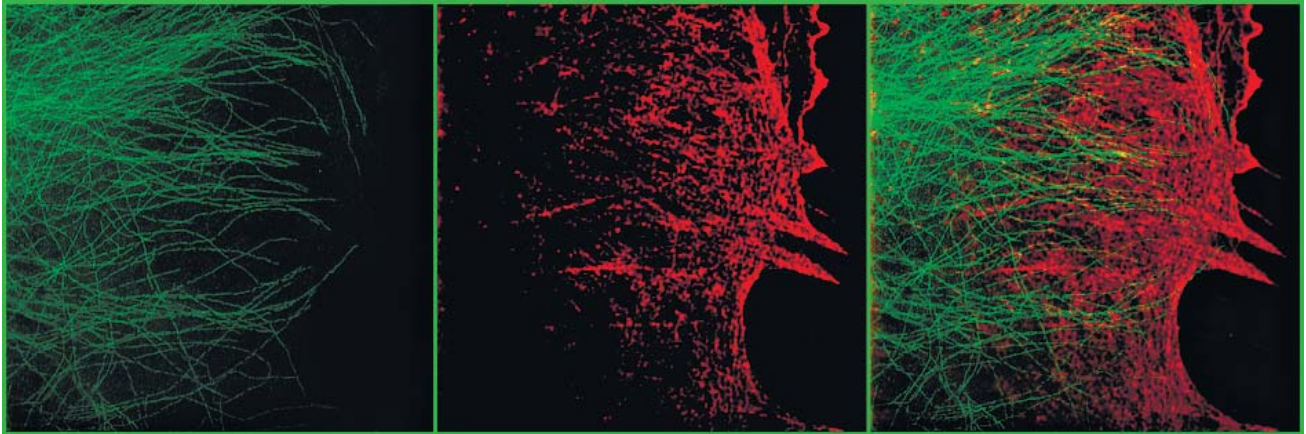


Рис. 2. Микротрубочки и γ -актин в эндотелиоцитах вены человека. Микроскопия сверхвысокого разрешения (SIM) препаратов клеток после двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к тубулину (зеленый) и γ -актину (красный)

тов изменяется не синхронно, можно предполагать, что системы актиновых микрофиламентов, построенные из разных изоформ, могут различаться и функционально [33].

Локализация структур, сформированных разными изоформами актина, меняется при изменении функциональной активности клетки. В настоящее время считается, что скоординированные перестройки β - и γ -актиновых филаментов вносят существенный вклад в образование эндотелиальных микрочастиц [27]. Микрочастицы представляют собой мембранные везикулы, образующиеся при активации клетки либо при индукции апоптоза [35, 36]. Микрочастицы обнаруживали в эритроцитах, лейкоцитах, тромбоцитах, а также в эндотелиальных клетках [35, 36]. Повышенное количество микрочастиц может быть свидетельством протекания ряда заболеваний [36]. Вследствие выхода ионов кальция из ЭПР может происходить активация гельзолина и кальпаина, осуществляющих, соответственно, отсоединение актин-регулирующих белков и расщепление длинных актиновых филаментов, что, наряду с другими изменениями цитоскелетных и адгезионных структур, приводит к формированию микрочастиц [35]. Известно, что базальные β -актиновые стресс-фибриллы могут способствовать перемещению перинуклеарных актиновых структур в противоположную часть клетки, что вызывает разрушение апикальной γ -актиновой сети [27]. В итоге в микрочастицах наблюдается высокий уровень белков, связывающихся с актиновыми филаментами, винкулина и γ -актина и низкий уровень β -актина и базальных белков мембраны [27].

Как уже указывалось, обе немышечные изоформы отвечают за обеспечение барьерной функции эндотелия и регулируют динамику

клеточных контактов. Однако, β -актин жизненно необходим для эндотелиальных клеток: нокаут β -актина приводит к гибели практически всех эндотелиоцитов, в то время как клетки, нокаутные по γ -актину, сохраняют жизнеспособность, но хуже двигаются и теряют способность формировать капилляроподобные структуры [37].

РОЛЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ АКТИНА В ПОДВИЖНОСТИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ И АНГИОГЕНЕЗЕ

Хотя в осуществление барьерной функции функционально вовлечены обе немышечные изоформы актина, их роль в выполнении других функций эндотелиоцитов может различаться. Процесс миграции эндотелиальных клеток является основной характеристикой, связанной с образованием кровеносных сосудов, и в этот процесс активно вовлечены ГТФазы семейства Rho. Известно, что активация малой ГТФазы Rac1 опосредует миграцию эндотелиальных клеток путем реорганизации актинового цитоскелета [38].

К настоящему времени понятно, что цитоплазматический γ -актин играет ключевую роль в подвижности эндотелиальной клетки и хемотаксисе: добавление сыворотки (FCS) либо ростовых факторов (VEGF, FGF β или ECGF) вызывает существенное увеличение подвижности эндотелиоцитов по сравнению с контрольными клетками в отсутствие перечисленных факторов [37]. Описанный эффект не наблюдается в клетках, трансфицированных siРНК γ -актина. В принципе, уменьшение экспрессии γ -актина индуцирует фибробластоподобный фенотип в клетках нетрансформированного эпителия [24] и

приводит к нормализации фенотипа клеток карцином [31]. Потеря γ -цитоплазматического актина стимулировала опосредованную форминном полимеризацию актина и активацию Rho ГТФазы, что, по-видимому, и вызывает эпителиально-миофибробластный переход, сопровождающийся снижением клеточной подвижности [26]. В то же время, была продемонстрирована важная роль γ -актина в процессе ангиогенеза — как регулируемого посредством Rho-киназы, так и ангиогенеза, протекающего независимо от Rho-киназы [37]. Нокаун гена γ -актина не влияет на способность эндотелиоцитов прикрепляться к различным субстратам, в состав которых входит, например, фибронектин, ламинин и коллаген-1 [37], что, по-видимому, означает, что γ -актин не вовлечен во взаимодействие с фокальными контактами.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКТИНОВЫХ СТРУКТУР ЭНДОТЕЛИОЦИТА С ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МИКРОТРУБОЧКАМИ

Фибриллярные компоненты цитоскелета клетки (микротрубочки, актиновые и промежуточные филаменты) и ее адгезионные структуры функционируют взаимосвязано. Во многих экспериментальных работах описана связь между актиновыми филаментами и микротрубочками: структурная [39–42], функциональная [15, 43–46] и регуляторная, осуществляемая через посредство малых ГТФаз [47–50].

Показано, что на организацию актинового цитоскелета напрямую влияет состояние системы микротрубочек. Деполимеризация микротрубочек освобождает активаторы факторов обмена гуаниловых нуклеотидов (RhoGEFs) от связанного тубулина, тем самым вызывая активацию RhoA и формирование стресс-фибрилл [47], тогда как полимеризация микротрубочек изолирует LIM киназу 1 и ограничивает ее доступ к актиновому цитоскелету [51, 52]. Фактор обмена Rap ГТФаз, Rap1, напрямую влияет на динамику микротрубочек, регулируя их рост, и активирует Rap, запуская каскад, приводящий к увеличению содержания кортикального актина [48].

Киназа LIM 1 реорганизует кортикальную актиновую сеть в стресс-фибриллы фосфорилированием и ингибированием активности фактора деполимеризации актина — кофилина [52]. В эндотелиоцитах взаимодействие актиновых структур с микротрубочками обеспечивает сжатие и расслабление клетки в процессе осуществления барьерной функции. 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 мощного стресс-фибрилл [46, 53, 54]. Микротрубочки могут контролировать организацию актинового скелета клетки, локально изменяя сократимость актомиозина на концах стресс-фибрилл [55]. Таким образом, накопленные факты свидетельствуют о том, что взаимодействие актиновых структур клетки и системы микротрубочек является ключевым звеном в обеспечении барьерной функции эндотелия.

В подавляющем большинстве описанных выше работ, в том числе и тех, в которых объектом исследования выступали эндотелиоциты, изучали β -актиновые филаменты [48]. Анализ вовлеченности разных изоформ актина в реорганизацию цитоскелета клеток эндотелия по мере формирования межклеточных контактов показал, что обе системы немышечного (β - и γ -) актина подвержены значительным изменениям [32, 33]. Одновременно изменяется и организация системы микротрубочек на периферии клетки [32, 33]. Работы последних лет показывают, что во взаимодействии с актиновыми филаментами вовлечены динамичные микротрубочки [42, 46], и именно динамичные микротрубочки составляют большинство в клетках эндотелия [46]. Более того, оказалось, что γ -актин способен модулировать динамику микротрубочек, снижая скорость их разборки, снижая частоту пауз и частоту переключений фаз сборки-разборки [56]. Полученные данные позволили авторам предположить наличие механической связи между γ -актиновыми филаментами и микротрубочками.

Роль шивки между микрофиламентами и микротрубочками играют как белки, входящие в состав микротрубочек (например, плюс-концевые белки EB1 [57], APC и ACF7 [42, 58, 59], так и белки *кросс-линкеры* — IQGAP1 [60, 61] или белки MACF1 [62]. Последние связывают актиновую систему и микротрубочки опосредованно — IQGAP1 связывается с CLIP170, а MACF1 имеет сайты связывания с EB1 и EB3. IQGAP1 способен рекрутировать на актин микротрубочки, на концах которых содержится CLIP-170 [61]. Кроме того, комплекс ACF7 и минус-концевой белок микротрубочек CAMSAP3 связывает микротрубочки с актиновыми филаментами и регулирует размер сайтов фокальной адгезии и миграцию клеток [63].

Как уже упоминалось выше, в клетках эпителия и эндотелия β - и γ -изоформы актина фор-

мируют различные актиновые структуры, по-разному организованные в пространстве клеток и выполняющие разные функции. Интересно, что взаимосвязь микротрубочек с актиновыми структурами, образованными различными изоформами, может осуществляться по-разному: плюс-концевой белок микротрубочек EB1 взаимодействует, главным образом, с γ -цитоплазматическим актином [64].

Микротрубочки и актиновая система активно регулируют друг друга в цитоплазме клетки [42]. На динамику актиновых филаментов клетки значительное влияние оказывает система микротрубочек. В частности, плюс-концевой белок микротрубочек CLIP-170 может связываться с формином и ускорять элонгацию актиновых филаментов [65]. Комплексы CLIP-170-mDia1 обеспечивали скорость полимеризации примерно в 18 раз большую, чем на свободном остром конце актинового филамента [65]. Кроме того, важнейшими регуляторами динамики актина в настоящее время считаются белки IQGAPs, описаны его белки-партнеры, участвующие во взаимодействии – белок S100P [66], эзрин [67] и Dlg1 [68].

Очевидно, что для более гибкой временной и пространственной координации динамики цитоскелетных фибрилл необходима иная система регуляции, нежели их механическое соединение. Исследования показали, что в эндотелиоцитах (как и в клетках других типов) связь микротрубочек и актиновой системы осуществляется также и на уровне общих регуляторов, малых ГТФаз семейств Rho и Rac, контролирующих динамику и организацию обеих систем [60, 69–73].

Взаимосвязь микротрубочек и актина в эндотелии можно проиллюстрировать на примере действия фактора роста гепатоцитов (HGF) на эндотелиальный монослой [74]. Повышенный уровень фактора роста HGF в поврежденных легких может свидетельствовать о компенсаторном ответе на острое повреждение легких [75]. HGF-индуцированная активация Rac1 запускает защитные механизмы, направленные на сохранение барьерной функции. HGF вызывает рост микротрубочек на периферии клетки и возрастание доли ацетилованного тубулина [74]. При обработке HGF также увеличивается плотность микротрубочек и плотность EB1-концов на периферии клетки, а также увеличиваются эпизоды непрерывного роста микротрубочек. Вследствие стабилизации системы микротрубочек происходит уменьшение активности агонистов Rho-каскада, что может приводить к реорганизации периферического актина и восстановлению барьерной функции эндотелия [74].

В то же время, HGF способствует ассоциации IQGAP1 (являющимся кросс-линкером ак-

тина и микротрубочек) с микротрубочками на периферии клетки (с помощью Rac), а также приводит к образованию белкового комплекса, включающего в себя EB1, IQGAP1 и кортактин [76]. При нокдауне белка IQGAP происходило снижение стабилизирующего эффекта HGF на кортикальный актин и на эндотелиальный барьер в целом [76]. Позже появились данные о тесной связи HGF и IQGAP с Rac1/Cdc42-специфичным фактором обмена гуаниновых нуклеотидов Asef [75, 77]. При активации Asef образует комплекс с IQGAP1 и локализуется на периферии клетки [77]. Нокдаун Asef существенно ослабляет активацию Rac, а также взаимодействие Rac с IQGAP, накопление IQGAP в кортикальной зоне, взаимодействие IQGAP1 с регуляторами актиновой системы кортактином и Agr3 [77].

Ведущая роль Rho-зависимых механизмов во взаимодействии микротрубочек и актинового цитоскелета при возникновении барьерной дисфункции легочного эндотелия была показана более десяти лет назад [43, 44, 78, 79]. Микротрубочки являются первым звеном в последовательности взаимосвязанных реакций: 1) активация Rho вызывается факторами, в норме ассоциированными с микротрубочками, но высвобождающимися в цитоплазму в результате деполимеризации микротрубочек; 2) стимуляция сокращения клеточного кортекса, сопровождаемая повышением количества актиновых пучков, опосредована активацией Rho [46].

Было установлено, что RhoA, RhoB и RhoC по-разному регулируют барьерную функцию эндотелия [80]. За формирование и поддержание эндотелиального барьера (обеспечение взаимодействия VE-кадгериновых контактов и фибриллярного актина) отвечает, главным образом, RhoB, в то время как RhoA вместе с RhoB действует во время барьерной дисфункции, вызывая образование актиновых стресс-фибрилл [80].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКТИНОВЫХ СТРУКТУР ЭНДОТЕЛИОЦИТА С ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ

В эндотелиальных клетках присутствует несколько типов промежуточных филаментов, имеющих различный белковый состав. В эндотелиоцитах обнаружены виментин [81, 82], нес-тин [83–85], а также нейрофиламенты [86].

Виментиновые филаменты являются основными промежуточными филаментами во всех клетках мезодермального происхождения [87], в том числе и в эндотелиальных клетках [81]. Количество виментина в эндотелиоцитах варьирует в зависимости от того, в каком отделе кровенос-

ной системы они расположены. Эндотелиоциты, выстилающие сосуды органов, несущих повышенную гемодинамическую нагрузку (например, левый желудочек сердца и аорту), имеют повышенное содержание виментина по сравнению с эндотелиоцитами, выделенными из верхней полой вены, предсердия и правого желудочка [87].

Долгое время связи между активным цитоскелетом и промежуточными филаментами не обнаруживали. Только в последние годы было показано, что структурное взаимодействие между актиновыми и виментиновыми филаментами возможно — их связь показана на биохимическом уровне [88, 89]. Показано, что хвостовой домен виментина напрямую взаимодействует с актиновыми филаментами [89], однако до сих пор не обнаружен виментин-связывающий домен фибриллярного актина. Связь актиновых филаментов с виментиновыми может осуществляться на регуляторном уровне — транспорт предшественников виментиновых филаментов находится под контролем актиновых филаментов и регуляторных Rho-киназ и киназы p21 [90].

Совсем недавно появились данные о том, что сборка актиновых стресс-фибрилл может происходить под контролем виментиновых промежуточных филаментов [91]. Оказалось, что снижение экспрессии виментина как в клетках остеосаркомы U2OS, так и в культуре дермальных фибробластов человека, приводит к образованию актиновых стресс-фибрилл и, кроме того, повышению экспрессии F-актина и тропомиозина-4.2 [91]. В конечном счете, было установлено, что виментиновые филаменты способны контролировать активность белка RhoA и сборку стресс-фибрилл с помощью сигнального пути, главным компонентом которого является GEF-H1 (ARHGEF2) [91]. Ранее было установлено, что GEF-H1 ассоциирован с микротрубочками и является фактором обмена гуаниновых нуклеотидов для Rac и Rho [92], обеспечивает взаимосвязь между микротрубочками и актиновыми филаментами с помощью Rho-ГТФаз [47] и подвергается фосфорилированию со стороны PAK1 (эффектора Rac и Cdc42-ГТФаз). Более того, было установлено, что фосфорилирование GEF-H1 при помощи MARK3 необходимо для обеспечения нормальной клеточной полярности и четкой координации систем актиновой филаментов и микротрубочек [93]. Все это может свидетельствовать о тесной регуляции трех систем цитоскелета с помощью GEF-H1, а вполне возможно, и других факторов.

Сеть виментиновых филаментов, по-видимому, способна интегрировать и реориентировать силы, генерируемые актином [94]. Виментиновые филаменты присутствовали в тех районах

фибробласта, где наблюдался десятикратно меньший локальный ретроградный ток актина [94]. Сеть виментиновых филаментов, по некоторым данным [95], может сохранять предшествующую структуру активно перестраивающейся системы микротрубочек, играя роль своеобразного шаблона, что позволяет делать предположения о важной роли виментиновой сети как передатчика сигнала от микротрубочек к претерпевающему значительные перестройки актину [94].

Оказалось также, что линкерный белок плектин играет большую роль в создании упорядоченной виментиновой сети в клетке [96], при этом связь актиновых филаментов и виментина, осуществляемая с помощью плектина, крайне важна для клеточного морфогенеза [97].

Подводя итог анализу современных представлений о взаимодействии фибриллярных цитоскелетных структур эндотелиоцитов, следует заключить, что все три типа структур — актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты — взаимодействуют друг с другом при выполнении эндотелиальной клеткой своих специфических функций. Одним из примеров процесса, в котором задействованы все три системы цитоскелета, является циклическое напряжение, возникающее в результате давления на эндотелий крови снаружи, и внутреннего сокращения гладкой мускулатуры. Было показано, что изменения, вызванные деформацией эндотелиоцита, затрагивают все три системы цитоскелета, но в различное время: сначала изменяется система актиновых филаментов, затем — система микротрубочек и, в заключение, виментиновая сеть [98]. Переориентация филаментов происходила быстрее изменения формы клетки, что может указывать на существование механизма активной адаптации. При дестабилизации актина уже самые незначительные изменения в кинетике актина в значительной степени затрудняют изменение клеточной морфологии и, следовательно, общей переориентации цитоскелетных компонентов [98]. Интересно отметить, что деполимеризация микротрубочек лишь незначительно влияет на скорость переориентации актина, но, тем не менее, значительно влияет на реориентацию самого эндотелиоцита [98].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКТИНОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ЦИТОСКЕЛЕТА С АДГЕЗИОННЫМИ СТРУКТУРАМИ ЭНДОТЕЛИОЦИТА

Актиновые компоненты цитоскелета активно взаимодействуют с адгезионными структурами клетки — фокальными контактами эндотелио-

цита, осуществляющими его прикрепление к субстрату, и межклеточными контактами, соединяющими эндотелиоциты друг с другом, образуя сложно скоординированную систему. В частности, в эндотелиоцитах взаимодействие адгезионных комплексов с актиновым цитоскелетом обеспечивает сжатие и расслабление клетки в процессе осуществления барьерной функции [99, 100].

Взаимодействие актиновых компонентов цитоскелета и адгезионных структур эндотелиальной клетки осуществляется на регуляторном и структурном уровнях. Показано, что упомянутые выше регуляторы актиновой системы – Rho-ГТФазы – могут регулировать также и динамику фокальных и межклеточных контактов [101, 102].

Rho-ГТФаза может быть частью сигнальных механизмов, которые оказывают разнонаправленное воздействие на эндотелиальные клетки. Локальная и зависящая от времени активность Rho-ГТФаз имеет решающее значение для обеспечения оптимального функционирования эндотелиального барьера [103]. Сложность регуляции значительно увеличивается за счет двунаправленного взаимодействия между Rho ГТФазами и кадгеринами: активность Rho-ГТФаз может модулировать клеточную адгезию напрямую – однако, и наоборот, включение кадгеринов в межклеточные контакты также может стимулировать или ингибировать активность Rho ГТФаз [104]. Следовательно, в дополнение к структурной роли как основного белка межклеточных контактов, кадгерина обладают сигнальной способностью регулировать активность Rho-ГТФаз.

Для эндотелиальных клеток наиболее изучены функциональные взаимодействия актинового цитоскелета с адгезионными комплексами, отвечающими за прикрепление клетки к субстрату [99, 100].

В эндотелиальном пласте клетки соединяются друг с другом посредством специфических, исключительно для эндотелиоцитов, VE-кадгериновых контактов. Цитоскелетные механизмы возникновения межклеточных VE-кадгериновых контактов при формировании эндотелиального монослоя связаны с функцией актиновых филаментов. Этот процесс был исследован в лаборатории Т. Свиткиной [105], где было установлено, что первоначальным этапом в формировании межклеточных контактов является образование обширных ламеллиподий. Затем, согласно предложенной авторами модели, происходит преобразование ее в подобные филоподиям мосты, несущие субъединицы VE-кадгерина и дополнительные белки, организующие актин в параллельные пучки [105].

В последнее время выяснилось, что особую роль в стабилизации VE-кадгериновых контак-

тов играет фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) Trio [104]. При непосредственном взаимодействии Trio с VE-кадгеринном происходит локальная активация Rac1 в местах формирования новых адгезивных контактов, что вызывает перестройку актина в районе контакта в кортикальные актиновые пучки [104].

Движение эндотелиальных клеток ассоциировано с формированием осциллирующих схожих с ламеллиподиями структур, которые ориентированы по направлению этого движения [106]. Эти структуры возникают из клеточных контактов, поэтому были названы соответствующе – *junction-based lamellipodia* (JBL) [106]. JBL формируются из фибриллярного актина на ведущем крае клетки, они содержат диффузно распределенный VE-кадгерин, в то время как белок ZO-1 остается в области контакта. Ингибирование полимеризации F-актина блокирует формирование JBL, а ингибирование Rac1 препятствует осцилляции JBL. Оба действия блокируют элонгацию клеток и образование межклеточных VE-кадгериновых контактов [106].

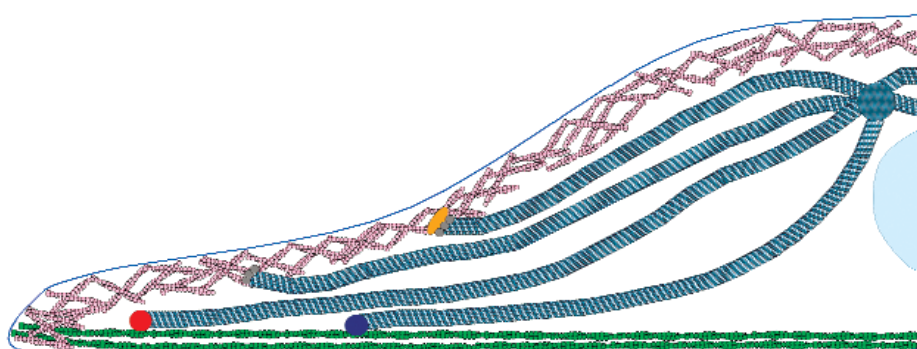
VE-кадгерин сам по себе играет важную регуляторную роль: актин-связывающий белок EPS8 способен связываться непосредственно с VE-кадгеринном и модулировать активность важного транскрипционного кофактора YAP [13].

Анализ литературных данных, в особенности работ последних лет, показывает, что реальная архитектура цитоскелета, способы взаимодействия его компонентов с адгезионными структурами клетки гораздо сложнее, чем представлялось еще 10 лет назад. Это в равной степени относится к клеткам разных типов, в том числе, и к клеткам эндотелия.

В цитоплазме эндотелиальных клеток присутствуют разнообразные компоненты, сформированные β - и γ -актинами, и их распределение в объеме клетки, роль в функциональной активности эндотелиоцитов различны. В эндотелиальных клетках крупных сосудов β -актин образует преимущественно стресс-фибриллы, в то время как γ -актин формирует разветвленную актиновую сеть в кортикальных областях клетки [32, 33]. Скоординированные перестройки β - и γ -актиновых филаментов вносят существенный вклад в образование эндотелиальных микрочастиц [27], представляющих собой мембранные везикулы, образующиеся при активации клетки либо при индукции апоптоза [35, 36]. Обе изоформы актина отвечают за обеспечение барьерной функции эндотелия и регулируют динамику клеточных контактов. Однако β -актин жизненно необходим для эндотелиальных клеток: нокаут β -актина приводит к тотальной гибели

практически всех эндотелиоцитов [37]. Большое значение для функциональной активности эндотелиальных клеток играет связь актиновых структур с микротрубочками (рис. 3). В эндотелиоцитах взаимодействие актиновых структур с микротрубочками обеспечивает сжатие и расслабление клетки в процессе осуществления барьерной функции. При нарушении барьерной функции тромбином или нокодазолом происходит разрушение микротрубочек, в результате чего запускается молекулярный каскад, приводящий к формированию мощных стресс-фибрилл [46, 54, 79]. Микротрубочки могут контролировать организацию актинового скелета клетки, локально изменяя сократимость актомиозина

на концах стресс-фибрилл [55], причем во взаимодействии с актиновыми филаментами вовлечены динамичные микротрубочки [42, 46], составляющие большинство в клетках эндотелия [46]. Динамика микротрубочек модулируется γ -актином, что позволяет предполагать наличие механической связи между γ -актиновыми компонентами и микротрубочками [56]. Эта связь может быть опосредована, причем взаимосвязь микротрубочек с актиновыми структурами, образованными различными изоформами актина, может осуществляться по-разному: например, известно, что плюс-концевой белок микротрубочек EB1 взаимодействует, главным образом, с γ -, но не β -цитоплазматическим актином [64].



- EB1- способен связываться напрямую с γ -актином (Dugina et al., 2016).
- CLASP- предположительно может служить белком-адаптором между EB1 и γ -актином.
- Комплекс белков, взаимодействующих с β -актином (может включать такие белки, как APC, MACF1 и др.; Noordstra and Akhmanova, 2017).
- Комплекс белков EB1-IQGAP-кортактин, взаимодействующих с β -актином (Tian et al., 2014a,b)
- β -актин
- γ -актин
- микротрубочки
- центросома

Рис. 3. Схема, иллюстрирующая взаимосвязь компонентов цитоскелета в эндотелиальной клетке. Микротрубочки взаимодействуют через кросс-линкерные белки с актиновыми и виментиновыми филаментами

Таким образом, различные компоненты актинового системы эндотелиоцита в той или иной степени вовлечены в процесс регуляции проницаемости эндотелия, ее усиление или ослабление под действием внутренних и внешних факторов. Однако индивидуальный вклад каждой актиновой структуры, а также ее конкретная роль в этом процессе различаются и на настоящий момент не до конца понятны. Современные активные исследования, посвященные этим вопросам, ввиду большой практической значимости для медицины и фармакологии, позволяют уже в ближайшем будущем надеяться на достижение полного понимания того, каким образом — на уровне молекулярных и структурных событий — каждая из актиновых структур эндотелиального цитоскелета задействована в осуществлении барьерной функции. В конце концов, понимание молекулярных основ процессов

проницаемости сосудов, включая сигнальные механизмы, регулирующие усиление проницаемости, поможет обнаружить новые терапевтические мишени для лечения заболеваний, связанных с повышением сосудистой проницаемости или неконтролируемым проникновением лейкоцитов в ткани организма.

Финансирование

Работа поддержана РФФИ (грант 18-29-09082) и программой развития Московского университета (MSU Development Program PNR 5.13).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ware, L.B., and Matthay, M.A. (2000) The acute respiratory distress syndrome, *New Engl. J. Med.*, **342**, 1344–1349, doi: org/10.1056/NEJM200005043421806.
- Garcia, J.G., Davis, H.W., and 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, doi: org/10.1002/jcp.1041630311.
- Garcia, J.G., Verin, A.D., and Schaphorst, K.L. (1996) Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability, *Semin. Thromb. Hemostasis*, **22**, 309–315, doi: org/10.1055/s-2007-999025.
- Lum, H., and Malik, A.B. (1996) Mechanisms of increased endothelial permeability, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 787–800.
- Dudek, S., and Garcia, J. (2001) Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability, *J. Appl. Physiol.*, **91**, 1487–1500, doi: org/10.1152/jappl.2001.91.4.1487.
- Groeneveld, A.B.J. (2002) Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome, *Vascular Pharmacol.*, **39**, 247–256, doi: org/10.1016/S1537-1891(03)00013-2.
- Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2000) Cellular regulation of actin network assembly, *Curr. Biol.*, **10**, 728–730, doi: org/10.1016/S0960-9822(00)00751-X.
- Shasby, D.M., Shasby, S.S., Sullivan, J.M., and Peach, M.J. (1982) Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability, *Circ. Res.*, **51**, 657–661.
- Phillips, P.G., Lum, H., Malik, A.B., and Tsan, M.F. (1989) Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin, *Am. J. Physiol.*, **257**, 562–567, doi: org/10.1152/ajpcell.1989.257.3.C562.
- Dejana, E., Bazzoni, G., and Lampugnani, M.G. (1999) Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue, *Exp. Cell. Res.*, **252**, 13–19, doi: org/10.1006/excr.1999.4601.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis, *Physiol. Rev.*, **84**, 869–901, doi: org/10.1152/physrev.00035.2003.
- Moreno, V., Gonzalo, P., Gomez-Escudero, J., Pollan, A., Acin-Perez, R., Breckenridge, M., Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Orsenigo, F., Kadomatsu, K., Chen, C.S., Enriquez, J.A., Dejana, E., Sanchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2014) An emmprin- γ -catenin-Nm23 complex drives ATP production and actomyosin contractility at endothelial junctions, *J. Cell Sci.*, **127**, 3768–3781, doi: org/10.1242/jcs.149518.
- Giampietro, C., Disanza, A., Bravi, L., Barrios-Rodiles, M., Corada, M., Frittoli, E., Savorani, C., Lampugnani, M.G., Boggetti, B., Niessen, C., Wrana, J.L., Scita, G., and Dejana, E. (2015) The actin-binding protein EPS8 binds VE-cadherin and modulates YAP localization and signaling, *J. Cell Biol.*, **211**, 1177–1192, doi: org/10.1083/jcb.201501089.
- Sluysmans, S., Vasileva, E., Spadaro, D., Shah, J., Rouaud, F., and Citi, S. (2017) The role of apical cell–cell junctions and associated cytoskeleton in mechanotransduction, *Biol. Cell*, **109**, 139–161, doi: org/10.1111/boc.201600075.
- Prasain, N., and Stevens, T. (2009) The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes, *Microvasc. Res.*, **77**, 53–63, doi: org/10.1016/j.mvr.2008.09.012.
- Zheng, W., Nurmi, H., Appak, S., Sabine, A., Bovay, E., Korhonen, E.A., Orsenigo, F., Lohela, M., D'Amico, G., Holopainen, T., Leow, C.C., Dejana, E., Petrova, T.V., Augustin, H.G., and Alitalo, K. (2014) Angiopoietin 2 regulates the transformation and integrity of lymphatic endothelial cell junctions, *Genes Dev.*, **28**, 592–603, doi: org/10.1101/gad.237677.114.
- Birdsey, G.M., Shah, A.V., Dufton, N., Reynolds, L.E., Osuna Almagro, L., Yang, Y., Aspalter, I.M., Khan, S.T., Mason, J.C., Dejana, E., Gottgens, B., Hodivala-Dilke, K., Gerhardt, H., Adams, R.H., and Randi, A.M. (2015) The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/ β -catenin signaling, *Dev. Cell*, **32**, 82–96, doi: org/10.1016/j.devcel.2014.11.016.
- Trani, M., and Dejana, E. (2015) New insights in the control of vascular permeability: vascular endothelial-cadherin and other players, *Curr. Opin. Hematol.*, **22**, 267–272.

19. Ziegler, N., Awwad, K., Fisslthaler, B., Reis, M., Devraj, K., Corada, M., Minardi, S.P., Dejana, E., Plate, K.H., Fleming, I., and Liebner, S. (2016) β -Catenin is required for endothelial Cyp1b1 regulation influencing metabolic barrier function, *J. Neurosci.*, **36**, 8921–8935, doi: org/10.1523/jneurosci.0148-16.2016.
20. Cerutti, C., and Ridley, A.J. (2017) Endothelial cell–cell adhesion and signaling, *Exp. Cell Res.*, **358**, 31–38, doi: org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003.
21. Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability, *J. Cell Sci.*, **121**, 2115–2122, doi: org/10.1242/jcs.017897.
22. Vandekerckhove, J., and Weber, K. (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide, *J. Mol. Biol.*, **126**, 783–802, doi: org/10.1016/0022-2836(78)90020-7.
23. Ampe, C., and VanTroys, M. (2017) Mammalian actins: isoform-specific functions and diseases, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **235**, 1–37, doi: 10.1007/164_2016_43.
24. Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clement, S., and Chaponnier, C. (2009) Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity, *J. Cell Sci.*, **122**, 2980–2988, doi: org/10.1242/jcs.041970.
25. Baranwal, S., Naydenov, N.G., Harris, G., Dugina, V., Morgan, K.G., Chaponnier, C., and Ivanov, A.I. (2012) Nonredundant roles of cytoplasmic β - and γ -actin isoforms in regulation of epithelial apical junctions, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 3542–3553, doi: org/10.1091/mbc.E12-02-0162.
26. Lechuga, S., Baranwal, S., Li, C., Naydenov, N.G., Kuemmerle, J.F., Dugina, V., Chaponnier, C., and Ivanov, A.I. (2014) Loss of γ -cytoplasmic actin triggers myofibroblast transition of human epithelial cells, *Mol. Biol. Cell*, **25**, 3133–3146, doi: org/10.1091/mbc.E14-03-0815.
27. Latham, S.L., Chaponnier, C., Dugina, V., Couraud, P.-O., Grau, G.E.R., and Combes, V. (2013) Cooperation between β - and γ -cytoplasmic actins in the mechanical regulation of endothelial microparticle formation, *FASEB J.*, **27**, 672–683, doi: org/10.1096/fj.12-216531.
28. Bunnell, T.M., Burbach, B.J., Shimizu, Y., and Ervasti, J.M. (2011) β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4047–4058, doi: org/10.1091/mbc.E11-06-0582.
29. Bunnell, T.M., and Ervasti, J.M. (2010) Delayed embryonic development and impaired cell growth and survival in Actg1 null mice, *Cytoskeleton*, **67**, 564–572, doi: org/10.1002/cm.20467.
30. Shum, M.S.Y., Pasquier, E., Po'uha, S.T., O'Neill, G.M., Chaponnier, C., Gunning, P.W., and Kavallaris, M. (2011) γ -Actin regulates cell migration and modulates the ROCK signaling pathway, *FASEB J.*, **25**, 4423–4433, doi: org/10.1096/fj.11-185447.
31. Dugina, V., Khromova, N., Rybko, V., Blizniukov, O., Shagieva, G., Chaponnier, C., Kopnin, B., and Kopnin, P. (2015) Tumor promotion by γ and suppression by β non-muscle actin isoforms, *Oncotarget*, **6**, 14556–14571, doi: org/10.18632/oncotarget.3989.
32. Shakhov, A.S., Verin, A.D., and Alieva, I.B. (2014) Reorganization of endothelial cells cytoskeleton during formation of functional monolayer *in vitro*, *Cell Tissue Biol.*, **8**, 138–151, doi: org/10.1134/S1990519X14020096.
33. Shakhov, A.S., Dugina, V.B., and Alieva, I.B. (2015) Reorganization of actin and microtubule systems in human vein endothelial cells during intercellular contact formation, *Cell. Tissue Biol.*, **9**, 299–309, doi: org/10.1134/S1990519X15040112.
34. Shagieva, G.S., Domnina, L.V., Chipysheva, T.A., Ermilova, V.D., Chaponnier, C., and Dugina, V.B. (2012) Actin isoforms and reorganization of adhesion junctions in epithelial-to-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1266–1276, doi: org/10.1134/S0006297912110053.
35. Piccin, A., Murphy, W.G., and Smith, O.P. (2007) Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications, *Blood Rev.*, **21**, 157–171, doi: org/10.1016/j.blre.2006.09.001.
36. George, F.D. (2008) Microparticles in vascular diseases, *Thromb. Res.*, **122**, 55–59, doi: org/10.1016/S0049-3848(08)70020-3.
37. Pasquier, E., Tuset, M.-P., Sinnappan, S., Carnell, M., Macmillan, A., and Kavallaris, M. (2015) γ -Actin plays a key role in endothelial cell motility and neovessel maintenance, *Vasc. Cell*, **7**, 1–16, doi: org/10.1186/s13221-014-0027-2.
38. Zhang, L.J., Tao, B.B., Wang, M.J., Jin, H.M., and Zhu, Y.C. (2012) PI3K p110a isoform-dependent Rho GTPase Rac1 activation mediates H2S-promoted endothelial cell migration *via* actin cytoskeleton reorganization, *PLoS One*, **7**, doi: org/10.1371/journal.pone.0044590.
39. Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M., and Waterman-Storer, C.M. (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis, *Nat. Cell Biol.*, **5**, 599–609, doi: org/10.1038/ncb0703-599.
40. Bershadsky, A.D., Ballestrem, C., Carramusa, L., Zilberman, Y., Gilquin, B., Khochbin, S., Alexandrova, A.Y., Verkhovskiy, A.B., Shemesh, T., and Kozlov, M.M. (2006) Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models, *Eur. J. Cell Biol.*, **85**, 165–173, doi: org/10.1016/j.ejcb.2005.11.001.
41. Applewhite, D.A., Grode, K.D., Keller, D., Zadeh, A.D., Slep, K.C., and Rogers, S.L. (2010) The spectraplaklin short stop is an actin – microtubule cross-linker that contributes to organization of the microtubule network, *Mol. Biol. Cell*, **21**, 1714–1724, doi: org/10.1091/mbc.e10-01-0011.
42. Preciado Lopez, M., Huber, F., Grigoriev, I., Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., Dogterom, M., and Koenderink, G.H. (2014) *In vitro* reconstitution of dynamic micro-tubules interacting with actin filament networks, *Methods Enzymol.*, **540**, 301–320, doi: org/10.1016/B978-0-12-397924-7.00017-0.
43. Birukova, A., Birukov, K., Smurova, K., Kaibuchi, K., Alieva, I., Garcia, J.G., and Verin, A. (2004) Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction, *FASEB J.*, **18**, 1879–1890, doi: org/10.1096/fj.04-2328com.
44. Birukova, A.A., Smurova, K.M., Birukov, K.G., Kaibuchi, K., Garcia, J.G., and Verin, A.D. (2004) Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction, *Microvasc. Res.*, **67**, 64–77, doi: org/10.1016/j.mvr.2003.09.007.
45. Smurova, K.M., Verin, A.D., and Alieva, I.B. (2011) Inhibition of RHO-kinase depends on factors that modify endothelial permeability, *Cell Tissue Biol.*, **5**, 221–227.
46. Alieva, I.B., Zemskov, E.A., Smurova, K.M., Kaverina, I.N., and 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**, 2258–2272, doi: org/10.1002/jcb.24575.
47. Krendel, M., Zenke, F.T., and Bokoch, G.M. (2002) Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton, *Nat. Cell Biol.*, **4**, 294–301, doi: org/10.1038/ncb773.
48. Sehrawat, S., Cullere, X., Patel, S., Italiano, J., and Mayadas, T.N. (2008) Role of Epacl1, an exchange factor

- for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function, *Mol. Biol. Cell*, **19**, 1261–1270, doi: org/10.1091/mbc.E06.
49. Pertz, O. (2010) Spatio-temporal Rho GTPase signaling – where are we now? *J. Cell Sci.*, **123**, 1841–1850, doi: org/10.1242/jcs.064345.
 50. Akhshi, T.K., Wernike, D., and Piekny, A. (2014) Microtubules and actin cross-talk in cell migration and division, *Cytoskeleton (Hoboken)*, **71**, 1–23, doi: org/10.1002/cm.21150.
 51. Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase, *Science*, **285**, 895–898.
 52. Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R., and Voino-Yasenetskaya, T. (2005) LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, **280**, 26533–26542, doi: org/10.1074/jbc.M502921200.
 53. Смурова К.М., Бирюкова А.А., Верин А.Д., Алиева И.Б. (2008) Доз-зависимый эффект нокодазола на цитоскелет эндотелиальных клеток, *Биологические мембраны*, **25**, 181–190.
 54. 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**, 359–366.
 55. Small, J.V., and Kaverina, I. (2003) Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 40–47, doi: org/10.1016/S0955-0674(02)00008-X.
 56. Po'uha, S.T., and Kavallaris, M. (2015) Gamma-actin is involved in regulating centrosome function and mitotic progression in cancer cells, *Cell Cycle*, **14**, 3908–3919, doi: org/10.1080/15384101.2015.1120920.
 57. Alberico, E.O., Zhu, Z.C., Wu, Y.-F.O., Gardner, M.K., Kovar, D.R., and Goodson, H.V. (2016) Interactions between the microtubule binding protein EB1 and F-actin, *J. Mol. Biol.*, **428**, 1304–1314, doi: org/10.1016/j.jmb.2016.01.032.
 58. Lansbergen, G., and Akhmanova, A. (2006) Microtubule plus end: a hub of cellular activities, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **7**, 499–507, doi: org/10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x.
 59. Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 309–322, doi: org/10.1038/nrm2369.
 60. Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002) Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170, *Cell*, **109**, 873–885, doi: org/10.1016/S0092-8674(02)00800-0.
 61. Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. (2004) Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration, *Dev. Cell*, **7**, 871–883, doi: org/10.1016/j.devcel.2004.10.017.
 62. Goryunov, D., and Liem, R.K.H. (2016) Microtubule-actin cross-linking factor 1: domains, interaction partners, and tissue-specific functions, *Methods Enzymol.*, **569**, 331–353, doi: org/10.1016/bs.mie.2015.05.022.
 63. Ning, W., Yu, Y., Xu, H., Liu, X., Wang, D., Wang, J., Wang Y., and Meng, W. (2016) The CAMSAP3-ACF7 complex couples noncentrosomal microtubules with actin filaments to coordinate their dynamics, *Dev. Cell*, **39**, 61–74, doi: org/10.1016/j.devcel.2016.09.003.
 64. Dugina, V., Alieva, I., Khromova, N., Kireev, I., Gunning, P.W., and Kopnin, P. (2016) Interaction of microtubules with the actin cytoskeleton via cross-talk of EB1-containing +TIPs and γ -actin in epithelial cells, *Oncotarget*, **7**, 72699–72715, doi: org/10.18632/oncotarget.12236.
 65. Henty-Ridilla, J.L., Rankova, A., Eskin, J.A., Kenny, K., and Goode, B.L. (2016) Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends, *Science*, **352**, 1004–1009, doi: org/10.1126/science.aaf1709.
 66. Heil, A., Nazmi, A.R., Koltzsch, M., Poeter, M., Austermann, J., Assard, N., Baudier, J., Kaibuchi, K., and Gerke, V. (2011) S100P is a novel interaction partner and regulator of IQGAP1, *J. Biol. Chem.*, **286**, 7227–7238, doi: org/10.1074/jbc.M110.135095.
 67. Nammalwar, R.C., Heil, A., and Gerke, V. (2015) Ezrin interacts with the scaffold protein IQGAP1 and affects its cortical localization, *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 2086–2094, doi: org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.026.
 68. Lasserre, R., Charrin, S., Cuche, C., Danckaert, A., Thoulouze, M.I., de Chaumont, F., Duong, T., Perrault, N., Varin-Blank, N., Olivo-Marin, J.C., Etienne-Manneville, S., Arpin, M., Di Bartolo, V., and Alcover, A. (2010) Ezrin tunes T-cell activation by controlling and microtubule positioning at the immunological synapse, *EMBO J.*, **29**, 2301–2314, doi: org/10.1038/emboj.2010.127.
 69. Cook, T.A., Nagasaki, T., and Gundersen, G.G. (1998) Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lyso-phosphatidic acid, *J. Cell Biol.*, **141**, 175–185.
 70. Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A. (2001) Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16, *J. Biol. Chem.*, **276**, 1677–1680, doi: org/10.1074/jbc.C000635200.
 71. Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T., and Narumiya, S. (2001) Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1, *Nat. Cell Biol.*, **3**, 8–14, doi: org/10.1038/35050598.
 72. Palazzo, A., Cook, T.A., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G. (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules, *Nat. Cell Biol.*, **3**, 723–730, doi: org/10.1038/35087035.
 73. Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 247–269, doi: org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
 74. Tian, X., Tian, Y., Moldobaeva, N., Sarich, N., and Birukova, A.A. (2014) Microtubule dynamics control HGF-induced lung endothelial barrier enhancement, *PLoS One*, **9**, e105912, doi: org/10.1371/journal.pone.0105912.
 75. Tian, X., Tian, Y., Gawlak, G., Meng, F., Kawasaki, Y., Akiyama, T., and Birukova, A.A. (2015) Asef controls vascular endothelial permeability and barrier recovery in the lung, *Mol. Biol. Cell*, **26**, 636–650, doi: org/10.1091/mbc.E14-02-0725.
 76. Tian, Y., Tian, X., Gawlak, G., O'Donnell, J.J., Sacks, D.B., and Birukova, A.A. (2014) IQGAP1 regulates endothelial barrier function via EB1-cortactin cross talk, *Mol. Cell Biol.*, **34**, 3546–3558, doi: org/10.1128/MCB.00248-14.
 77. Tian, Y., Gawlak, G., Shah, A.S., Higginbotham, K., Tian, X., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Sacks, D.B., and Birukova, A.A. (2015) Hepatocyte growth factor-induced Asef-IQGAP1 complex controls cytoskeletal remodeling and endothelial barrier, *J. Biol. Chem.*, **290**, 4097–4109, doi: org/10.1074/jbc.M114.620377.
 78. Villalonga, P., and Ridley, A.J. (2006) Rho GTPases and cell cycle control, *Growth Factors*, **24**, 159–164, doi: org/10.1080/08977190600560651.
 79. Смурова К.М., Бирюкова А.А., Верин А.Д., Алиева И.Б. (2008) Система микротрубочек при барьерной дисфункции эндотелия: деполимеризация на краю клетки и реорганизация во внутренней цитоплазме, *Цитология*, **50**, 49–55.

80. Pronk, M.C.A., van Bezu, J.S.M., van Nieuw Amerongen, G.P., van Hinsbergh, V.W.M., and Hordijk, P.L. (2017) RhoA, RhoB and RhoC differentially regulate endothelial barrier function, *Small GTPases*, 1–19, doi: org/10.1080/21541248.2017.1339767.
81. Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., Vinh, J., Vaubourdoles, M., and Baudin, B. (2003) Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture, *Proteomics*, **3**, 714–723, doi: org/10.1002/pmic.200300409.
82. Liu, T., Guevara, O.E., Warburton, R.R., Hill, N.S., Gaestel, M., and Kayyali, U.S. (2010) Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **299**, 363–373, doi: org/10.1152/ajpcell.00057.2010.
83. Mokry, J., Cizkova, D., Filip, S., Ehrmann, J., Osterreicher, J., Kolar, Z., and English, D. (2004) Nestin expression by newly formed human blood vessels, *Stem Cells Dev.*, **13**, 658–664, doi: org/10.1089/scd.2004.13.658.
84. Mokry, J., Ehrmann, J., Karbanova, J., Cizkova, D., Soukup, T., Suchanek, J., Filip, S., and Kolar, Z. (2008) Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues, *Acta Medica (Hradec Kralove)*, **51**, 173–179.
85. Cizkova, D., Soukup, T., and Mokry, J. (2009) Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles, *Cells Tissues Organs*, **189**, 338–347, doi: org/10.1159/000142161.
86. Rusu, M.C., Jianu, A.M., Pop, F., Hostiuc, S., Leonardi, R., and Curca, G.C. (2012) Immunolocalization of 200 kDa neurofilaments in human cardiac endothelial cells, *Acta Histochem.*, **114**, 842–845, doi: org/10.1016/j.acthis.2012.03.001.
87. Schnittler, H.J., Schmandra, T., and Drenckhahn, D. (1998) Correlation of endothelial vimentin content with hemodynamic parameters, *Histochem. Cell Biol.*, **110**, 161–167, doi: org/10.1007/s004180050277.
88. Cary, R.B., Klymkowsky, M.W., Evans, R.M., Domingo, A., Dent, J.A., and Backhus, L.E. (1994) Vimentin's tail interacts with actin-containing structures *in vivo*, *J. Cell Sci.*, **107**, 1609–1622.
89. Esue, O., Carson, A.A., Tseng, Y., and Wirtz, D. (2006) A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30393–30399, doi: org/10.1074/jbc.M605452200.
90. Robert, A., Herrmann, H., Davidson, M.W., and Gelfand, V.I. (2014) Microtubule-dependent transport of vimentin filament precursors is regulated by actin and by the concerted action of Rho- and p21-activated kinases, *FASEB J.*, **28**, 2879–2890, doi: org/10.1096/fj.14-250019.
91. Jiu, Y., Peranen, J., Schaible, N., Cheng, F., Eriksson, J.E., Krishnan, R., and Lappalainen, P. (2017) Vimentin intermediate filaments control actin stress fiber assembly through GEF-H1 and RhoA, *J. Cell Sci.*, **130**, 892–902, doi: org/10.1242/jcs.196881.
92. Ren, Y., Li, R., Zheng, Y., and Busch, H. (1998) Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases, *J. Biol. Chem.*, **273**, 34954–34960, doi: org/10.1074/jbc.273.52.34954.
93. Sandi, M.-J., Marshall, C.B., Balan, M., Coyaud, E., Zhou, M., Monson, D.M., Ishiyama, N., Chandrakumar, A.A., La Rose, J., Couzens, A.L., Gingras, A.C., Raught, B., Xu, W., Ikura, M., Morrison, D.K., and Rottapel, R. (2017) MARK3-mediated phosphorylation of ARHGEF2 couples microtubules to the actin cytoskeleton to establish cell polarity, *Sci. Sign.*, **10**, 3286, doi: org/10.1126/scisignal.aan3286.
94. Costigliola, N., Ding, L., Burckhardt, C.J., Han, S.J., Gutierrez, E., and Mota, A. (2017) Vimentin fibers orient traction stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 5195–5200, doi: org/10.1073/pnas.1614610114.
95. Gan, Z., Ding, L., Burckhardt, C.J., Lowery, J., Zaritsky, A., Sitterley, K., Mota, A., Costigliola, N., Starker, C.G., Voytas, D.F., Tytell, J., Goldman, R.D., and Danuser, G. (2016) Vimentin intermediate filaments template microtubule networks to enhance persistence in cell polarity and directed migration, *Cell Systems*, **3**, 252–263, doi: org/10.1016/j.cels.2016.08.007.
96. Castanon, M.J., Walko, G., Winter, L., and Wiche, G. (2013) Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve, *Histochem. Cell Biol.*, **140**, 33–53, doi: org/10.1007/s00418-013-1102-0.
97. Jiu, Y., Lehtimäki, J., Tojkander, S., Cheng, F., Jaalinoja, H., Liu, X., Varjosalo, M., Eriksson, J.E., and Lappalainen, P. (2015) Bidirectional interplay between vimentin intermediate filaments and contractile actin stress fibers, *Cell Rep.*, **11**, 1511–1518, doi: org/10.1016/j.celrep.2015.05.008.
98. Zielinski, A., Linnartz, C., Pleschka, C., Dreissen, G., Springer, R., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2018) Reorientation dynamics and structural interdependencies of actin, microtubules and intermediate filaments upon cyclic stretch application, *Cytoskeleton*, **75**, 385–394, doi: org/10.1002/cm.21470.
99. Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **4**, 487–525, doi: org/10.1146/annurev.cb.04.110188.002415.
100. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 793–805, doi: org/10.1038/35099066.
101. Mehta, D., and Malik, A.B. (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability, *Physiol. Rev.*, **86**, 279–367, doi: org/10.1152/physrev.00012.2005.
102. Cerutti, C., and Ridley, A.J. (2017) Endothelial cell-cell adhesion and signaling, *Exper. Cell Res.*, **358**, 31–38, doi: org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003.
103. Van Buul, J.D., and Timmerman, I. (2016) Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions, *Small GTPases*, **7**, 21–31, doi: org/10.1080/21541248.2015.1131802.
104. Timmerman, I., Heemskerk, N., Kroon, J., Schaefer, A., van Rijssel, J., Hoogenboezem, M., van Unen, J., Goedhart, J., Gadella, T.W. Jr, Yin, T., Wu, Y., Huvneers, S., and van Buul, J.D. (2015) A local VE-cadherin and Trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through Rac1, *J. Cell Sci.*, **128**, 3041–3054, doi: org/10.1242/jcs.168674.
105. Hoelzle, M.K., and Svitkina, T. (2012) The cytoskeletal mechanisms of cell–cell junction formation in endothelial cells, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 310–323, doi: org/10.1091/mbc.E11-08-0719.
106. Paatero, I., Sauteur, L., Lee, M., Lagendijk, A.K., Heutschi, D., Wiesner, C., Guzman, C., Bieli, D., Hogan, B.M., Affolter, M., and Belting, H.-G. (2018) Junction-based lamellipodia drive endothelial cell rearrangements *in vivo* via a VE-cadherin-F-actin based oscillatory cell–cell interaction, *Nat. Commun.*, **9**, 3545, doi: org/10.1038/s41467-018-05851-9.

**ACTIN CYTOSKELETON OF ENDOTHELIOCYTES –
STRUCTURAL FEATURES OF THE ORGANIZATION
ON GUARD BARRIER FUNCTION**

A. S. Shakhov, V. B. Dugina, and I. B. Alieva*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov
Moscow State University, 119991 Moscow, Russia;
E-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru*

Received October 5, 2018
Revised November 22, 2018
Accepted November 22, 2018

Cytoplasmic actin structures are an essential component of the eukaryotic cell cytoskeleton. According to classical concepts, actin structures perform contractile and motor functions, providing changes in the cell shape during its spreading, polarization and movement both *in vitro* and in a living organism, from the early stages of embryogenesis and throughout the whole life of multicellular organisms. The intracellular organization of various types of actin structures, their biochemical composition and dynamic properties vary in cells of different types, playing a key role in realization of specific cellular and tissue functions. This paper provides an overview of current research on the organization and properties of actin structures described in endothelial cells, their interaction with other components of the cytoskeleton and cell adhesive structures, as well as their role in the functional activity of endothelial cells.

Keywords: endothelium, endothelial cell, cytoskeleton, actin structures of cytoskeleton, β -actin, γ -actin, endothelial microparticles