

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА У ФИБРОБЛАСТОВ НОРМАЛЬНОЙ, РУБЦОВОЙ И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА, РАСПЛАСТАННЫХ НА БЕЛКАХ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

© Н. М. Юдинцева,¹ М. И. Блинова, Г. П. Пинаев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: yudintseva@mail15.com*

Проведен анализ организации цитоскелета у фибробластов, полученных из нормальной, рубцовой и эмбриональной кожи человека, распластанных на основных мажорных белках внеклеточного матрикса (ВКМ): коллагене I и IV типов, ламинине 2/4 и фибронектине. Результаты конфокальной флуоресцентной микроскопии показали, что фибробласты разного происхождения имеют существенные различия в организации актиновых структур, а также в форме и распределении фокальных контактов, выявляемых антителами к винкулину. Наряду с этим оказалось, что у разных фибробластов, распластанных на одном и том же белке ВКМ, при сохранении общего типа пространственной организации цитоскелета выявляются определенные модификации в системе актиновых структур и фокальных контактов. Выявленные вариации в организации системы актиновых микрофиламентов свидетельствуют о различной степени взаимодействия клеток с различными белками ВКМ и могут зависеть от комбинации интегринов, экспонированных на поверхности плазматической мембраны. Высказано предположение о наличии существенных различий в морфогенетической функции исследованных фибробластов разного происхождения.

Ключевые слова: фибробласты, белки внеклеточного матрикса, цитоскелет, фокальные контакты, винкулин.

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, НФ — нормальные фибробласты кожи, РФ — рубцовые фибробласты кожи, ФК — фокальные контакты, ЭФ — эмбриональные фибробласты человека.

Фибробласты являются главным источником белков внеклеточного матрикса (ВКМ), который создает основу для формирования структуры тканей в процессе морфогенеза и при их регенерации после повреждения. ВКМ не только обеспечивает связь популяций клеток разного типа между собой и придает механическую устойчивость органам и тканям, но является также регулятором таких жизненно важных клеточных процессов, как пролиферация, дифференцировка, миграция и др. (Schultz, 2005). Фибробласты присутствуют во всех тканях организма, но, судя по последним литературным данным, могут различаться между собой по количественному и качественному набору синтезируемых белков, что должно приводить к созданию специфического микроокружения для клеток соответствующей ткани. Так, например, в коже человека присутствуют субпопуляции фибробластов с различной локализацией (папиллярные и ретикулярные), которые обладают различными морфологическими и синтетическими характеристиками (Sorrel, 2004).

Цитоскелет четко реагирует на любые внешние изменения, и по характеру его пространственной организации можно судить о степени сходства или различия между собой клеток разного происхождения, находящихся в одинаковых условиях. Актиновый цитоскелет, принимающий участие в осуществлении сигнальных процессов, начинает формироваться под клеточной мембраной

при взаимодействии с комплексами актинсвязывающих белков. Такими мультимолекулярными комплексами, в частности, являются фокальные контакты (ФК), осуществляющие связь между рецептором, плазматической мембраной и цитоскелетом. В состав такого комплекса входят рецепторы интегринового типа и актинсвязывающие белки — талин, паксиллин, винкулин и др. (Turner, Burridge, 1991). Адгезионные контакты при распластывании клеток на субстрате имеют две известные стадии развития: 1) образование начального (точечного) контакта; 2) его созревание в штриховой (Дугина, 1999).

Показано, что белки ВКМ оказывают существенное влияние на формирование структуры актинового цитоскелета (Grinnell, 1978). В нашей лаборатории ранее было исследовано влияние белков ВКМ на организацию цитоскелета у клеток эпидермоидной карциномы человека А-431. Полученные результаты демонстрируют характерность структуры актинового цитоскелета, формирующейся в одних и тех же клетках при распластывании на подложке, покрытой различными белками ВКМ (Are et al., 2001). Вместе с тем у фибробластов при наличии разного набора поверхностных рецепторов могут обнаруживаться определенные модификации в системе актиновых микрофиламентов при сохранении общего типа пространственной организации. В связи с этим необходимо было провести анализ организации цитоскелета фибробластов, полу-

ченных из нормальной, рубцовой и эмбриональной кожи на одном и том же белке ВКМ и на основных мажорных белках ВКМ. Если будут обнаружены различия в организации цитоскелета фибробластов, полученных из разных источников, на одном и том же белке, то можно предположить и существование различий в синтетической активности клеток.

Так как на клетки, находящиеся как в составе ткани, так и в культуре, одновременно действует множество разнообразных лигандов, трудно вычлнить результат действия одного из них. В качестве модели, позволяющей изучить реакцию клетки на отдельные белки ВКМ, было использовано прикрепление и распластывание клеток на иммобилизованных лигандах. С помощью такого подхода представляется возможным установить степень взаимодействия клеток с различными белками ВКМ и особенности организации актинового цитоскелета и формирования фокальных контактов (ФК) при действии на клетку различных лигандов. В качестве таких субстратов были выбраны следующие белки внеклеточного матрикса: коллаген I и IV типов, фибронектин и ламинин 2/4, относящиеся к основным белкам матрикса кожи человека.

Таким образом, задачей работы было выявить различия в организации цитоскелета и ФК у фибробластов, выделенных из нормальной и рубцовой кожи человека, из эмбриональной кожи человека при взаимодействии с одним и тем же белком внеклеточного матрикса, а также выяснить, как изменяются эти параметры при смене субстрата.

Материал и методика

Выделение фибробластов. Фибробласты выделяли методом миграции из нормальной и рубцовой кожи взрослых доноров и эмбриональной кожи. В качестве нормальной и рубцовой кожи взрослых доноров была использована кожа лица, полученная в результате косметологических операций и любезно предоставленная сотрудниками косметологической фирмы «Медакс». ЭФ были выделены из кожи эмбриона позднего срока развития, изъятая в результате кесарева сечения. Кожу промывали раствором PBS (137 мМ NaCl, 7 мМ Na_2HPO_4 , pH 7.4, 1.5 мМ KH_2PO_4 и 267 мМ KCl) и нарезали на небольшие фрагменты (5—10 мМ). Затем помещали в чашки Петри, накрывали покровным стеклом и добавляли среду DMEM (ICN), содержащую 18 % FBS (Gibco). Выползание клеток из кусочков кожи начиналось через 3—5 сут; через 14—20 сут фибробласты образовывали монослой.

Субстраты. В качестве субстратов для экспериментов использовали белки ВКМ: коллаген I и IV типов, ламинин 2/4 и фибронектин. Коллаген I типа был получен из сухожилий крысиных хвостов (Chandrakasan et al., 1967), коллаген IV типа — из плаценты человека (Kleinman, 1994). Коллагены были выделены и любезно предоставлены Л. В. Кухаревой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Ламинин 2/4 был выделен из плаценты человека модифицированным методом (Palm, Furcht, 1983; Черепанова и др., 2002), фибронектин был получен из плазмы крови человека (Ruoslahti et al., 1982). Фибронектин и ламинин 2/4 любезно предоставлены И. В. Воронкиной (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Иммунофлуоресцентный анализ. Покровные стекла, обработанные Repell-Silane (Pharmacia Biotech., Швеция) для придания поверхности гидрофобных

свойств, покрывали различными лигандами (коллагеном I и IV типов, фибронектином и ламинином 2/4) с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Для предотвращения неспецифического взаимодействия клеток с поверхностью стекла дополнительно покрывали 2%-ным раствором БСА (в течение 1 ч при 37 °С) с последующей отмывкой PBS. Для изучения влияния иммобилизованных лигандов на структуру актинового цитоскелета фибробласты из нормальной, рубцовой и эмбриональной кожи после инкубации в полной среде отмывали 3 раза средой без сыворотки и наносили по 100 мкл суспензии ($1 \cdot 10^6$ кл./мл) в среде без сыворотки на покрытые лигандами покровные стекла. После инкубации в течение 60 мин при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 среду осторожно удаляли и промывали PBS. Прикрепившиеся клетки фиксировали 4%-ным формалином (15 мин при комнатной температуре) и трижды отмывали PBS. Затем обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X-100 в течение 15 мин при комнатной температуре и снова трижды отмывали PBS.

После отмывки клетки инкубировали с первыми антителами на винкулин в течение 60 мин при комнатной температуре. Для экспериментов использовали моноклональные антитела человека к винкулину (Sigma, США) в разведении 1 : 300. После отмывки клеток от первых антител для формирования окраски на стекла наносили вторые антитела (в разведении 1 : 300) и инкубировали 30 мин в темноте. В качестве вторых антител использовали антимишинные антитела (anti-mouse IgG FITC Conjugate, Sigma, США). Затем наносили родамин-фаллоидин (Molecular Probes) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Идентификацию окрашенных клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Karl Zeiss Axioscop.

Результаты

На субстрате из коллагена I типа фибробласты всех указанных выше вариантов кожи имеют различные форму и степень формирования цитоскелета. У нормальных фибробластов наблюдается преимущественно округлая форма клеток. Большое количество актинсодержащих стресс-фибрилл сосредоточено на периферии, а некоторые из них пересекают и среднюю часть клетки. Кроме того, выявляется большое число коротких пучков актина, ориентированных перпендикулярно плазматической мембране и совпадающих с распределением актинсвязывающего белка винкулина в этой области цитоплазмы. Многочисленные штриховые структуры, в которых солокализируются винкулин и актин, демонстрируют наличие на краю клетки зрелых фокальных контактов. Аналогичные адгезионные контакты наблюдаются и на всей ventральной части плазматической мембраны распластанных клеток, свидетельствуя о высокой степени сродства этого типа фибробластов к данному субстрату.

Другая картина распределения системы актиновых микрофиламентов наблюдается у рубцовых фибробластов. Основная часть актина сосредоточена на краю разветвленной ламеллы распластанных клеток в виде беспорядочно ориентированных коротких пучков или полимерного актина без сформированных структур. В центральной части цитоплазмы выявляется небольшое число пучков, напоминающих стресс-фибриллы. Винкулин точно распределен по краю ламеллы, а также в виде аморф-

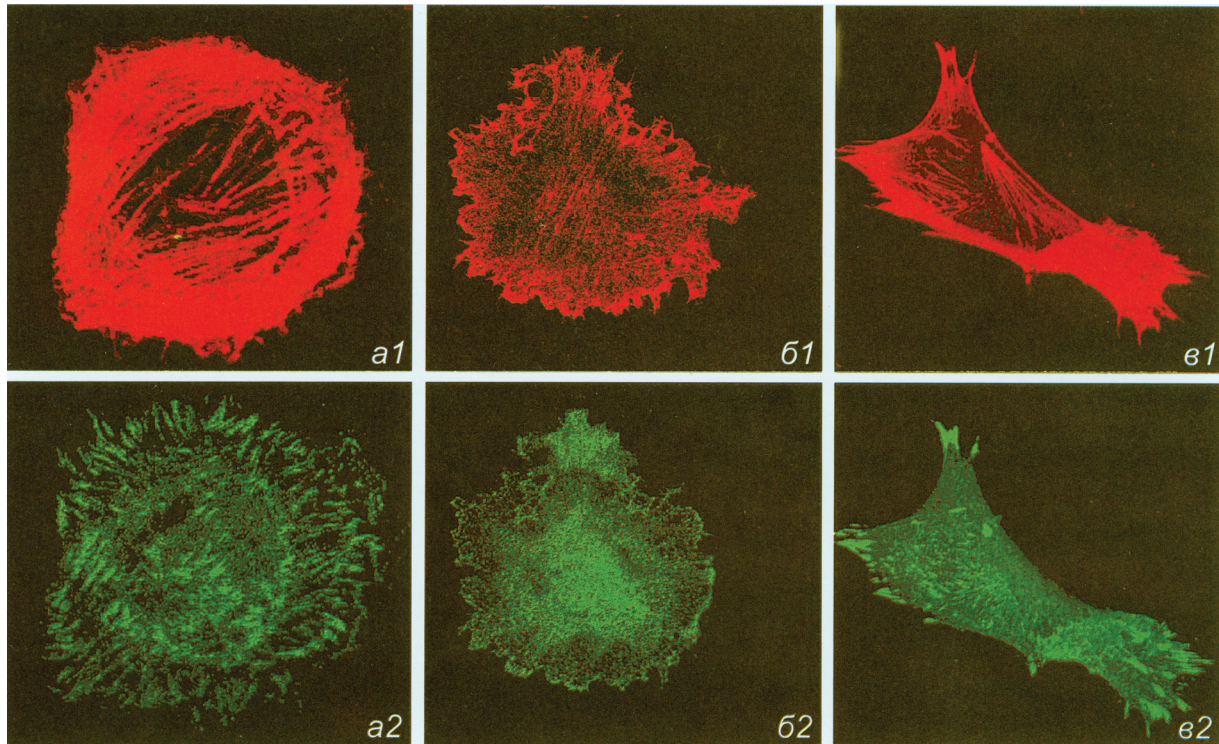


Рис. 1. Организация актинового цитоскелета у нормальных (a1), рубцовых (b1) и эмбриональных (v1) фибробластов, окрашенных флуоресцентно мечеными антителами против винкулина (a2—v2), на коллагене I типа.

ного сгущения над ядром клетки. Слабое развитие актинового цитоскелета указывает на плохой контакт этих клеток с данным субстратом.

В свою очередь эмбриональные фибробласты имеют форму и характер организации цитоскелета, сильно отличающиеся от вышерассмотренных клеток. Во-первых, клетки поляризованы и имеют мобильный фенотип с ламеллой на ведущем крае. Во-вторых, актин сосредоточен в виде длинных пучков по бокам вытянутой клетки, в ламелле и ее выростах, а также на противоположном конце. Винкулин выявляется в виде плотных ярких структур на переднем и заднем концах клетки, там, где при движении происходят наиболее плотные контакты с субстратом. Кроме того, большее число мелких штриховых структур распределено вдоль вентральной поверхности мембраны (рис. 1).

На иммобилизованном коллагене IV типа распластаные НФ имеют полигональную форму с большим числом стресс-фибрилл, ориентированных параллельно изгибающемуся краю клетки. Кроме того, пучки актиновых микрофибрилл разных типов организации заполняют всю цитоплазму. Винкулин в виде небольших кольцевых и полукольцевых структур выявляется на концах стресс-фибрилл и других вытянутых пучков актина. Распределение винкулина свидетельствует о достаточно хорошем взаимодействии с субстратом, но не таком плотном, как с коллагеном I типа.

РФ в отличие от нормальных имеют более округлую форму и отличаются практически полным отсутствием стресс-фибрилл и каких-либо организованных актиновых структур в цитоплазме. Весь выявляемый при окраске актин распределяется по периметру по самому краю ламеллы в виде пучков. Винкулин полностью солокализуется с пучками актина, но не образует дискрет-

ных структур наподобие штрихов, колец или точечного распределения. По-прежнему основная масса винкулина обнаруживается над областью ядра в виде аморфной массы.

ЭФ, как на коллагене IV типа, сохраняют поляризованную форму и имеют мобильный фенотип. При этом, однако, они больше распластаны и имеют более длинные выросты, оканчивающиеся микроворсинками и заполненные пучками актиновых микрофиламентов. Винкулин сосредоточен на концах этих пучков в виде небольших штрихов, а также аморфно распределен по всей цитоплазме (рис. 2).

При распластывании на ламине 2/4 нормальные фибробласты сохраняют полигональную форму, но в отличие от предыдущих случаев актиновые структуры сосредоточены в них на краях клетки с неупорядоченной ориентацией. Часть пучков микрофиламентов расположена радиально и продолжается в длинных микроворсинках, которых не было при распластывании на коллагенах. Винкулин выявлен также на краях клетки в виде точечных структур и солокализуется с концами пучков микрофиламентов. Значительная его часть сконцентрирована над ядром в виде аморфной массы. Общий характер организации цитоскелета свидетельствует о слабом взаимодействии клеток с субстратом.

Рубцовые фибробласты хорошо распластаны на ламине, поляризованы и имеют широкую ламеллу на ведущем крае, заполненную большим количеством стресс-фибрилл. Эти структуры ориентированы перпендикулярно краю ламеллы и заканчиваются зрелыми фокальными контактами. Об этом свидетельствует распределение винкулина в штриховых структурах, солокализующихся с концами стресс-фибрилл. Часть актина и винкулина выявляется в структурах, расположенных на концах клетки.

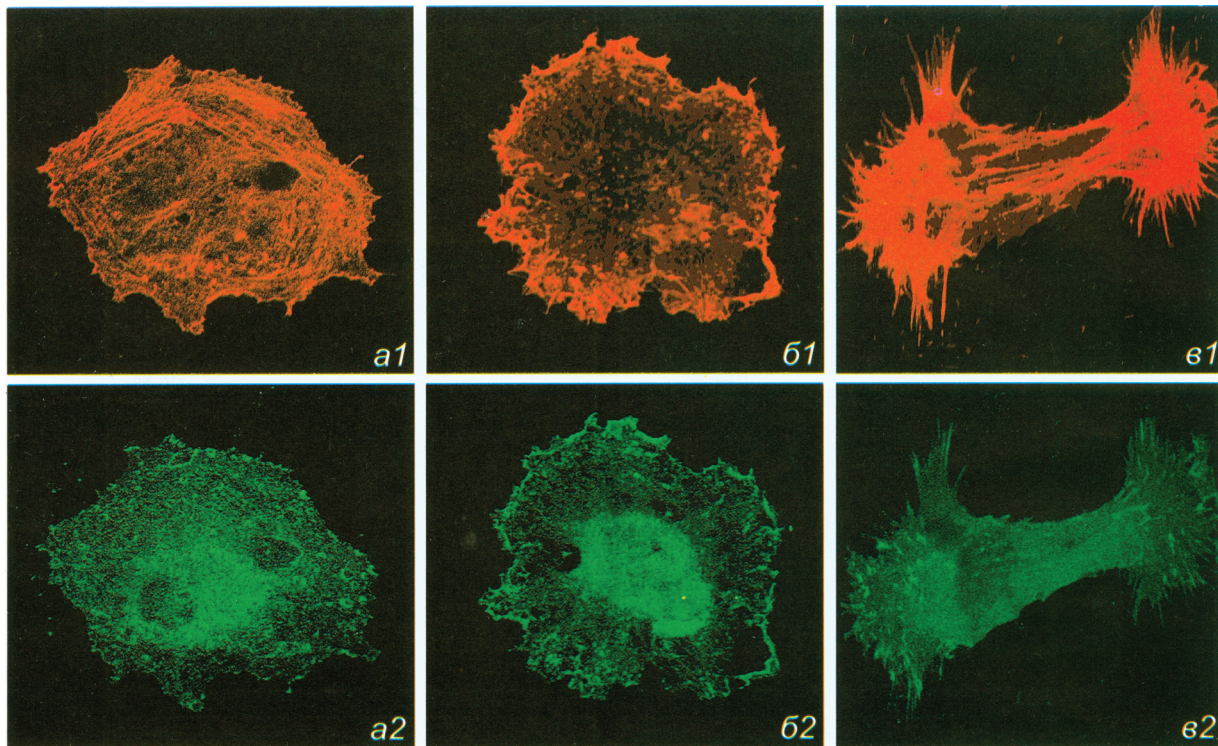


Рис. 2. Организация актинового цитоскелета у нормальных (a1), рубцовых (b1) и эмбриональных (e1) фибробластов, окрашенных флуоресцентно мечеными антителами против винкулина (a2–e2), на коллагене IV типа.

Кроме того, множественные скопления винкулина неправильной формы выявляются во всей центральной части цитоплазмы. Распределение актинсодержащих структур и винкулина свидетельствует о высокомолекулярном виде фибробластов к данному субстрату.

ЭФ при распластывании демонстрирует, как и на коллагенах, поляризованную форму клетки и имеют мобильный фенотип. Длинные пучки актиновых микрофиламентов тянутся от заднего края к переднему, переходя в сеть актиновых структур на ведущем крае в ламелле. Винкулин выявляется в небольшом числе адгезионных контактов на краю ламеллы и на заднем конце клетки. Он также сопровождается вытянутыми пучками микрофиламентов в виде небольших вкраплений неопределенной формы (рис. 3).

В отличие от взаимодействия клеток с предыдущими типами субстратов все виды фибробластов при распластывании на фибронектине демонстрируют сходную форму и организацию актиновых структур. Все они имеют округлую поляризованную форму с широкой ламеллой на переднем крае, заполненную плотным циркулярным тяжом многочисленных пучков актиновых микрофиламентов. Под тягом просматриваются радиальные стресс-фибриллы. В большей степени такое распределение выражено у НФ и ЭФ. Кроме того, длинные актиновые структуры тянутся по краю клетки к заднему концу. В центральной части цитоплазмы актиновые структуры практически отсутствуют.

Наибольшие различия выявляются в распределении винкулина. У НФ он сосредоточен главным образом в ламелле в виде мощных штриховых контактов, с которыми взаимодействуют радиальные пучки актиновых структур. Винкулин в виде подобных структур, но меньшего размера распределен также и по всей вентральной поверхности клетки. У РФ винкулин также распределяется главным об-

разом в области ламеллы, но более разряженно и в виде небольших штриховых контактов, переходящих постепенно в точечные контакты по направлению к центральной части цитоплазмы. Очень мелкие точечные контакты простираются до задней части клетки. У ЭФ редкие зрелые штриховые контакты выявляются только в области ламеллы. В центральной части цитоплазмы они практически отсутствуют, но зато в области ядра наблюдается аморфная масса винкулина.

Исходя из распределения винкулина и формы содержащих его структур можно сделать заключение о том, что наибольшим средством к данному субстрату обладают НФ. Затем следуют РФ и в наименьшей степени — ЭФ (рис. 4).

Обсуждение

Проведенные исследования подтвердили наше исходное предположение о том, что дермальные фибробласты, полученные из фрагментов кожи разных типов, различаются по характеру взаимодействия с иммобилизованными белками внеклеточного матрикса. Об этом свидетельствуют выявленные различия в пространственной организации системы актиновых микрофиламентов и распределении фокальных контактов. При сравнении фибробластов, распластанных на одном и том же белке внеклеточного матрикса, например на коллагене или ламинине, общий характер пространственной организации актинового цитоскелета действительно сохраняется. При этом, однако, наблюдаются существенные различия как в распределении актиновых структур, так и в степени формирования фокальных контактов. Из этих данных следует, что во взаимодействии с одним и тем же бел-

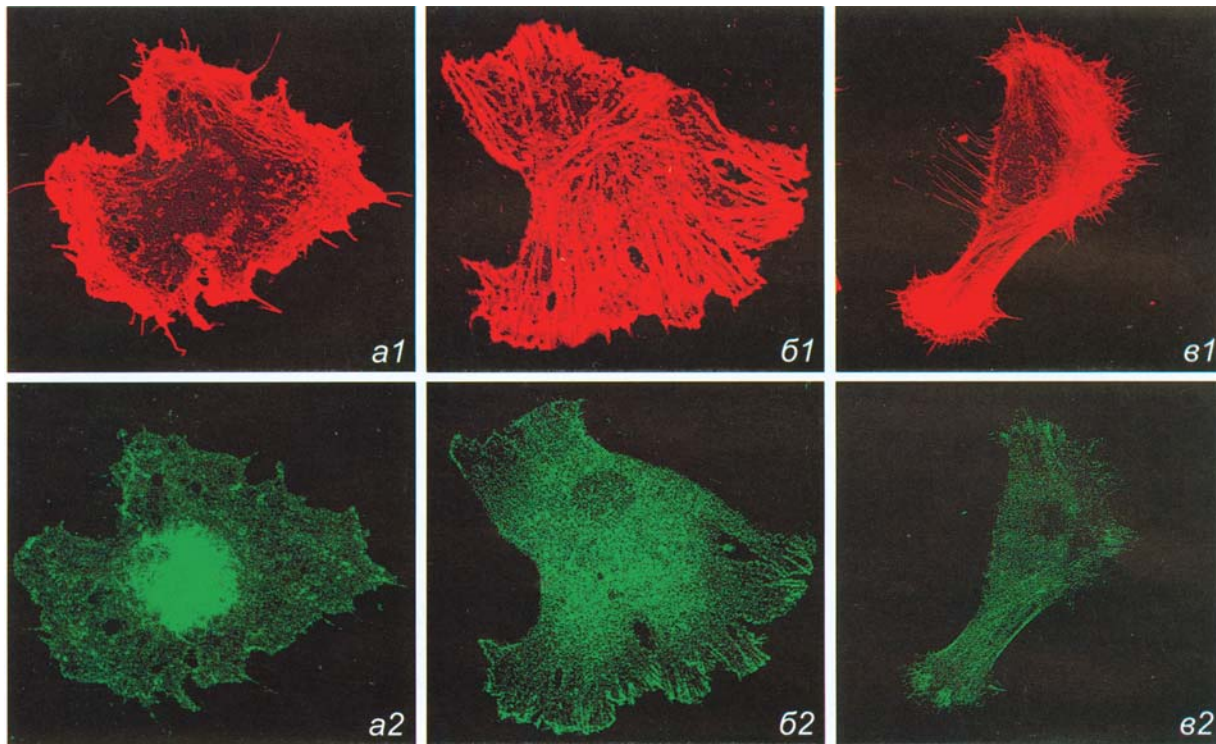


Рис. 3. Организация актинового цитоскелета у нормальных (*a1*), рубцовых (*б1*) и эмбриональных (*в1*) фибробластов, окрашенных флуоресцентно мечеными антителами против винкулина (*a2—в2*), на ламине 2/4.

ком, по-видимому, вовлечены разные сочетания интегриновых рецепторов, определяющих степень сродства к данному субстрату. В пользу такого заключения свидетельствуют полученные данные о различной степени срод-

ства или более тесного контакта с тем или иным субстратом одного типа фибробластов. Так, например, НФ демонстрируют наибольшую степень взаимодействия с субстратом при распластывании на коллагене I типа и

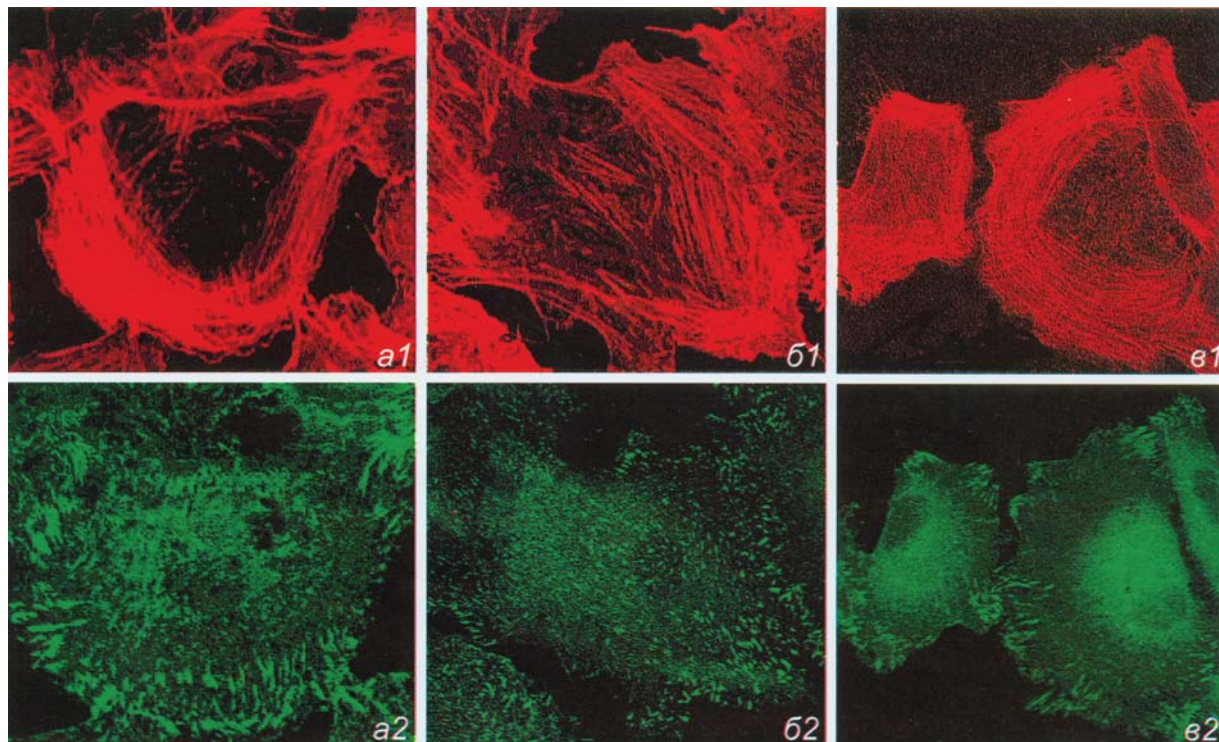


Рис. 4. Организация актинового цитоскелета у нормальных (*a1*), рубцовых (*б1*) и эмбриональных (*в1*) фибробластов, окрашенных флуоресцентно мечеными антителами против винкулина (*a2—в2*), на фибронектине.

фибронектине, достаточно хорошо взаимодействуют с коллагеном IV типа, но не так плотно, как с коллагеном I типа, и слабо взаимодействуют с ламинином 2/4.

Для РФ наиболее адгезивным являются фибронектин и ламинин 2/4, а на коллагене I и IV типов клетки имеют слабо развитый актиновый цитоскелет и плохой контакт с данными субстратами. В отличие от НФ и РФ ЭФ имеют сильную степень сродства к коллагену I и IV типов и ламинину 2/4. В наименьшей степени они взаимодействуют с фибронектином.

Исходя из совокупности полученных результатов можно предположить, что в адгезии клеток на белках внеклеточного матрикса участвуют интегриновые рецепторы разных типов. Интегрины — семейство поверхностных рецепторов, тесно вовлеченных во взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом. Фибробласты узнают основные аминокислотные последовательности коллагена с помощью специфических поверхностных рецепторов. Два наиболее хорошо изученных рецептора — $\alpha\beta1$ и $\alpha2\beta1$. Кроме того, известно, что у фибробластов существует интегриновый рецептор с αV -субъединицей, взаимодействующий с витронектином и фибронектином, который может функционировать как коллагеновый рецептор и играть большую роль в процессах раневого заживления (Agrez et al., 1991).

Известно, что адгезия клеток на ламинине осуществляется при участии по крайней мере семи членов семейства интегринов, взаимодействующих с различными молекулами ламинина (Kuhn, Eble, 1994). Специфическими рецепторами фибробластов на ламинине являются $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ и $\alpha6\beta4$. В настоящих экспериментах использовали ламинин 2/4, имеющий общие с ламинином $\beta1$ - и γ -субъединицы. Было показано, что, как и эпидермальный фактор роста, ламинин стимулирует пролиферацию фибробластов (Couchman et al., 1983). Эти данные свидетельствуют о том, что ламинин может оказывать комплексное влияние на поведение и морфологию клетки. Однако неизвестно, как разные домены влияют на организацию системы микрофиламентов.

Одним из мажорных белков внеклеточного матрикса является фибронектин. Он образует специфические связи между компонентами матрикса и рецепторами клетки, тем самым влияя на формирование цитоскелета клетки и ее дифференцировку, кроме того, участвует в регуляции дифференцировки тканей, созревании рубца, а также ускоряет миграцию клеток при заживлении. Фибронектин является одним из первых белков, участвующих в организации волокнистой соединительной ткани, и по мере секреции коллагена клетками его количество уменьшается. Перечисленные свойства обеспечивают фибронектину существенную роль в морфогенезе вообще и эмбриогенезе в особенности. Специфическими рецепторами при взаимодействии фибробластов с фибронектином служат $\alpha5\beta1$, $\alpha V\beta1$ и $\alpha8\beta1$ (Zhang et al., 1993).

Исходя из литературных данных представляет интерес проанализировать экспрессию различными по происхождению фибробластами рецепторов $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha5\beta1$ и $\alpha8\beta1$, специфичных к коллагенам, ламинину и фибронектину соответственно.

Следует отметить, что, несмотря на сходный тип организации системы микрофиламентов в клетках, распластанных на фибронектине, распределение винкулина в этих клетках принципиально различно. У НФ он сосредоточен главным образом в ламелле в виде мощных штриховых контактов, с которыми взаимодействуют

радиальные пучки актиновых структур. У рубцовых фибробластов винкулин также распределяется главным образом в области ламеллы, но более разряженно и в виде небольших штриховых контактов, переходящих постепенно в точечные контакты по направлению к центральной части цитоплазмы. У ЭФ редкие зрелые штриховые контакты выявляются только в области ламеллы. В центральной части цитоплазмы они практически отсутствуют, в области ядра наблюдается аморфная масса винкулина.

Белками, участвующими в формировании фокальных контактов, являются тензин, талин, альфа-актинин, винкулин, паксиллин и фокальная адгезионная киназа (Burgidge et al., 1997). Винкулин — постоянный участник фокальной адгезии — в фибробластах нормальной и эмбриональной кожи, распластанных на коллагене I типа и фибронектине, выявляется в виде тонких штрихов на концах пучков микрофиламентов. У фибробластов рубцовой кожи винкулин выявляется в виде точечных контактов по контуру клетки. По-видимому, в данном случае на поверхности клеток формируется принципиально иной тип контакта с субстратом, в котором могут участвовать другие актинсвязывающие белки.

Более 50 актинсвязывающих белков в цитоплазме связываются с актином, выполняя различные функции: регулируют объем G-актинового пула (профилин), влияют на скорость полимеризации (виллин), стабилизируют концы нитей (фрагин и α -актинин), сшивают филаменты друг с другом или с другими компонентами (виллин, α -актин, спектрин, MARCKS и фимбрин), фрагментируют полимерный F-актин (гельзолин). Активность этих белков регулируется Ca^{2+} и протеинкиназами (Matsudaira, 1994; Theriot, 1994; Puius et al., 1998; Schmidt, Hall, 1998). Поскольку формирование сложных цитоскелетных структур происходит при участии разнообразных актинсвязывающих белков, естественно предположить, что в реорганизацию актинового цитоскелета под действием различных лигандов вовлекаются белки в различных комбинациях. Изучение распределения некоторых актинсвязывающих белков в клетках, распластанных на разных субстратах, показало, что альфа-актинин дает примерно одинаковую картину распределения в клетках независимо от типа лиганда.

Таким образом, характер распределения актинсвязывающих белков в одинаковых клетках, распластанных на разных субстратах, зависит от типа лиганда. Однако избирательное участие винкулина в формировании актиновых структур является не единственным фактором, обеспечивающим специфичность организации системы микрофиламентов под действием иммобилизованных лигандов. Различия, выявленные при распластывании на разных субстратах, могут возникать и в результате активации различных сигнальных путей. Возможно, что формирование комплексов поверхностных рецепторов с различными иммобилизованными лигандами в процессе распластывания клетки приводит к селективной активации разных сигнальных путей с последующим формированием соответствующих типов актиновых структур.

Возможно, взаимодействие клеток с различными лигандами в процессе распластывания сопровождается специфической реорганизацией системы микрофиламентов. Сравнение действия различных лигандов на клетки разного происхождения поддерживает это заключение. Полученные данные сравнительного анализа структуры актинового цитоскелета фибробластов, культивируемых на

субстратах, могут быть вызваны нарушением лиганд-рецепторных взаимодействий.

На основании сравнения клеток, распластанных на различных лигандах, можно заключить, что выявленные особенности организации системы микрофиламентов у НФ, РФ и ЭФ зависят от клеточного типа и специфичности лиганд-рецепторного взаимодействия. Обнаруженные различия в организации цитоскелета у изученных фибробластов дают основания предположить существование различий в синтетической и морфогенетической функциях клеток.

Список литературы

Дугина В. Б., Васильев Ю. М. 1999. Роль изоформ актина в эволюции фокальных контактов клетка—матрикс. II съезд биофизиков России. Тезисы, раздел 5: Механизмы биологической подвижности. М.

Черепанова О., Калмыкова Н., Воронкина И., Аре А., Горелик Ю., Пинаев Г. 2002. Различия в характере взаимодействия нормальных и трансформированных кератиноцитов человека с изоформами ламинина. Цитология. 44 (2) : 151—158.

Agrez M., Bates R., Boyd A., Burns G. 1991. Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: implications for wound healing. Cell Regul. 2 : 1035—1044.

Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. 2001. Attachment of A-431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of microfilaments system. Cell Motil. Cytoskeleton. 48 : 24—36.

Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M., Zhong C. 1997. Focal adhesion assembly. Trends Cell Biol. 7 : 342—347.

Chandrakasan G., Torchia D., Piez K. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062—6007.

Couchman J., Hook M., Rees D., Timpl R. 1983. Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates. J. Cell Biol. 96 : 177—183.

Grinnell F. 1978. Cellular adhesiveness and extracellular substrate. Int. Rev. Cytol. 53 : 65—144.

Kleinman H. 1994. Isolation of laminin-1 and type IC collagen from the EHS sarcoma. J. Tissue Culture Methods. 16 : 231—233.

Kühn K., Eble J. 1994. The structural bases of integrin-ligand interactions. Trends Cell Biol. 4 : 256—261.

Matsudaira P. 1994. Actin crosslinking proteins at the leading edge. Sem. Cell Biol. 5 : 165—174.

Palm S. L., Furcht L. T. 1983. Production of laminin and fibronectin by Schwannoma cells: cell-protein interactions *in vitro* and protein localization in peripheral nerve *in vivo*. J. Cell Biol. 96 : 1218—1226.

Puius Y., Mahoney N., Almo S. 1998. The modular structure of actin-regulatory proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 10 : 23—34.

Ruoslahti E., Hayman E., Pirsichbacher M., Engvall E. 1982. Fibronectin: purification, immunochemical properties and biological activities. Meth. Enzymol. 82 : 803—830.

Schmidt A., Hall M. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 14 : 305—338.

Schultz Gregory S., Ladwig G., Wysocki A. 2005. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. Интернет-журнал: World Wide Wounds. (<http://www.smtl.co.uk/World-Wide-Wounds>).

Sorrell J. Michael, Caplan Arnold I. 2004. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. J. Cell Sci. 117 : 667—675.

Theriot J. 1994. Regulation of the actin cytoskeleton in living cells. Sem. Cell Biol. 5 : 193—199.

Turner C., Burridge K. 1991. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. Cell Biol. 3 : 849—853.

Zhang Z., Morla A., Vuori K., Bauer J., Juliano R., Ruoslahti E. 1993. The alpha V beta 1 integrin functions as a fibronectin receptor but does not support fibronectin matrix assembly and cell migration on fibronectin. J. Cell Biol. 122 : 235—242.

Поступила 7 IV 2008

CHARACTERISTICS OF CYTOSKELETON ORGANIZATION OF HUMAN NORMAL POSTNATAL, SCAR AND EMBRYONIC SKIN FIBROBLASTS SPREADING ON DIFFERENT PROTEINS OF EXTRACELLULAR MATRIX

N. M. Yudintseva,¹ M. I. Blinova, G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: yudintseva@mail15.com

Human dermal fibroblasts were obtained from various anatomical sites expressing different sets of genes. Distinction of their synthetic can be determined by the microenvironment and composition of receptors on the surface of the cells. Earlier, we have shown that the cytoskeleton of cultured cells rapidly reacts to any external modification, and characteristics of their spatial organization may reflect similarities and differences between cells if various origins under the same conditions. The extracellular matrix proteins influence on the character of structures forming by actin cytoskeleton. In this work, we analyzed cytoskeleton organization of the fibroblasts obtained from normal postnatal, scar an embryonic human skin, which were spreading on the basic proteins of extracellular matrix such as collagen Type I and IV, laminin 2/4, and fibronectin. The results of confocal microscopy showed that fibroblasts of various origins had considerable differences in organization of actin structures and distribution of focal contacts visualized by anti-vinculin antibodies. Furthermore, various fibroblasts spread on the same protein of the extracellular matrix revealed essential modifications of actin structures and focal contacts with the similarity of spatial organization of the cytoskeleton. Discovered variations of actin microfilaments organization are evidence of different extent of cell interactions with various proteins. These variations may depend on combination of integrins on the surface of a cell membrane. The data obtained give grounds to suppose considerable differences in morphogenic function of fibroblasts of various origins.

Key words: fibroblasts, extracellular matrix protein, cytoskeleton, focal contact, vinculin.