

# ОГЛЯДИ

УДК 577.152.3:591.87+616.006.6

## ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы В ПОЛЯРИЗОВАННЫХ КЛЕТКАХ

А. А. КАПЛЯ<sup>1</sup>, В. С. МОРОЗОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: karlya@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Луганский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина

В обзоре приведены новейшие представления о фундаментальной роли  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы в регуляции морфогенеза поляризованных клеток эпителия, участии энзима в процессах сигнальной трансдукции, формировании межмолекулярных сигнальных комплексов. С учетом современных методических подходов детально рассмотрены вопросы: специфики сортировки протеинов в поляризованных клетках, вовлечения  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы в регуляцию межклеточных взаимодействий в эпителии, организации молекул  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы, протеинов адгезии и цитоскелета в едином структурно-функциональном комплексе, их координированной экспрессии. Проанализированы механизмы взаимодействия энзима с протеинами-партнерами, роль конкретных функциональных доменов, мотивов и сайтов связывания. На основе данных литературы и собственных исследований сделан вывод, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза вовлечена в развитие патологий, которые происходят с нарушением фенотипа поляризованных эпителиальных клеток, в частности, в процессах злокачественного роста.

**Ключевые слова:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза, эпителий, межклеточные взаимодействия, протеины-партнеры, сигнальная трансдукция, злокачественный рост.

**Н** $\text{a}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза — это специфичный интегральный энзим плазматических мембран, принадлежащий к семейству АТФ-аз Р-типа. Он непосредственно контролирует гомеостаз ионов натрия и калия, тем самым опосредованно регулирует функционирование множества зависящих от энергии электрохимического градиента  $\text{Na}^+$  метаболических и сигнальных путей в клетках животных, в том числе векторный транспорт ионов и метаболитов в поляризованных клетках [1, 2].

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза — интенсивно исследуемый более полстолетия энзим. Однако, выявляются новейшие аспекты ее функционирования в регуляторном обеспечении фундаментальных процессов клеточной биологии: экспрессии генов, пролиферации и дифференцировки клеток, сигнальной трансдукции [3,4]. Специфика роли энзима в этих процессах проявляется в эпителиальной ткани ввиду феноменологии ее морфогенеза, а нарушение закономерностей формирования фенотипа поляризованных клеток при патологических состояниях организма: ишемии, воспалениях, злокачественной трансформации, сопровождается дефектом или функциональной реорганизацией изоэнзимного комплекса  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [5, 6].

В настоящем обзоре проведен анализ современного состояния исследований функционирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы в поляризованных клетках, ее участия в регуляции эпителиального морфогенеза, клеточной подвижности, в клеточной сигнализации.

### 1. Уровни регуляторного контроля $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы

Минимальная функциональная единица  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы представляет собой  $\alpha\beta$ -гетеродимер [1, 2]. Вспомогательная гликозилированная  $\beta$ -субъединица ( $\text{Na}, \text{K}-\beta$ ) выполняет ключевую роль молекулярного шаперона и рецептора каталитической  $\alpha$ -субъединицы ( $\text{Na}, \text{K}-\alpha$ ) в биогенезе энзима [7]. Двухмерная трансмембранная модель  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы приведена на схеме (рис. 1). В настоящее время пристальное внимание привлекает самостоятельная роль  $\text{Na}, \text{K}-\beta$  в обеспечении межклеточной адгезии [8], в частности в связи с особенностями эпителиального морфогенеза и ионного транспорта.

Известно четыре изоформы  $\text{Na}, \text{K}-\alpha$  и три —  $\text{Na}, \text{K}-\beta$  [9]. Это истинные продукты отдельных генов, экспрессия которых, в отличие от  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы, осуществляется без альтер-

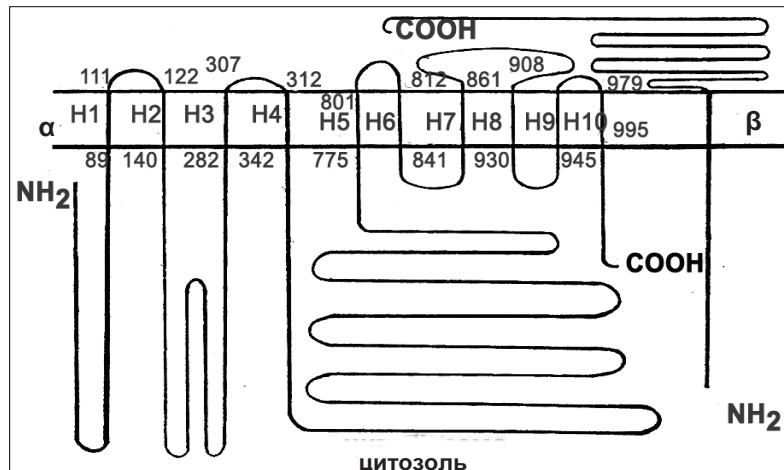


Рис. 1. Схематическая двухмерная модель мембранной топологии  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в плазматической мембране в соответствии с работами [1,2]. Нумерация пограничных аминокислот в мембранных сегментах Н1-10 дана для  $\alpha 1$ -изоформы энзима тканей овцы

нативного сплайсинга. Конститутивным изоэнзимом является  $\alpha 1\beta 1$ -комплекс, а  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  и  $\beta 2$  – специализированные или эффекторные изоформы. В некоторых типах эпителия наряду с конститутивными изоформами  $\alpha 1$  и  $\beta 1$  обнаруживают изоформы:  $\alpha 3$  (слизистая толстой кишки [10]),  $\beta 2$  (эмбриональная почка человека [11]),  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  и  $\beta 3$  (реснитчатый эпителий глаза крысы и мыши [12]). Изоэнзимы различаются по каталитическим свойствам (по сродству к ионам натрия, АТФ, скорости оборота энзима, зависимости от мембранного потенциала, антагонизму между ионами калия и убаином) [13] и особенностям физиологического контроля [14]. Именно изоэнзимный состав является мишенью регуляции и адаптации, претерпевая реорганизацию при функциональных и патологических состояниях организма [6, 15, 16].

Как и следует ожидать для энзима с ключевой физиологической функцией, регуляторный контроль в клетке осуществляется на нескольких перекрестных уровнях, обеспечивающих изменение интенсивности работы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в соответствии с возникающими потребностями клетки. Это позволяет адекватно отвечать на изменение условий функционирования и обеспечивает устойчивость клеточного метаболизма [2].

Функциональная активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы является интегральным показателем изменений мембранного окружения энзима [17] (в соответствии с мембранно-ассоциированными свойствами изоэнзимов [18]), состояния антиоксидантных систем клетки [19,20], субклеточной локализации в плазматической мембране [21], специфики клеточных регуля-

торных механизмов, модулирующих ее активность (включая оперативную регуляцию) [22] и экспрессию отдельных изоформ субъединиц  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [14].

В нативных условиях обеспечивается сбалансированный биосинтез обеих субъединиц  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [23] в соответствии с генетически детерминированным видовым, тканевым, онтогенетическим изоэнзимным составом. В клетке, очевидно, существуют механизмы индивидуального контроля экспрессии субъединиц энзима. Так, при эктопической экспрессии  $\beta 1$ -субъединицы в культуре эпителиальных клеток MSV-MDCK (трансформированные вирусом саркомы Молони клетки почки собаки Madin-Darby) с низким эндогенным уровнем  $\beta 1$ -субъединицы (ее экспрессия специфически подавлена транскрипционным супрессором Snail) возрастание протеинового уровня  $\alpha 1$ -субъединицы происходит не за счет усиления экспрессии гена, а путем повышения эффективности трансляции [24]. Сверхэкспрессия меченной эпитопными метками  $\beta 1$ -субъединицы под контролем тетрациклинзависимого промотора в MDCK-клетках приводила к резкому возрастанию количества ассоциированных  $\alpha 1\beta 1$ -комплексов энзима в соответствии с количеством зрелых  $\beta 1$ -субъединиц [23]. Таким образом, контроль экспрессии гена  $\beta$ -субъединицы может быть механизмом, лимитирующим формирование функционального олигомера  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы.

В последние годы интенсивно исследуется новый уникальный механизм при участии эндогенных протеиновых регуляторов  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы – коротких одноцепочечных

трансмембранных протеинов семейства FXYD (консервативный мотив во внеклеточном сегменте: фенилаланин-Х-тирозин-аспартат). Известно семь представителей, большинство из которых рассматриваются в качестве дополнительной субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. Для шести из них установлено специфическое взаимодействие с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой. Это FXYD1 (фосфолеман, экспрессируется в сердце и скелетных мышцах), FXYD2 ( $\gamma$ -субъединица, экспрессируется в почках, имеет два сплайс-варианта —  $\gamma\alpha$  и  $\gamma\beta$  [25]), FXYD3 (Mat-8, экспрессируется в желудке, толстой кишке, в опухолях), FXYD4 (CHIF, экспрессируется в почках и толстой кишке), FXYD5 (Ric, формирует ионный канал), FXYD7 (экспрессируется в мозгу). Они обеспечивают тонкую тканевую и изоформоспецифичную модуляцию кинетических свойств  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, в частности сродства к ионам  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , в соответствии с физиологическими потребностями. Нарушение такой регуляции может иметь последствия в патогенезе [26, 27].

В настоящее время получены убедительные подтверждения гипотезы о многофункциональности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, которая опосредует свое влияние на клеточные процессы также независимо от транспортно-гидролитической функции, формируя путем протеин-протеиновых взаимодействий рецепторные сигнальные комплексы [3, 4, 21, 28–31]. Ниже рассмотрены современные исследования с использованием методологии генной инженерии, протеомного анализа с методами коиммунопреципитации, аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе (GST-pull-down assay), направленные на поиск потенциальных молекулярных партнеров  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, оценку протеин-протеиновых взаимодействий, выяснение внутримолекулярных сигналов сортировки, необходимых для проявления структурно-функциональной роли  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в обеспечении эпителиальной полярности и в процессах сигнальной трансдукции.

## 2. Роль $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в регуляции межклеточных взаимодействий в эпителии

### Сортировка в поляризованных эпителиальных клетках

Особенности сортировки, топогенеза и регуляции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в поляризованных клетках предполагают существование сложной последовательности меж- и внутримолекулярных взаимодействий, обеспечивающих внутриклеточный перенос, распределение

и функциональные свойства энзима [21, 28]. Формирование полярности клеточной мембраны транспортирующего эпителия имеет три четко выраженные стадии: межклеточное распознавание и адгезия, перестройка клеточной поверхности с образованием структурно и функционально различающихся доменов плазматической мембраны, обеспечение векторной функции [32]. Плотные и адгезионные контакты формируют апикальный соединительный комплекс, который обеспечивает межклеточные взаимодействия, служит барьером межклеточной проницаемости и разделяет плазматическую мембрану на два структурно разнородных участка (апикальный и базолатеральный) со специфичным протеино-липидным составом. В поляризованных эпителиальных клетках положение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы строго детерминировано и асимметрично в связи с потребностью векторного транспорта ионов [33]. В большинстве случаев энзим локализован в базолатеральном отделе плазматической мембраны, где он регулирует реабсорбцию ионов и растворенных веществ в эпителии нефрона почки или трансэпителиальный транспорт ионов и метаболитов в желудочно-кишечном тракте. Противоположная апикальная локализация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы характерна для пигментного эпителия сетчатки, где энзим обеспечивает функционирование  $\text{Na}^+$ -зависимых транспортеров [34], и для сосудисто-эпителиального сплетения желудочков мозга (*plexus choroideus*), где он регулирует секрецию  $\text{Na}^+$  и образование цереброспинальной жидкости [35].

Экспрессия межмолекулярных химер  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы/ $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почки свиньи (LLC-PK1) позволила выявить аминокислотные последовательности сигнальных участков сортировки. Следует отметить, что  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза париетальных клеток желудка — другой представитель семейства ионотранспортирующих АТФ-аз Р-типа, также является  $\alpha\beta$ -гетеродимером, высокомолекулярным  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азе. Однако  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза сортируется в апикальный отдел плазмалеммы или накапливается в преапикальных везикулярных компартментах. Стимулирование кислотной секреции вызывает встраивание внутриклеточного пула  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в апикальную мембрану, а ингибирование кислотопродукции сопровождается реинтернализацией энзима [36, 37]. В  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы закодированы независимые сигналы, обеспечивающие апикальную локализацию

энзима [38]. В то же время, сигнал для базолатеральной сортировки, содержащийся в первой половине N-концевой аминокислотной последовательности  $\alpha$ -субъединицы (519 аминокислотных остатков)  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы доминирует над информацией, присутствующей в  $\beta$ -субъединице  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [39]. Установлено, что аминокислотная последовательность четвертого трансмембранного сегмента  $\alpha$ -субъединицы  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы определяет встраивание энзима в апикальную мембрану [40]. Наличие этого мотива в составе химеры  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы достаточно для переориентации ее встраивания в апикальную мембрану эпителиальных клеток при трансфекции. В свою очередь, в апикальную мембрану встраивается также химера, содержащая четвертый трансмембранный домен каталитической субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, фланкированный с обеих сторон аминокислотными последовательностями  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. Полагают, что конформационное взаимодействие между четвертым трансмембранным доменом и прилежащими доменами, то есть третичная структура этого участка, обеспечивает сигнал для сортировки в апикальную мембрану [41]. В то же время, только один сигнал сортировки — тирозинсодержащий мотив выявлен в N-концевом цитоплазматическом сегменте  $\beta$ -субъединицы  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы (предположительно тирозин-20). Однако, механизмы интерпретации данного сигнала неоднозначны в разных эпителиальных клетках. При трансфекции клеток LLC-PK1 этот мотив определяет встраивание  $\beta$ -субъединицы  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в апикальную мембрану, а в клетках MDCK — в базолатеральную мембрану [42]. Вероятно, тирозинсодержащий мотив  $\beta$ -субъединицы обеспечивает участие  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в процессах эндоцитоза и необходим для интернализации и прекращения кислотопродукции. Сайтнаправленная замена на аланин приводит к конститутивной стабилизации энзима в апикальной мембране париетальных клеток и гиперсекреции соляной кислоты в желудке трансгенных мышей [40].

Таким образом, физиологически необходимый топогенез энзима при формировании поляризованной клеточной структуры эпителия обеспечивается за счет специфического иерархического взаимодействия внутримолекулярных сигналов сортировки с регуляторными механизмами сортировки в аппарате Гольджи и плазматической мембране при участии мультипротеинового ансамбля молекул адгезии и цитоскелета, мембраноспецифичного везикулярного транспорта протеинов [43].

### ***Взаимодействие $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, протеинов адгезии и цитоскелета***

Взаимодействие с примембранным актин-спектриновым цитоскелетом обеспечивают пространственное расположение и стабилизацию интегральных мембранных протеинов, в том числе  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, в пределах функциональных доменов, контроль их латеральной диффузии в плазматической мембране. Повсеместно встречающийся периферический адаптерный протеин анкирин взаимодействует с участками на средней части молекулы спектрина (или его неэритроцитарного аналога фодрина). Другие адаптеры, в том числе аддуцин, обеспечивая взаимодействие с концевым участком спектрина, в свою очередь служат линкерами спектрина с молекулами актина [44].

В участках межклеточных контактов MDCK-клеток первоначально были обнаружены отдельные высокоафинные мембранные комплексы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы и адгезионного протеина E-кадгерина с протеинами цитоскелета анкирином и фодрином [45,46].  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза колокализуется с протеинами адгезионных контактов на всех стадиях их формирования, а также при интернализации в условиях разрушения межклеточных контактов в бескальциевой среде [47]. Именно индуцируемые E-кадгерином межклеточные адгезионные контакты обеспечивают сопряженное с реорганизацией цитоскелета строго ограниченное асимметричное перераспределение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы на клеточной поверхности при формировании эпителиальной полярности еще до образования плотных контактов в культуре [32,48]. В клетках пигментного эпителия сетчатки в механизм формирования противоположной полярности также вовлечен мультипротеиновый примембранный анкирин/фодриновый комплекс в соединении с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой, который собирается при апикальной мембране [49].

Выявлено прямое взаимодействие анкирина с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой в поляризованных эпителиальных клетках [50]. Детерминанты связывания с анкирином сформированы третичной структурой  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [51]. Анкиринсвязывающие мотивы, расположенные на большом (третьем) цитоплазматическом домене  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы поляризованных эпителиальных клеток (рис. 1) и цитоплазматическом домене  $\text{HCO}_3^-, \text{Cl}^-$  — анионообменника эритроцитов (AE-1), представляют собой эволюционно консервативные аминокислотные кластеры ALLK/ALLLK соответственно. Взаимодействие анкирина с ALLK экспонирует другие

участки связывания на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азе [52]. Выявлены сайты связывания анкирина G на второй цитоплазматической петле и анкирина B — на цитоплазматическом N-концевом сегменте  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [53, 54]. Адаптерная функция анкирина проявляется не только на уровне плазматической мембраны; он облегчает внутриклеточный транспорт  $\alpha 1\beta 1$ -гетеродимера  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в секреторных путях аппарата Гольджи поляризованных клеток. Наследственные болезни, связанные с нарушениями анкирин-зависимых механизмов, сопровождаются ошибочной локализацией мембранных протеинов [55].

Также установлено прямое и специфичное связывание аддуцина с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой почек в бесклеточной системе (конкретный сайт не обнаружен), что предполагает наличие таких взаимодействий в интактных мембранах почечного эпителия [56]. В дополнение к статичной роли в стабилизации расположения энзима в плазматической мембране анкирин и аддуцин в наномолярном диапазоне концентраций также оказывают активирующее действие на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азу *in vitro*, увеличивая скорость конформационных переходов в каталитическом цикле. Однако их действие не аддитивно, аддуцин более эффективен, что проявляется в селективной активации стадии, лимитирующей деокклюзию ионов  $\text{K}^+$ , и увеличении скорости конформационного перехода  $\text{E}(2)(\text{K}) \rightarrow \text{E}(1)(\text{Na})$  или  $\text{E}(2)(\text{K}) \cdot \text{ATP} \rightarrow \text{E}(1)\text{Na} \cdot \text{ATP}$  [56].

Полагают, что развитие ряда форм эссенциальной гипертензии, по крайней мере частично, объясняется сверхстимуляцией  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса почек аддуцином в результате генетических изменений в его молекуле и сопутствующего увеличения внеклеточного объема жидкости [56]. Полиморфизм в аминокислотной последовательности  $\alpha$ -аддуцина связан с изменением кровяного давления при эссенциальной гипертензии у пациентов и линий гипертензивных крыс. Несмотря на различный характер мутаций, в обоих случаях наблюдаются сходные функциональные изменения реабсорбции  $\text{Na}^+$  в почках. В бесклеточной системе и при трансфекции мутантного  $\alpha$ -аддуцина в клетки почечных канальцев наблюдается усиление связывания аддуцина с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой и активация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса [56, 57]. Такая активация объясняется увеличением числа функциональных единиц в результате снижения скорости конститутивного клатринзависимого эндоцитоза  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [58] и лежит в основе нарушений эндогенных механизмов динамической регуляции

эндоцитоза  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в ответ на натрий-уретические сигналы при некоторых формах гипертензии [59].

Активность и поляризованное распределение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в почечном эпителии зависит также от ее взаимодействия с актиновым цитоскелетом. Представители семейства FERM (протеин 4.1, эзрин, радиксин и моэзин) соединяют интегральные мембранные протеины непосредственно с актиновым цитоскелетом. Показано, что участки связывания моэзина расположены на большом цитоплазматическом домене  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. Полагают, что моэзин является не только линкером непосредственно между  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой эпителия почек и актиновыми филаментами, но также модифицирует связывание анкирина с этим доменом энзима подобно протеину 4.1, модифицирующему связывание анкирина с цитоплазматической петлей эритроцитарного анионообменника АЕ-1 [60].

Последовательность молекулярных событий при сборке апикального соединительного комплекса исследована на модели клеток MDCK методом кальциевого переключателя ( $\text{Ca}^{2+}$ -switch) [5]. На первой, E-кадгеринзависимой, стадии протеины этого комплекса транслоцируются из цитоплазмы в плазматическую мембрану и периконтное актомиозиновое кольцо с формированием адгезионных контактов. В результате  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый протеин E-кадгерин посредством расположенных на внеклеточном домене N-гликанов обеспечивает межклеточное взаимодействие прилегающих клеток, а благодаря ассоциации цитоплазматического сегмента с катенинами — взаимосвязь с актиновым цитоскелетом [61]. Интегральные протеины плотных контактов окклюдин и клаудин опосредованно через цитоплазматические протеины ZO-1, ZO-2, ZO-3 также соединяются с актином.

На второй стадии формируется непроницаемый межклеточный барьер. Движущей силой служит регулируемая RhoA ГТФ-азами полимеризация актина. Актиновые стресс-фибриллы отходят от периконтного актомиозинового кольца к протеиновым нитям плотных контактов, обеспечивая их сближение в апикально-латеральной плоскости плазматической мембраны и “герметизацию” межклеточных соединений. Именно эта стадия обратимо чувствительна к изменениям  $\text{Na}^+$ -гомеостаза независимо от первопричины, что опосредованно определяет участие  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в формировании плотных контактов поляризованного эпителия. В эксперимен-

тальных условиях ингибирование  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы приводит к повышению  $[\text{Na}^+]_i$ , снижению активности RhoA ГТФ-аз, и, в свою очередь, препятствует образованию стресс-фибрилл и формированию плотных контактов [5]. Остается неясным, что представляет собой  $\text{Na}^+$ -сенсор, расположенный выше RhoA ГТФ-азы в сигнальной цепи? Не исключено, что эти процессы являются вторичными, вызванными  $\text{Na}^+$ -зависимым изменением мембранного потенциала, транспорта метаболитов, цитозольной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , pH, клеточного объема.

В независимых исследованиях выявлена опосредованная роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в контроле структурной организации актинового цитоскелета эпителиоцитов кишечника как первичной мишени в сигнальной цепи действия фикотоксина (биотоксина ядовитых морских водорослей и других организмов) [62]. Рецепция палитоксина (содержится в шестилучевых кораллах зооантарктики)  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой сопровождается деполяризацией плазматической мембраны за счет усиления входа  $\text{Na}^+$  в клетки, что приводит к вторичному входу  $\text{Ca}^{2+}$ , и, в конечном счете, дезорганизации актиновых филаментов [63].

В эпителии способность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы непосредственно участвовать в межклеточном взаимодействии реализуется посредством  $\beta$ -субъединицы энзима. В исследованиях [23] показано, что меченые эпитопными полипептидными метками (Flag и Muc)  $\beta 1$ -субъединицы колокализуются в латеральных мембранах прилегающих клеток MDCK.

В этих процессах важная роль принадлежит N-гликанам  $\beta 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [64]. Нормальное гликозилирование  $\beta 1$ -субъединицы имеет существенное значение для стабилизации энзима в местах адгезионных контактов и обеспечивает межклеточное взаимодействие [65]. Прочность межклеточных контактов эпителиальных клеток в монослое обратно пропорциональна степени разветвления N-гликанов гликопротеинов (в том числе E-кадгерина и  $\beta 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы) и регулируется на уровне адгезионноиндуцируемой экспрессии генов энзимов, катализирующих реакцию разветвления полисахаридов [66].

Полагают, что характер N-гликозилирования  $\beta$ -субъединицы также вносит вклад в особенности внутриклеточного транспорта и специфику поляризованного встраивания в плазматическую мембрану. Так, для эпителиальных клеток с базолатеральной локали-

зацией  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы доминирующей является  $\beta 1$ -изоформа, несущая три молекулы N-гликана, которые обеспечивают взаимодействие  $\beta 1$ - $\beta 1$ -субъединиц энзима в прилегающих клетках, в то время как  $\alpha$ -субъединица контактирует с протеинами цитоскелета. Считают, что уникальный характер гликозилирования  $\beta 2$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы (8 участков) и  $\beta$ -субъединицы  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы желудка (7 участков) содержит информацию, необходимую для апикальной сортировки энзимов [64]. Однако в пигментном эпителии сетчатки, где  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза, как редкое исключение, расположена в апикальном участке плазматической мембраны, в соизмеримых количествах сосуществуют  $\alpha 1\beta 1$ - и  $\alpha 1\beta 2$ -гетеродимеры энзима [67]. Кроме того, показано, что в нормальных условиях сверхэкспрессия  $\beta 2$ -изоформы в клетках MDCK с эндогенным  $\alpha 1\beta 1$ -изоэнзимом  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы недостаточна для передислокации всего гетеродимерного комплекса  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в апикальный участок плазматической мембраны из базолатерального [68]. Только при активации бутиратом экспрессии меченные  $\beta 1$  и  $\beta 2$  мус, но не эндогенные  $\alpha 1\beta 1$ -комплексы, визуализируются также в апикальной мембране клеточной линии MDCK с тетрациклининдуцируемым промотором. Однако  $\beta 2$  мус не ассоциируется с эндогенной  $\alpha 1$ -субъединицей ввиду более высокого сродства, существующего между субъединицами в гетеродимерах  $\alpha 1\beta 1$  и  $\alpha 2\beta 2$ , в сравнении с комплексами  $\alpha 1\beta 2$  [9]. Допускают, что ошибочная локализация при сверхэкспрессии  $\beta$ -субъединиц возможно обусловлена перегрузкой механизмов клеточной сортировки исключительно для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, а не изменением полярности клеток, т.к. не нарушается базолатеральное расположение E-кадгерина [68].

Можно заключить, что формирование полярной структуры эпителия обеспечивается при множественном структурно-функциональном взаимодействии обеих субъединиц  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы с протеинами адгезии и цитоскелета. При этом,  $\beta 1$ -субъединица энзима непосредственно принимает участие в межклеточной адгезии.

***Ошибочная локализация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в плазматической мембране эпителиальных клеток при патологиях***

Функциональные нарушения при ряде патологий, например при аутосомнодоминантном поликистозе почек, характеризуются изменением нормальной полярности распре-

деления  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в плазматической мембране, необходимой для обеспечения векторности физиологических процессов. Это может быть следствием аномальной экспрессии  $\beta 2$ -субъединицы и нарушения эндогенных механизмов сортировки этого энзима [69, 70]. В то же время, в эмбриогенезе и в постнатальный период в почках физиологические механизмы переключения экспрессии с  $\beta 2$ - на  $\beta 1$ -субъединицу сопровождаются изменением апикальной локализации для  $\alpha \beta 2$  на базолатеральную для  $\alpha \beta 1$ -изоэнзима  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы [11].

При таких патологиях как ишемия изменение полярности распределения  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы служит индикатором изменения полярности самого эпителиоцита, и ее рассматривают как один из механизмов нарушения структурной интеграции плотных контактов [5]. При окислительном повреждении барьерной функции плотных контактов в культуре клеток толстой кишки человека *Caco-2*, при остром воспалении кишечника человека, при болезни Крона и язвенном колите  $\alpha$ -субъединица  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы перемещается в апикальную мембрану [71]. Причиной апикального перераспределения может быть разрыв связи с цитоскелетом, что выявлено для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы проксимальных канальцев почек при ишемии [72]. Анализ временных закономерностей показывает, что при сублетальном повреждении клеток почечного эпителия аномальная реполяризация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, скорее всего, обусловлена рециркуляцией энзима, а не изменениями биосинтеза его субъединиц [73]. Объяснение этому получены в последующих исследованиях. Показано, что протеин теплового шока HSP-70 в синергизме с другими индуцируемыми при ишемии стресс-протеинами HSP-25 и HSP-90, участвующими в репарации цитоскелета при постишемическом восстановлении почек [74], восстанавливает также связь протеинов цитоскелета с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой кортекса почек *in vitro* [75, 76]. Репарация закоривания  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы на цитоскелете при взаимодействии с молекулярным шапероном HSP70 рассматривается в качестве фундаментального клеточного механизма поддержания и восстановления полярности эпителия почечных канальцев при энергетической недостаточности [77,78].

Выявлены общие закономерности нарушения формирования плотных контактов или их дезорганизации как следствие уменьшения активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, что сопровождается подавлением активности RhoA ГТФ-аз и снижением уровня стресс-фибрилл. В культуре эпителиальных клеток почек это

проявляется в случае прямого ингибирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы или при обеднении АТФ под действием ингибитора окислительного фосфорилирования антимицина А, а также при ишемии почек [5]. Полагают, что нарушение целостности плотных контактов при обеднении АТФ, по крайней мере частично, определяется функциональными изменениями  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. Функциональная взаимосвязь между  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой и плотными контактами также выявляется в культуре клеток пигментного эпителия сетчатки человека. Обратимое ингибирование  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы приводит к нарушению барьерной функции плотных контактов на фоне обратимого снижения ее содержания в апикальной мембране [79].

Таким образом, нарушение структурно-функциональной интеграции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы и плотных контактов приводит к развитию множественных патологий, сопровождающихся нарушением фенотипа поляризованных эпителиальных клеток.

#### ***Координированная экспрессия протеинов адгезии и $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы***

Преобразование эпителиального фенотипа в мезенхимальный (эпителиально-мезенхимальный переход, ЭМП) происходит в эмбриогенезе и при злокачественной трансформации и коррелирует с метастатическим потенциалом. Сигнальные каскады, индуцируемые при связывании факторов роста, цитокинов и молекул внеклеточного матрикса с рецепторами клеточной поверхности приводят к активации транскрипционных факторов, ведущей к реализации программы ЭМП [80]. В механизме ЭМП главное место отводится утрате полярной морфологии клеток в результате ослабления межклеточной адгезии и нарушения образования плотных контактов между эпителиоцитами, за счет подавления экспрессии E-кадгерина и протеинов плотных контактов, с сопутствующей реорганизацией цитоскелета и возрастанием клеточной подвижности. Регулируемая экспрессия E-кадгерина и катенинов играет важную роль в контроле клеточной подвижности в морфогенезе (эмбриогенезе и при физиологической регенерации), а ее нарушение приводит к формированию инвазивности и локомоторного клеточного фенотипа в онкогенезе. Репрессия транскрипции рассматривается в качестве основного механизма подавления экспрессии E-кадгерина и осуществляется при взаимодействии ряда транскрипционных факторов (Snail и Slug, E12/E47, ZEB-1 and SIP-1), содержащих цинковые пальцы в ДНК-связыва-

вающем домене, с E-боксами промотора гена E-кадгерина [81]. Полагают, что экспрессия E-кадгерина модулируется в зависимости от содержания комбинаций транскрипционных факторов, обладающих разным сродством к участкам связывания на ДНК, на конкретных этапах эмбрионального развития или опухолевого процесса [81].

Модуляция межклеточной адгезии, опосредуемой E-кадгерином, осуществляется также путем посттрансляционной модификации кадгерин-катенинового комплекса за счет фосфорилирования  $\beta$ -катенина тирозин-киназой Src [82], индуцирующего ЭМП в клетках MDCK [83]. Src-зависимое фосфорилирование приводит к ослаблению связи с E-кадгерином и диссоциации  $\beta$ -катенина. Сигнальная функция свободного  $\beta$ -катенина в комплексе с другими протеинами в качестве транскрипционного фактора заключается в индукции экспрессии генов протеинов (в частности циклина D1), усиливающих пролиферацию [82].

Другими мишенями негативной регуляции экспрессии являются протеины плотных контактов: окклюдин и клаудины. Промоторы их генов также содержат множественные E-боксы, с которыми связываются транскрипционные факторы Snail и Slug (семейство Snail). ЭМП, индуцируемый при сверхэкспрессии гена *Snail* в культурах клеток MDCK и эпителия мыши сопровождается разборкой адгезионных и плотных контактов за счет одновременной репрессии генов, кодирующих E-кадгерин, окклюдин и клаудины соответственно [84, 85]. Однако другие исследования свидетельствуют о проявлении плейотропного эффекта Snail в клетках MDCK, осуществляющего прямую транскрипционную репрессию генов E-кадгерина и окклюдина и посттранскрипционную негативную регуляцию синтеза протеина клаудина-1 на стадии инициации трансляции [86].

Специальный интерес в контексте данного обзора представляет существование синергизма между E-кадгерином и  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой в формировании плотных контактов эпителиальных клеток. Он обусловлен не только механизмами, обеспечивающими колокализацию этих протеинов в плазматической мембране, но и их координированную экспрессию.

Трансформированные клетки MSV-MDCK служат моделью низкодифференцированной карциномы, характеризуются высокой клеточной подвижностью, низким уровнем экспрессии E-кадгерина и  $\beta 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, высоким — Snail [87, 88].

Только обоюдная эктопическая экспрессия E-кадгерина и  $\text{Na}, \text{K}-\beta 1$  (повышает эффективность трансляции  $\text{Na}, \text{K}-\alpha$  [24]) восстанавливает способность клеток формировать функциональные плотные контакты, т.е. индуцирует полярную морфологию эпителия [5]. Подавление экспрессии гена *Snail* методом РНК-интерференции повышает экспрессию  $\text{Na}, \text{K}-\beta 1$ . В свою очередь, эктопическая экспрессия *Snail* в дифференцированных эпителиальных клетках генерирует ЭМП, подавляет экспрессию генов E-кадгерина и  $\beta 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. Методом измерения электрофоретической подвижности показано, что для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы этот механизм также реализуется через взаимодействие Snail с E-боксом промотора гена  $\text{Na}, \text{K}-\beta 1$ . Аналогичные закономерности установлены, кроме того, для ряда клеточных линий низкодифференцированной карциномы, в т.ч. толстого кишечника, поджелудочной и молочной желез, где экспрессия  $\text{Na}, \text{K}-\beta 1$  находится под контролем Snail [88].

Трансфекция геном коннексина 26 (каналообразующий протеин щелевых контактов) эпителиальных клеток дыхательных путей человека линии Calu-3 препятствует нарушению экспрессии протеинов плотных контактов и их барьерной функции, вызванной ингибированием  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы убаином [89].

Следовательно, в механизмах эпителиальной дифференцировки важная роль принадлежит сопряженной экспрессии и функциональной интеграции протеинов различных межклеточных соединений и  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, нормальный уровень экспрессии которых необходим для поддержания фенотипа высокодифференцированных эпителиальных клеток.

### 3. Роль $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в сигнальной трансдукции

В настоящее время очевидно, что ряд важных клеточных процессов (а именно: экспрессия ряда генов, клеточный рост, пролиферация, апоптоз, клеточная подвижность, кровяное давление, сердечное сокращение) модулируются при участии сигнальных комплексов, образуемых  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой. В таких временных межмолекулярных системах  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза выступает в качестве сигнального трансдуктора, обеспечивая рецепцию эндогенного убаина, пространственную организацию и активацию многочисленных протеиновых партнеров в составе селективных областей плазматической мембраны — сигнасом [3, 4, 29]. Эндогенные дигиталисподобные факторы — специфические лиганды  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, относятся к



группе стероидных гормонов гипоталамуса и коры надпочечников [3,4].

В клетках эпителия почек установлено существование сигнального микродомена в составе  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы и IP3R (рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата), регулирующего убаин-индуцируемый сигнальный путь, опосредуемый низкочастотными осцилляциями  $\text{Ca}^{2+}$ , которые активируют плейотропный  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый транскрипционный фактор NF- $\kappa\text{B}$  [90]. Последний регулирует экспрессию генов, модулирующих пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [91]. В первичной культуре эпителиоцитов проксимальных канальцев почки крысы (клетки RPT) при действии убаина в неингибирующих  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азу концентратиях такой механизм обеспечивает стимулирование пролиферации и защиту от апоптоза, вызванного депривацией сыворотки в культуральной среде [92]. Полагают, что стабилизация энзима в E2-конформации при рецепции убаина  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой обеспечивает высвобождение N-конца  $\alpha$ -субъединицы от взаимодействия с первой цитоплазматической петлей, делая его доступным для взаимодействия с IP3R [90]. Консервативный мотив в цитоплазматическом N-концевом участке всех трех изоформ  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы (LKK-лейцин, лизин, лизин) участвует в связывании N-концевой части (1-604 аминокислотных остатка) молекулы IP3R [93]. С помощью индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET) продемонстрировано, что пространственное сближение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы и IP3R в ответ на действие убаина возможно лишь с участием интактного цитоскелета [90]. Методом РНК-интерференции в клетках почек обезьяны линии COS-7 установлено, что стабилизация взаимодействий и осуществление сигнальной функции комплекса  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы/IP3R обеспечивается анкирином В, который также связывается с N-концевыми сегментами этих молекул [94].

В клеточной линии почек свиньи LLC-PK1  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза через сайты на цитоплазматических доменах 2 и 3 иммобилизует нерепепторную тирозинкиназу Src в неактивной форме. Связывание убаина запускает сигнальные каскады, индуцируя высвобождение и активацию Src, фосфорилирование эффекторов, в частности серин-треонин киназы фокальной адгезии (FAK) по TYR<sup>925</sup>, и в конечном счете активацию MAP-киназы ERK1/2 [95, 96]. Вовлечение FAK-киназы ставит вопрос об участии сигнального комплекса, формируемого  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой, в регуляции процессов пролиферации, клеточной подвижности и миграции.

Используя клоны с заглушенной экспрессией  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы siРНК, в плазматической мембране клеток LLC-PK1 идентифицирован дополнительный неканонический пул  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, количественно соизмеримый с каноническим пулом  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса, но выполняющий сигнальную, поддерживающую и/или резервную, а не ион-транспортную функцию. Наличие такого пула энзима установлено не только в эпителиоцитах почек, но и в фибробластах. Варьирование размеров такого пула в разных культурах клеток может определять характер эффектов убаина [97]. Важная роль в организации значительной части нетранспортного пула энзима в клетках LLC-PK1 принадлежит кавеолам, где  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза также ассоциирована с кавеолином-1, взаимодействие между которыми регулируется убаином за счет фосфорилирования кавеолина-1 по тирозиновому остатку. Нарушение структуры кавеол при удалении холестерина или выключении экспрессии кавеолина-1 блокирует убаинзависимую сигнальную трансдукцию и переводит нетранспортный пул в ион-транспортный [97, 98].

Кавеолярная форма  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы наряду с IP3R2 (изоформа рецептора IP3) вовлекает в единый сигнальный комплекс также PLC- $\gamma 1$  (изоформа фосфолипазы C). Во взаимодействии с эффекторами участвуют разные домены  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы: большая цитоплазматическая петля и N-концевой пептид соответственно. Убаин индуцирует как Src-зависимое фосфорилирование по Tyr<sup>783</sup> и активацию PLC- $\gamma 1$  с последующим гидролизом PIP2 (фосфатидил-инозитол-4,5-бифосфата), так и фосфорилирование тирозинового остатка IP3R2. Полагают, что  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза трансформирует внеклеточный сигнал от убаина (или эндогенного маринобуфагенина) в кальциевые осцилляции через два дискретных IP3-зависимых сигнальных пути: через PLC- $\gamma 1$ -зависимую продукцию IP3 и прямую сенсибилизацию его рецепторов [99].

В работе [100] подробно проанализирован молекулярный механизм формирования сигнального поддерживающего комплекса  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы с протеинами фосфатидилинозитол-3 (PI3) киназного каскада, обеспечивающего подавление подвижности клеток MSV-MDCK. Триггером является экспрессия экзогенной Na,K- $\beta 1$  (мутанты с делецией цитоплазматического конца не эффективны) в высокоподвижные MSV-MDCK клетки с исходно низким уровнем эндогенной Na,K- $\beta 1$ , что индуцирует возрастание уровня Na,K- $\alpha 1$

как результат повышения эффективности ее трансляции в эндоплазматическом ретикулуме [24]. Это приводит к увеличению специфического связывания Na,K- $\alpha 1$  через пролин-богатый мотив в N-концевом участке с SH3-доменом p85 (регуляторной субъединицей PI3-киназы) [101], фосфорилированию p85 по тирозину (механизм не выяснен), рекрутизации в плазматическую мембрану и активации PI3-киназы, опосредуемой протеинкиназой C [100, 102]. Гиперпродукция фосфоинозитол-3,4,5-фосфата (PIP3) вызывает: а) связывание аннексина II (представитель семейства Ca<sup>2+</sup>- и фосфолипидсвязывающих протеинов, связывает анионные фосфолипиды, например PIP3 [103]), с цитоплазматическим N-концом Na,K- $\beta 1$  и б) активацию Rac1 при связывании PIP3 с плекстрин-гомологичными (PH) доменами фактора обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF). Аннексин II обеспечивает вовлечение активированной Rac1 в этот комплекс [104]. В плазматической мембране собирается сигнальный поддерживающий комплекс Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы, обеспечивающий зависимость от PI3-киназы локальную активацию Rac1 и передачу сигнала вдоль сигнальной цепи.

Подавление подвижности клеток MSV-MDCK с экзогенной Na,K- $\beta 1$  опосредуется Rac1-зависимой реорганизацией актинового цитоскелета (независимо от RhoA), формированием ламеллиподий, снижением количества стресс-фибрилл, увеличением распластывания клеток и прикреплением к субстрату.

В клеточной линии высокодифференцированной панкреатической карциномы человека HPAF-II (клетки имеют поляризованный фенотип, плотные и адгезионные контакты, высокий уровень экспрессии E-кадгерина и Na,K- $\beta 1$  и отсутствие Snail [105]) в плотных контактах конфлюэнтных монослоев с помощью антител, меченных коллоидным золотом впервые выявлена колокализация Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы с окклюдина [106]. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аза посредством N-конца  $\beta 1$ -субъединицы ассоциирована с PP2A (серин-треонин протеинфосфатазой 2A). Ингибирование Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы убаином сопровождается снижением активности PP2A, гиперфосфорилированием окклюдина (без участия фосфолипазы C (PLC) и PI3-киназы), реорганизацией плотных контактов, снижением трансэпителиального электрического сопротивления, возрастанием межклеточной проницаемости. Гиперфосфорилирование окклюдина при ингибировании Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы продемонстрировано также на других культурах эпителиоцитов (Caco-2, RT-4). Однако в

клетках MDCK, наоборот, происходит дефосфорилирование окклюдина. Сигнальный комплекс Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы, PP2A и окклюдина организован в виде микродомена плазматической мембраны, что обеспечивает тонкую настройку проницаемости плотных контактов. Сделан вывод о консервативной роли Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в регуляции структуры и функции плотных контактов, однако механизм может отличаться в зависимости от типа эпителиальных клеток млекопитающих [107].

Несомненно, что новая фундаментальная роль Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы заключается в ее способности формировать временные функциональные сигнальные комплексы, обеспечивающие рецепцию внеклеточного сигнала и его трансдукцию внутрь клетки, активацию ряда убаинзависимых сигнальных путей, участвующих в тонкой регуляции эпителиального морфогенеза. Закономерно, что этот фермент является мишенью при нарушении сбалансированных механизмов самовозобновления в процессах злокачественного роста.

#### 4. Роль Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в патогенезе злокачественных новообразований

Учитывая вышеизложенное, можно утверждать, что Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аза тесно вовлечена в формирование и поддержание поляризованной структуры эпителиальных клеток. Многочисленные исследования последних лет направлены на выяснение особенностей функционирования Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы при нарушении эпителиального морфогенеза и ее роли в обеспечении регуляторных потребностей функционирования сигнальных путей в условиях усиленной клеточной пролиферативной активности и устойчивой жизнеспособности при злокачественном опухолевом росте [6]. Аберрантная дифференцировка и развитие ЭМП — составляющие патогенеза злокачественных новообразований. При повышении степени анаплазии (дифференцировки) усиливается злокачественность. Основа инвазивности и метастатического потенциала — нарушение нормальных морфогенетических реакций эпителиальных клеток [108–110].

Существование взаимосвязи между функциональными особенностями Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азного комплекса в плазматической мембране, степенью дифференцировки и злокачественности карцином вполне закономерно (таблица).

Молекулярные механизмы в первую очередь, базируются на существовании синергизма в формировании поляризованного эпителиального фенотипа между E-кадгерин и  $\beta 1$ -субъ-

*Потенциальная взаимосвязь между функциональным состоянием Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы, морфофункциональным состоянием клеток колоректальной аденокарциномы и степенью их злокачественности*

Направленность изменений	Степень дедифференцировки аденокарциномы	Ссылки
Снижение степени дифференцировки	G1→G4	Гистопатологическая классификация (ВОЗ) [108]
Усиление злокачественности (инвазивности и метастазирования)	G1→G4	[108–110]
Потеря эпителиальной полярности, плотных контактов; снижение межклеточной адгезии, увеличение клеточной подвижности, формирование локомоторного фенотипа, потеря контактного торможения	G1→G4	[110]
Снижение экспрессии E-кадгерина, коррелирующее со степенью дедифференцировки опухоли	G1→G4	[111]
Негативная регуляция коэкспрессии E-кадгерина и β1-субъединицы Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -АТФ-азы транскрипционным супрессором Snail	G3,4	[88]
Негативная регуляция экспрессии α1-изоформы и позитивная регуляция экспрессии α3-изоформы Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -АТФ-азы	G1,2	[10]
Снижение активности Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -АТФ-азы	УНТ→G1,2 → G3,4	[115, 116]

Примечания: аденокарцинома недифференцированная (G4), низкодифференцированная (G3), умеренно дифференцированная (G2), высокодифференцированная (G1); условно нормальная ткань (УНТ) – макроскопически неизменная слизистая оболочка, прилегающая к опухоли

единицей Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы, координированной регуляции их экспрессии [88]. В свою очередь, этим протеинам принадлежит важная роль в обеспечении межклеточной адгезии, в контроле подвижности и миграции клеток [23, 111, 112]. Сниженная экспрессия Na,K-β1 наблюдается в низкодифференцированных карциномах с высокой степенью злокачественности [88]. Полагают, что Na,K-β1 обладает функцией опухолевого супрессора [112]. Кроме того, участие E-кадгерина в системе координированных сигнальных путей, опосредуемых протоонкогенами (в частности свободным β-катенином) и опухолевыми супрессорами вносит вклад в контроль процессов пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов [110]. Кроме того установлено, что ген α-субъединицы Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы относится к группе генов, для которых выявлена избирательная негативная регуляция экспрессии при раке толстой кишки и желудка [113,114]. Нами показано, что при колоректальном раке человека активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в мембранных препаратах по сравнению с нормальной слизистой снижается

в соответствии со степенью анаплазии аденокарцином [115,116]. Полагают, что в клетках дифференцированной аденокарциномы толстой кишки человека важное значение принадлежит механизму переключения биосинтеза изоформ каталитической субъединицы Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы с α1 к α3 [10]. Следовательно, закономерности изменений Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азной активности могут указывать на особенности функциональной регуляции энзима в соответствии с морфогенетическими реакциями злокачественной клетки. Молекулярные механизмы и последствия такой взаимосвязи находят объяснение в исследованиях последних лет (рис. 2).

Следует отметить, что существует сложная взаимосвязь между процессами трансформации, дифференцировки и прогрессии опухолей. Злокачественная трансформация блокирует дальнейшее дозревание стволовых и полустволовых клеток. В то же время, для карцином характерно снижение уровня дифференцировки при прогрессии опухоли, как необходимое условие инвазивности и метаста-

## Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аза

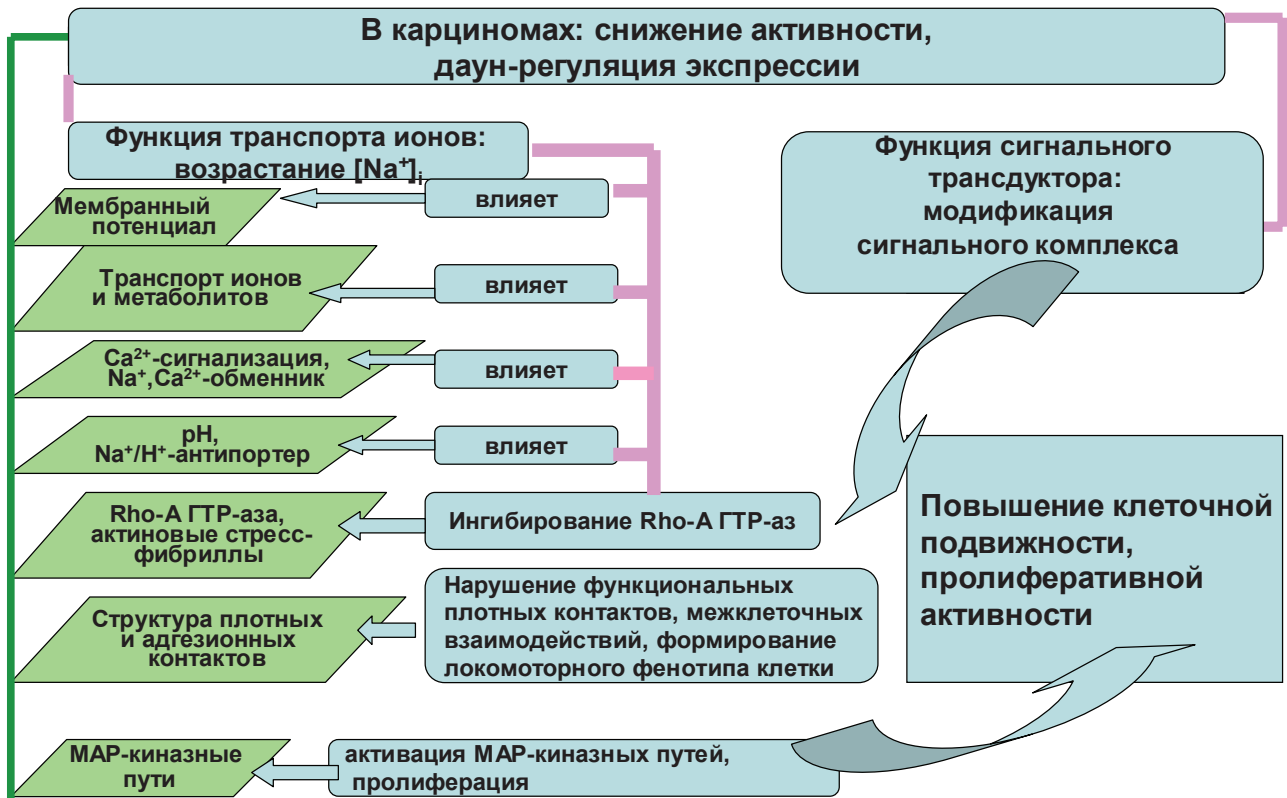


Рис. 2. Потенциальные мишени функциональных нарушений Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в карциномах [5,6,29,31,88,100,106]

зирования [109, 110]. Закономерно, что функциональная организация Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азного комплекса в плазматической мембране клеток аденокарцином может определяться уровнем дифференцировки опухоли в соответствии с конкретными особенностями морфологии злокачественных клеток и потребностями в регуляции натрий-калиевого гомеостаза при злокачественном росте.

В настоящее время разграничивают три независимые функции Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы: ионотранспортирующую, структурную (взаимодействие с цитоскелетом, межклеточная адгезия β-субъединиц) и сигнальную. Их специфика в эпителиальных клетках проявляется при участии механизмов полярной сортировки энзима и формирования фенотипа поляризованных клеток.

Учитывая вышеприведенные данные, можно сделать заключение, что Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аза тесно вовлечена в формирование и поддержание поляризованной структуры эпителиальных клеток. Выявлена существенная роль

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в обеспечении эпителиальной полярности, межклеточной адгезии, структурно-функциональной регуляции плотных контактов, динамики актинового цитоскелета, контроля клеточной подвижности как в синергизме с молекулами адгезии, так и в качестве сигнальной молекулы. Прослеживается взаимосвязь между патофизиологическим и функциональным состоянием клетки и полярностью распределения Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в плазматической мембране. Функциональные изменения и нарушение локализации Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в плазматической мембране эпителиальных клеток наблюдаются при таких заболеваниях, как ишемическая болезнь и аутосомно-доминантный поликистоз почек, воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, злокачественные новообразования [3, 38, 56, 65–68, 104]. Следовательно, анализ роли Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в физиологическом ответе эпителиоцитов при патологических и физиологических воздействиях следует рассматривать в контексте структурно-функцио-

нальних взаємодій з протеїнами-партнерами в єдиному ансамблі со структурними елементами поляризованої клітки или в сигнальній цепі.

### ФУНКЦІОНУВАННЯ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-ази В ПОЛЯРИЗОВАНИХ КЛІТИНАХ

О. А. Капля<sup>1</sup>, В. С. Морозова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Луганський національний університет  
імені Тараса Шевченка, Україна

В огляді наведено новітні уявлення про фундаментальну роль Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-ази в регуляції морфогенезу поляризованих клітин епітелію та участі ензиму в процесах сигнальної трансдукції, формуванні міжмолекулярних сигнальних комплексів. З урахуванням сучасних методичних підходів докладно розглянуті питання: специфіки сортування протеїнів в поляризованих клітинах, залучення ензиму в регуляцію міжклітинних взаємодій в епітелії, організації молекул Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-ази, протеїнів адгезії та цитоскелету в єдиному структурно-функціональному комплексі, їх координованої експресії. Проаналізовано механізми взаємодії ензиму з протеїнами-партнерами, роль конкретних функціональних доменів, мотивів та сайтів зв'язування. На підставі даних літератури та власних досліджень дійшли висновку, що Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аза залучена в розвиток патологій, що відбуваються з порушеннями фенотипу поляризованих епітеліальних клітин, зокрема за процесів злоякісного росту.

Ключові слова: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аза, епітелій, міжклітинні взаємодії, протеїни-партнери, сигнальна трансдукція, злоякісний ріст.

### Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase FUNCTIONING IN POLARIZED CELLS

A. A. Kaplya<sup>1</sup>, V. S. Morozova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Lugansk Taras Shevchenko National University, Ukraine

#### Summary

The novel views on fundamental role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in regulation of the polarized morphology of the epithelial cells, enzyme involvement in signal transduction, assembly of intermo-

lecular signaling complexes have been reviewed. The modern state of researches are considered in detail, including: sorting specificity in polarized cells, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase involvement in epithelial cell interactions, enzyme arrangement in combined structural and functional ensemble with adhesion and cytoskeleton proteins, their coordinated expression. The mechanisms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase association with its molecular partners and the role of specific domains, motives and binding sites are analysed. The available data, including own researches indicate the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase involvement in certain pathologies that develop with aberration of polarized epithelial phenotype, malignant growth in particular.

Key words: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, epithelium, intercellular interactions, protein partners, signal transduction, malignant growth.

1. Lingrel J. B., Kuntzweiler T. // J. Biol. Chem. — 1994. — **269**, N 31. — P. 19659–19662.
2. Болдырев А. А. // Сорос. образов. журн. — 1998. — № 4. — С. 2–9.
3. Schoner W., Scheiner-Bobis G. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2007. — **293**, N 2. — P. C509–C536.
4. Bagrov A. Y., Shapiro J. I., Fedorova O. V. // Pharmacol. Rev. — 2009. — **61**, N 1. — P. 9–38.
5. Rajasekaran A. K., Rajasekaran S. A. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. — 2003. — **285**, N 3. — P. F388–F396.
6. Капля А. А., Хижняк С. В., Кудрявцева А. Г. и др. // Укр. біохім. журн. — 2006. — **78**, № 1. — С. 29–42.
7. Ueno S., Takeda K., Noguchi S., Kawamura M. // Biosci. Rep. — 1997. — **17**, N 2. — P. 173–188.
8. Barwe S. P., Kim S., Rajasekaran S. A. et al. // J. Mol. Biol. — 2007. — **365**, N 3. — P. 706–714.
9. Blanco G., Mercer R. W. // Am. J. Physiol. — 1998. — **275**, N 5, Pt 2. — P. F633–F650.
10. Sakai H., Suzuki T., Maeda M. et al. // FEBS Lett. — 2004. — **563**, N 1–3. — P. 151–154.
11. Burrow C. R., Devuyst O., Li X. et al. // Am. J. Physiol. — 1999. — **277**, N 3, Pt 2. — P. F391–F403.
12. Wetzel R. K., Sweadner K. J. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2001. — **42**, N 3. — P. 763–769.
13. Crambert G., Hasler U., Beggah A. T. et al. // J. Biol. Chem. — 2000. — **275**, N 3. — P. 1976–1986.
14. Blanco G. // Semin. Nephrol. — 2005. — **25**, N5. — P. 292–303.

15. Капля А. А. // Укр. биохим. журн. – 1998. – **70**, № 3. – С. 3–11.
16. Капля А. А., Мишук Д. О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 5. – С. 17–22.
17. Wu B. J., Else P. L., Storlien L. H., Hulbert A. J. // J. Exp. Biol. – 2001. – **204**, Pt. 24. – P. 4271–4280.
18. Капля А. А. Структурная организация и функциональная роль изоферментов Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы. – Киев: Изд-во “Киевский университет”, 1998. – 162 с.
19. Petrushanko I., Bogdanov N., Bulygina E. et al. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – **290**, N 4. – P. R916–R925.
20. Petrushanko I. Y., Bogdanov N. B., Lapina N. et al. // Gen. Physiol. – 2007. – **130**, N 4. – P. 389–398.
21. Dunbar L. A., Caplan M. J. // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 32. – P. 29617–29620.
22. Лопина О. Д. // Биохимия. – 2001. – **66**, № 10. – С. 1389–1400.
23. Clifford R. J., Kaplan J. H. // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2008. – **295**, N 5. – P. F1314–F1323.
24. Rajasekaran S. A., Gopal J., Willis D. et al. // Mol. Biol. Cell. – **2004**, N 7. – P. 3224–3232.
25. Arystarkhova E., Sweadner K. J. // J. Bioenerg. Biomembr. – 2005. – **37**, N 6. – P. 381–386.
26. Geering K. // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2006. – **290**, N 2. – P. F241–F250.
27. Lindzen M., Gottschalk K. E., Füzesi M. et al. // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**, N 9. – P. 5947–5955.
28. Pagel P., Zatti A., Kimura T. et al. // Ann. NY Acad. Sci. – 2003. – **986**. – P. 360–368.
29. Xie Z., Cai T. // Mol. Interv. – 2003. – **3**, N 3. – P. 157–168.
30. Rajasekaran S. A., Barwe S. P., Rajasekaran A. K. // Semin. Nephrol. – 2005. – **25**, N 5. – P. 328–334.
31. Kaplan J. H. // Sci. STKE. – 2005. – **2005**, N 289. – P. pe31.
32. Nelson W. J., Hammerton R. W., Wang A. Z., Shore E. M. // Semin. Cell Biol. – 1990. – **1**, N 5. – P. 359–371.
33. Caplan M. J. // Am. J. Physiol. – 1997. – **272**, N 6, Pt 1. – P. G1304–G1313.
34. Bok D. // J. Cell Sci. Suppl. – 1993. – **17**. – P. 189–195.
35. Marrs J. A., Napolitano E. W., Murphy-Erdosh C. et al. // J. Cell Biol. 1993. – **123**, N 1. – P. 149–164.
36. Лопина О. Д., Рубцов А. М. // Биохимия. – 1997. – **62**, №10. – С. 1057–1063.
37. Кузьменко Л. И., Богданова О. В., Остапченко Л. И. // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 4. – С. 80–88.
38. Gottardi C. J., Caplan M. J. // J. Cell Biol. – 1993. – **121**, N 2. – P. 283–293.
39. Muth T. R., Gottardi C. J., Roush D. L., Caplan M. J. // Am. J. Physiol. – 1998. – **274**, N 3, Pt. 1. – P. C688–C696.
40. Dunbar L. A., Courtois-Coutry N., Roush D. L. et al. // Acta Physiol. Scand. Suppl. – 1998. – **643**. – P. 289–295.
41. Dunbar L. A., Aronson P., Caplan M. J. // J. Cell Biol. – 2000. – **148**, N 4. – P. 769–778.
42. Roush D. L., Gottardi C. J., Naim H. Y. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, N 41. – P. 26862–26869.
43. Mays R. W., Siemers K. A., Fritz B. A. et al. // J. Cell Biol. – 1995. – **130**, N 5. – P. 1105–1115.
44. Bennett V., Baines A. J. // Physiol. Rev. – 2001. – **81**, N 3. – P. 1353–1392.
45. Morrow J. S., Cianci C. D., Ardito T. et al. // J. Cell Biol. – 1989. – **108**, N 2. – P. 455–465.
46. Nelson W. J., Shore E. M., Wang A. Z., Hammerton R. W. // Ibid. – 1990. – **110**, N 2. – P. 349–357.
47. Vagin O., Sachs G., Tokhtaeva E. // J. Bioenerg. Biomembr. – 2007. – **39**, N 5–6. – P. 367–372.
48. Nelson W. J., Hammerton R. W., McNeill H. // Soc. Gen. Physiol. Ser. – 1991. – **46**. – P. 77–87.
49. Gundersen D., Orłowski J., Rodriguez-Boulan E. // J. Cell Biol. – 1991. – **112**, N 5. – P. 863–872.
50. Nelson W. J., Veshnock P. J. // Nature. – 1987. – **328**, N 6130. – P. 533–536.
51. Devarajan P., Scaramuzzino D. A., Morrow J. S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – **91**, N 8. – P. 2965–2969.
52. Jordan C., Püschel B., Koob R., Drenckhahn D. // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, N 50. – P. 29971–29975.
53. Zhang Z., Devarajan P., Dorfman A. L., Morrow J. S. // Ibid. – 1998. – **273**, N 30. – P. 18681–18684.
54. Liu X., Spicarová Z., Rydholm S et al. // Ibid. – 2008. – **283**, N 17. – P. 11461–1148.
55. Stabach P. R., Devarajan P., Stankewich M. C. et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – **295**, N 5. – P. C1202–C1214.
56. Ferrandi M., Salardi S., Tripodi G. et al. // Am. J. Physiol. – 1999. – **277**, N 4, Pt 2. – P. H1338–H1349.
57. Manunta P., Barlassina C., Bianchi G. // FEBS Lett. – 1998. – **430**, N 1–2. – P. 41–44.
58. Torielli L., Tivodar S., Montella R. C. et al. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2008. – **295**, N 2. – P. F478–F487.

59. Efendiev R., Krmar R. T., Ogimoto G. et al. // *Circ Res.* – 2004. – **95**, N 11. – P. 1100–1108.
60. Kraemer D. M., Strizek B., Meyer H. E. et al. // *Eur. J. Cell Biol.* – 2003. – **82**, N 2. – P. 87–92.
61. Halbleib J. M., Nelson W. J. // *Genes Dev.* – 2006. – **20**, N 23. – P. 3199–3214.
62. Ares I. R., Louzao M. C., Vieytes M. R. et al. // *J. Exp. Biol.* – 2005. – **208**, Pt 22. – P. 4345–4354.
63. Louzao M. C., Ares I. R., Cagide E. // *FEBS J.* – 2008. – **275**, N 24. – P. 6067–6074.
64. Vagin O., Turdikulova S., Tokhtaeva E. // *Cell Biochem. Biophys.* – 2007. – **47**, N 3. – P. 376–391.
65. Vagin O., Tokhtaeva E., Sachs G. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 51. – P. 39573–39587.
66. Vagin O., Tokhtaeva E., Yakubov I. et al. // *Ibid.* – 2008. – **283**, N 4. – P. 2192–2202.
67. Ruiz A., Bhat S. P., Bok D. // *Gene.* – 1996. – **176**, N 1–2. – P. 237–242.
68. Laughery M. D., Clifford R. J., Chi Y., Kaplan J. H. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2007. – **292**, N 6. – P. F1718–F1725.
69. Wilson P. D., Sherwood A. C., Palla K. et al. // *Am. J. Physiol.* – 1991. – **260**, N 3, Pt 2. – P. F420–F430.
70. Wilson P. D., Devuyst O., Li X. et al. // *Am. J. Pathol.* – 2000. – **156**, N 1. – P. 253–268.
71. Musch M. W., Walsh-Reitz M. M., Chang E. B. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2006. – **290**, N 2. – P. G222–G231.
72. Molitoris B. A., Dahl R., Geerdes A. // *Am. J. Physiol.* – 1992. – **263**, N 3, Pt 2. – P. F488–F495.
73. Van Why S. K., Mann A. S., Ardito T. et al. // *Am. J. Physiol.* 1994. – **267**, N 1, Pt. 2. – P. F75–F85.
74. Aufrecht C. // *Pediatr. Nephrol.* – 2005. – **20**, N 6. – P. 707–713.
75. Bidmon B., Endemann M., Müller T. et al. // *Kidney Int.* – 2000. – **58**, N 6. – P. 2400–2407.
76. Bidmon B., Endemann M., Müller T. et al. // *Ibid.* – 2002. – **62**, N 5. – P. 1620–1627.
77. Riordan M., Sreedharan R., Wang S. et al. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2005. – **288**, N 6. – P. F1236–F1242.
78. Ruete M. C., Carrizo L. C., Vallés P. G. // *Cell Stress Chaperones.* – 2008. – **13**, N 2. – P. 157–167.
79. Rajasekaran S. A., Hu J., Gopal J. et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2003. – **284**, N 6. – P. C1497–C1507.
80. Guarino M. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – **39**, N 12. – P. 2153–2160.
81. Bolys V., Peinado H., Pérez-Moreno M. A. et al. // *J. Cell Sci.* – 2003. – **116**, Pt 3. – P. 499–511.
82. Inge L. J., Rajasekaran S. A., Wolle D. et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – **7**, N 6. – P. 1386–1397.
83. Birchmeier C., Birchmeier W., Brand-Saberi B. // *Acta Anat. (Basel).* – 1996. – **156**, N 3. – P. 217–226.
84. Ikenouchi J., Matsuda M., Furuse M., Tsukita S. // *J. Cell Sci.* – 2003. – **116**, Pt. 10. – P. 1959–1967.
85. Martínez-Estrada O. M., Cullerés A., Soriano F. X. et al. // *Biochem J.* – 2006. – **394**, Pt 2. – P. 449–457.
86. Ohkubo T., Ozawa M. // *J. Cell Sci.* – 2004. – **117**, Pt 9. – P. 1675–1685.
87. Rajasekaran S. A., Palmer L. G., Quan K. et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – **12**, N 2. – P. 279–295.
88. Espineda C. E., Chang J. H., Twiss J. et al. // *Ibid.* – 2004. – **15**, N 3. – P. 1364–1373.
89. Go M., Kojima T., Takano K. et al. // *Exp. Cell Res.* – 2006. – **312**, N 19. – P. 3847–3856.
90. Miyakawa-Naito A., Uhlén P., Lal M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 50. – P. 50355–50361.
91. Häcker H, Karin M. // *Sci STKE.* – 2006. – **2006**, N 357. – P. re13.
92. Li J., Zelenin S., Aperia A., Aizman O. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – **17**, N 7. – P. 1848–1857.
93. Zhang S., Malmersjö S., Li J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 31. – P. 21954–21962.
94. Liu X., Spicarová Z., Rydholm S. et al. // *Ibid.* – 2008. – **283**, N 17. – P. 11461–11468.
95. Tian J., Cai T., Yuan Z. et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – **17**, N 1. – P. 317–326.
96. Liang M., Cai T., Tian J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 28. – P. 19709–19719.
97. Liang M., Tian J, Liu L. et al. // *Ibid.* – 2007. – **282**, N 14. – P. 10585–10593.
98. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // *Ibid.* – 2004. – **279**, N 17. – P. 17250–17259.
99. Yuan Z., Cai T., Tian J. et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – **16**, N 9. – P. 4034–4045.
100. Barwe S. P., Anilkumar G., Moon S. Y. et al. // *Ibid.* – N 3. – P. 1082–1094.
101. Yudowski G. A., Efendiev R., Pedemonte C. H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2000. – **97**, N 12. – P. 6556–6561.
102. Barwe S. P., Rajasekaran S. A., Rajasekaran A. K. // *Cell. Mol. Biol.* – 2006. – **52**, N 8. – P. 41–47.
103. Waisman D. M. // *Mol. Cell. Biochem.* – 1995. – **149–150**. – P. 301–322.

104. Hansen M. D., Ehrlich J. S., Nelson W. J. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 47. – P. 45371–45376.
105. Rajasekaran S. A., Gopal J., Espineda C. et al. // *Pancreas.* – 2004. – **29**, N 3. – P. e77–83.
106. Rajasekaran S. F., Barwe S. P., Gopal J. et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – **292**, N 1. – P. G124–G133.
107. Rajasekaran S. A., Rajasekaran A. K. // *Front. Biosci.* – 2009. – **14**. – P. 2130–2148.
108. *TNM классификация злокачественных опухолей. 5-е издание / Перевод и редакция проф. Н. Н. Блинова.* – СПб, 1990. – 190 с.
109. Абелев Г. И. // *Биохимия.* – 2000. – **65**, № 1. – С. 127–138.
110. Копнин Б. П. // Там же. – С. 5–33.
111. Karatzas G., Karayiannakis A. J., Syrigos K. N. et al. // *Hepatogastroenterology.* – 1999. – **46**, N 25. – P. 232–235.
112. Inge L. J., Rajasekaran S. A., Yoshimoto K. et al. // *Histol. Histopathol.* – 2008. – **23**, N 4. – P. 459–467.
113. Cao J., Cai X., Zheng L. et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 1997. – **123**, N 8. – P. 447–451.
114. Jung M. H., Kim S. C., Jeon G. A. et al. // *Genomics.* – 2000. – **69**, N 3. – P. 281–286.
115. Капля А. А., Кудрявцева А. Г., Горчев В. Ф. и др. // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 2. – С. 142–148.
116. Капля А. А., Кудрявцева А. Г., Хижняк С. В. и др. // Там само. – 2007. – **79**, № 4. – С. 90–96.

Получено 23.09.2009