

ПРОТЕОГЛИКАНЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МИОБЛАСТОВ L6J1. ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЛИЯНИЕ НА АДГЕЗИЮ

© *И. И. Ермакова*^{1,2,*} *Т. А. Черткова*¹ *А. Л. Мокрушин*¹ *А. В. Романюк*^{1,3}
*Г. А. Сакута*¹ *В. И. Морозов*^{1,4}

¹ *Институт цитологии РАН, ² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург,*

³ *Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета и*

⁴ *С.-Петербургский научно-исследовательский институт физической культуры;*

** электронный адрес: irinabiochem@mail.ru*

Проведено выделение протеогликанов из внеклеточного матрикса (ВКМ) культуры миобластов крысы L6J1 и изучено их влияние на адгезию этих клеток. После обработки выделенных протеогликанов хондроитиназой АС и гепариназой III — ферментами, разрушающими полисахариды, электрофоретически охарактеризованы коровье белки этих соединений и показано, что протеогликаны ВКМ представлены главным образом хондроитинсульфат протеогликанами. Исследуемые соединения, нанесенные на подложку индивидуально или в смеси с фибронектином или ВКМ, ингибировали адгезию миобластов. Обработка субстрата, состоящего из фибронектина и протеогликанов ВКМ, хондроитиназой АС привела к восстановлению нормального прикрепления и расплывания клеток на субстрате. Таким образом, в результате проведенной работы выделены и охарактеризованы протеогликаны ВКМ миобластов крысы L6J1, принадлежащие преимущественно к классу хондроитинсульфат протеогликанов. Показано, что протеогликаны ВКМ миобластов вызывают подавление адгезии этих клеток, которое опосредовано полисахаридными цепями протеогликанов.

Ключевые слова: миобласты, внеклеточный матрикс, протеогликаны, хондроитинсульфат, адгезия.

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, ГАГ — гликозаминогликан(ы), ДМС — 1,9-диметилметиленовый синий, ДСН-ПААГ — полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия, DMEM — модифицированная среда Дальбекко, bFGF — основной фактор роста фибробластов, HGF — фактор роста гепатоцитов, КС — культуральная среда, NEM — N-этилмалеимид, PMSF — фенилметилсульфонилфторид.

Решающее значение для нормального протекания миогенеза имеет взаимодействие миобластов с внеклеточным матриксом (ВКМ), важной составляющей которого являются протеогликаны (Velleman, 2002). Изменение спектра протеогликанов на разных этапах миогенеза указывает на различное участие протеогликанов разных классов в регуляции миогенеза (Brandan, Larrain, 1998; Carrino et al., 1999; Casar et al., 2004; Cornelison et al., 2004; Droguett et al., 2006; Liu et al., 2006). Так, в ходе регенерации поврежденной мышечной ткани было выявлено усиление экспрессии гепарансульфат протеогликанов — синдекана-3, синдекана-4, глипикана и перлекана, тогда как содержание хондроитинсульфат и дерматансульфат протеогликана декорина практически не менялось (Casar et al., 2004). Изменение концентрации гепарансульфат протеогликанов связывают с модуляцией действия факторов роста bFGF и HGF, участвующих в запуске миогенеза (Brandan, Larrain, 1998). Усиление экспрессии хондроитинсульфат и дерматансульфат протеогликана декорина обнаружено *in vitro* в процессе дифференцировки сателлитных клеток с образованием миотуб (Brandan et al., 1991). Декорин — многофункциональный протеогликан, который регулирует коллагеновый фиб-

риллогенез и подавляет рост клеток (Iozzo, Murdoch, 1996). В ходе эмбрионального миогенеза на этапе формирования миофибрилл, а также на начальном этапе регенерации скелетных мышц отмечают высокую экспрессию хондроитинсульфат протеогликана версикана (Carrino, Caplan, 1984; Carrino et al., 1999), который, полагают, принимает участие в регуляции миграции и адгезии клеток (Iozzo, 2000; Perissinotto et al., 2000; Kamiya et al., 2006).

Важными элементами в цепи событий, составляющих миогенез (пролиферация, миграция и дифференцировка миобластов), являются межклеточное узнавание и адгезия миобластов (Charge, Rudnicki, 2004). Сведения об участии протеогликанов в регуляции клеточной адгезии весьма противоречивы: адгезия одного типа клеток может различаться в зависимости от класса протеогликанов, в то же время клетки разных типов могут вести себя по-разному в отношении одного класса протеогликана и даже в отношении одного протеогликана. Показано, что гепарансульфат протеогликанов синдеканы принимают участие в образовании фокальных контактов разных типов клеток (Iozzo, 2000). С другой стороны, гепарансульфат протеогликан перлекан ингибирует адгезию мезангиальных клеток к фибронектину (Iozzo, 2000). Представитель класса

хондроитинсульфат и дерматансульфат протеогликанов декорин способствует адгезии тромбоцитов (Guidetti et al., 2002), но подавляет адгезию фибробластов (Winemoller et al., 1991). При изучении распределения протеогликанов на поверхности фибробластов, взаимодействующих с субстратом, обнаружено, что открепившиеся участки фибробластов богаты хондроитинсульфат протеогликанами и гиалуриновой кислотой, а прикрепленные к поверхности части клеток содержат гепарансульфат протеогликанов (Culpr et al., 1978). Цитированные данные литературы указывают на то, что протеогликианы принимают активное участие в развитии и регенерации мышечной ткани, а также играют важную роль в регуляции клеточной адгезии.

Цель настоящей работы состояла в выделении и характеристике протеогликанов ВКМ миобластов крысы L6J1, а также изучении влияния протеогликанов на адгезию миобластов.

Материал и методика

Реактивы и материалы. В работе использовали хондроитиназу АС, гепариназу III (Sigma, США); ДМС, PMSF и NEM (Serva, Германия); мочевины (Вектон, Россия); ЭБС, среду DMEM, растворы трипсина и версена (Биолот, Россия); флаконы для культивирования (Sarstedt, Германия); декорин и Q-сефарозу (Sigma, США); мембрану для диализа MWCO 12000—14000 (Serva, Германия); мембрану для ультрафильтрации MWCO 5000 (Millipore, США). Фибронектин любезно предоставлен аспирантом Института цитологии РАН Д. А. Гамазиным.

Миобласты и их культивирование. Для выделения протеогликанов ВКМ использовали трансформированные миобласты крысы L6J1, которые были получены из коллекций клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали при 37 °С в среде DMEM, содержащей 10 % ЭБС, во флаконах площадью 175 см² в атмосфере 5 % CO₂.

Выделение протеогликанов. Для выделения протеогликанов из культуры миобластов использовали методы, описанные нами ранее (Ермакова и др., 2007). Выделение проводили из культуральной среды (КС) и ВКМ культуры миобластов, собранного в процессе наращивания 10⁹ клеток. При обработке культуры клеток КС собирали и замораживали до выделения протеогликанов, а клетки и ВКМ снимали с пластика буферным раствором, содержащим 50 мМ ЭДТА, 1 М мочевины и ингибиторы протеолиза PMSF (1 мМ) и NEM (10 мМ) (Ермакова и др., 2007). Далее клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 100 g и 4 °С ($r_{ch.} = 9$ см), а супернатант рассматривали как фракцию ВКМ. Протеогликианы КС и ВКМ экстрагировали с помощью ионообменного сорбента Q-сефароза в течение 2 ч при постоянном встряхивании. По завершении экстракции сорбент помещали в колонки, которые последовательно промывали 50 мМ раствором Tris-буфера, pH 7.0, содержащим 8 М мочевины и 50 мМ Na₂ЭДТА, и тем же буфером, содержащим дополнительно 0.2 М NaCl. Элюцию протеогликанов с Q-сефарозы проводили в градиенте концентрации NaCl 0.2—1.5 М (рис. 1). Фракции градиента объединяли (объединенные фракции I—III для ВКМ и I—IV для КС) с учетом профиля элюции, диализовали против воды, концентрировали с помощью ультрафильтрации и лиофилизировали. Протеогликианы определяли, используя краси-

тель ДМС (Farndale et al., 1986). Содержание белка во фракциях градиента оценивали по поглощению при 280 нм (A₂₈₀) и по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Фракционирование протеогликанов КС нами описано ранее (Ермакова и др., 2007). Для экспериментов по адгезии миобластов были приготовлены исходный ВКМ (ВКМ, содержащий протеогликианы) и часть его, оставшаяся после экстракции протеогликанов с помощью Q-сефарозы, — ВКМ(-), т. е. исходный ВКМ, не содержащий протеогликанов. В процессе приготовления оба препарата диализовали против воды, подвергали ультрафильтрации и лиофилизировали.

Ферментативная обработка протеогликанов. Лиофилизированные фракции II и III — основные фракции, содержащие протеогликианы ВКМ, — растворяли в воде, определяли концентрацию белка по Бредфорд, концентрацию гликозаминогликанов (ГАГ) при помощи ДМС и готовили по 3 пробы каждой фракции из расчета 5 мкг протеогликанов в пробе: 1 — контроль без ферментативной обработки, 2 — 0.01 ед. хондроитиназы АС, 3 — 0.01 ед. гепариназы III. В пробы добавляли 4-кратный буферный раствор, содержащий 100 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 200 мМ NaCl и 16 мМ CaCl₂ в случае гепариназы III и 200 мМ Tris-HCl (pH 7.3) и 240 мМ NaOAc в случае хондроитиназы АС (проба : буфер — 3 : 1). Ферментативное расщепление ГАГ проводили в течение 5 ч при 37 °С в соответствии с инструкцией фирмы, после чего пробы подвергали электрофоретическому анализу.

Электрофорез. Электрофорез проводили в 7%-ном ДСН-ПААГ. В пробы добавляли 4-кратный денатурирующий 100 мМ Tris-буфер, pH 6.8, содержащий 40 % глицерина, 4 % SDS, 0.02 % бромфенолового синего и 0.5 М 2-меркаптоэтанола. Гели окрашивали Кумасси G-250.

Адгезия миобластов. В экспериментах по адгезии наряду с ВКМ и ВКМ(-) использовали препарат протеогликанов ВКМ, составленный из фракций II и III протеогликанов ВКМ, исходя из их соотношения на графике элюции (рис. 1). Препарат протеогликанов КС, также использованный в экспериментах, представлен фракцией IV, содержащей подавляющее количество протеогликанов КС (Ермакова и др., 2007).

В лунки 24-луночного планшета вносили по 20 мкг/мл ВКМ, ВКМ(-), протеогликанов КС, декорина, белка ВКМ фибронектина — одного из основных белков ВКМ — в 0.5 мл PBS. Кроме того, адгезию миобластов анализировали при использовании следующих комбинаций препаратов: 1) 20 мкг/мл ВКМ(-) и 1 или 10 мкг/мл протеогликанов ВКМ (фракции II и III), 2) фибронектина (20 мкг/мл) и декорина (20 и 100 мкг/мл) или протеогликанов КС (20 и 100 мкг/мл). Планшет выдерживали 8 ч при 4—6 °С. Затем убирали жидкую фазу, лунки трижды промывали PBS и в каждую ячейку вносили 0.5 мл суспензии миобластов L6J1 в DMEM, содержащей 2 · 10⁴ клеток. Через 6 ч состояние клеток анализировали под микроскопом (увел. 100×). При изучении влияния на адгезию миобластов полисахаридных цепей протеогликанов клетки вносили в лунки после обработки иммобилизованного субстрата (смесь фибронектина с протеогликанами в концентрации 100 мкг/мл) хондроитиназой АС. При проведении ферментативной обработки после промывки PBS в лунки планшета вносили 0.025 ед. хондроитиназы АС в 0.5 мл 50 мМ Tris-буфера, pH 7.3, 60 мМ NaOAc и планшет выдерживали 3 ч при 37 °С. Затем фермент отмывали PBS 3 раза и в лунки вносили суспензию клеток.

Результаты

Выделение и характеристика протеогликанов ВКМ. В результате выделения с помощью ионообменной хроматографии протеогликанов из ВКМ, синтезированного миобластами L6J1 в культуре, были получены 3 объединенные фракции — I, II и III (рис. 1). Первая фракция, элюция которой происходила при 0.37 М NaCl (определение по поглощению при 280 нм), содержала преимущественно белки. Элюция основной массы протеогликанов происходила во фракциях градиента II и III при концентрациях NaCl 0.50 и 0.65 М.

Количественный анализ протеогликанов ВКМ проводили, раздельно оценивая массу углеводной и белковой составляющих исходя из графиков элюции для белков (рис. 1, кривая 2) и ГАГ (рис. 1, кривая 3). При этом использовали калибровочные графики, для построения которых в качестве стандартов применяли овальбумин (анализ по Бредфорд) и хондротин-6-сульфат (анализ с помощью красителя ДМС). Суммарное количество всех протеогликанов в элюате составило около 1 мг. Содержание белков в ВКМ (определение по Бредфорд) составило около 100 мг. На основании этих данных можно заключить, что доля протеогликанов составляет приблизительно 1 % белков ВКМ миобластов.

Электрофорез фракций II и III протеогликанов ВКМ показал, что протеогликанов обеих фракций — высокомолекулярные соединения, которые не входят в 7%-ный ПААГ и задерживаются на старте (рис. 2, дорожки 1, 4 соответственно). В результате обработки фракций II и III хондроитиназой АС, специфичной в отношении хондроитин сульфатов, появляются новые белковые полосы (рис. 2, дорожки 2, 5). При сопоставлении этих полос с картиной, которую дает сам фермент (рис. 2, дорожка 7), к коровым белкам протеогликанов могут быть отнесены полосы с мол. массой около 230 кДа, обнаруженные во фракции II, и полосы в области мол. масс 140—165 кДа, которые слабо выявляются во фракции II (рис. 2, дорожка 2) и становятся более отчетливыми во фракции III (рис. 2, дорожка 5). Полосы, выявляющиеся в контроле на фермент (рис. 2, дорожка 7), можно объяснить присут-

ствием БСА, который фирма-производитель добавляет в количестве 90 % (по отношению к общему содержанию белка) в исходный препарат хондроитиназы АС для ее стабилизации. В отличие от обработки хондроитиназой АС обработка фракций II и III (рис. 2, дорожки 3, 6) гепариназой III не приводит к появлению новых полос по сравнению с контролем без ферментативной обработки (рис. 2, дорожки 1, 4).

Адгезия миобластов. При адгезии миобластов на суммарном препарате ВКМ не было выявлено отличий по сравнению с адгезией этих клеток на ВКМ(-), не содержащем протеогликанов (рис. 3, а, б). В обоих случаях большая часть миобластов прикреплялась и расплывалась на субстрате. При добавлении к препарату ВКМ(-) протеогликанов ВКМ (1 мкг/мл) миобласты полностью теряли способность адгезировать на своем собственном ВКМ (рис. 3, в). Увеличение концентрации протеогликанов ВКМ до 10 мкг/мл приводило не только к полному подавлению прикрепления клеток на таком субстрате, но также и к сильной агрегации миобластов (рис. 3, г).

Протеогликанов ВКМ, как и протеогликанов КС (далее ВКМ(КС)), нанесенные на подложку в концентрации 20 мкг/мл, полностью препятствовали адгезии миобластов (рис. 4, б). В качестве контроля использовали декорин, молекулы которого, подобно протеогликанам ВКМ миобластов, содержат хондроитинсульфат, и фибронектин — хорошо изученный, высокоадгезивный для клеток белок ВКМ. В то время как ни на декорине (рис. 4, в), ни на протеогликанах ВКМ (рис. 4, б) не наблюдали расплывания миобластов, на фибронектине (рис. 4, а) происходил закономерный процесс адгезии и последующего расплывания клеток.

Расплывание миобластов на фибронектине ухудшалось при добавлении к нему декорина, или протеогликанов ВКМ, или КС в концентрации 20 мкг/мл (рис. 5, а, г), причем протеогликанов ВКМ(КС) ингибировали адгезию сильнее по сравнению с декорином. Увеличение концентрации декорина и протеогликанов до 100 мкг/мл (концентрация, необходимая для последующей ферментативной обработки) усиливало их ингибирующее влияние на адгезию миобластов (рис. 5, б, д), а в случае протеогли-

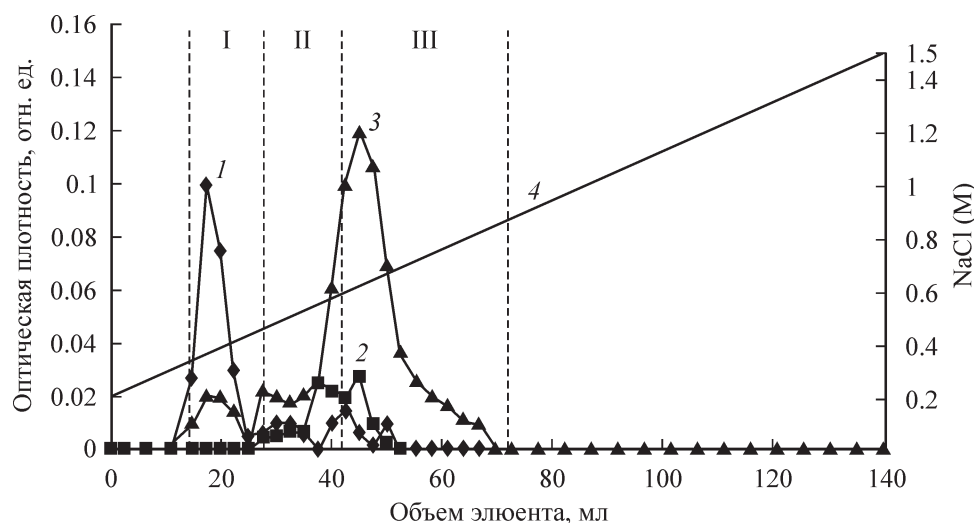


Рис. 1. График элюции протеогликанов ВКМ культуры трансформированных миобластов крысы L6J1 с Q-сефарозы в градиенте концентрации NaCl.

Определение содержания белка во фракциях градиента по поглощению при 280 (1) и 595 (2) нм; определение содержания протеогликанов с помощью красителя ДМС во фракциях градиента по поглощению при 525 нм (3); градиент концентрации NaCl (4). I—III — объединенные фракции градиента.

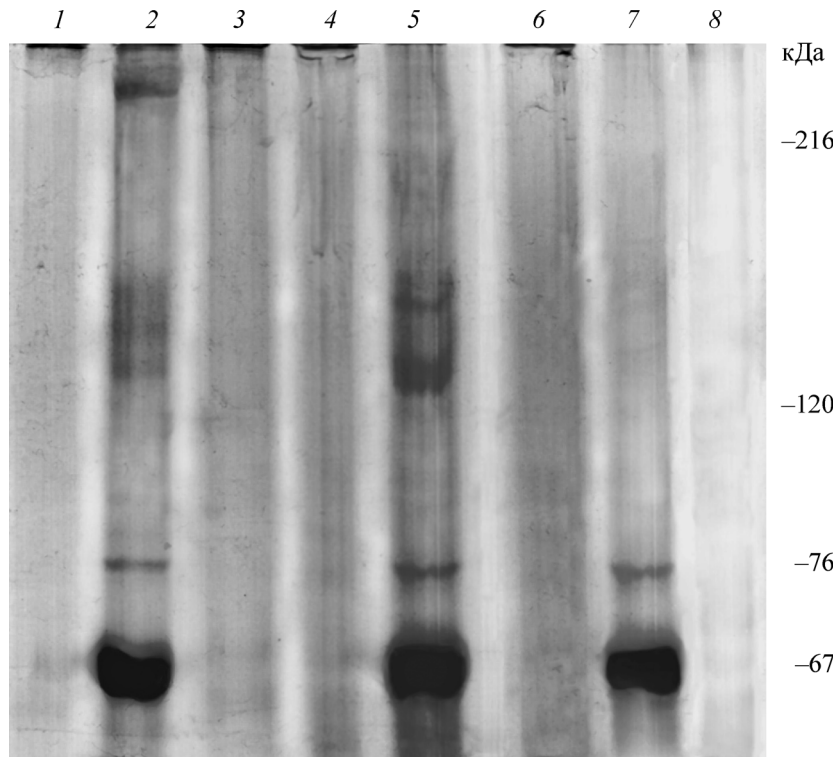


Рис. 2. Электрофорез фракций II и III протеогликанов ВКМ в 7%-ном ДСН-ПААГ.

1 — фракция II ВКМ (контроль без фермента), 2 — фракция II ВКМ после обработки хондроитиназой АС, 3 — фракция II ВКМ после обработки гепариназой III, 4 — фракция III ВКМ (контроль без фермента), 5 — фракция III ВКМ после обработки хондроитиназой АС, 6 — фракция III ВКМ после обработки гепариназой III, 7 — фермент хондроитиназа АС, 8 — фермент гепариназа III.

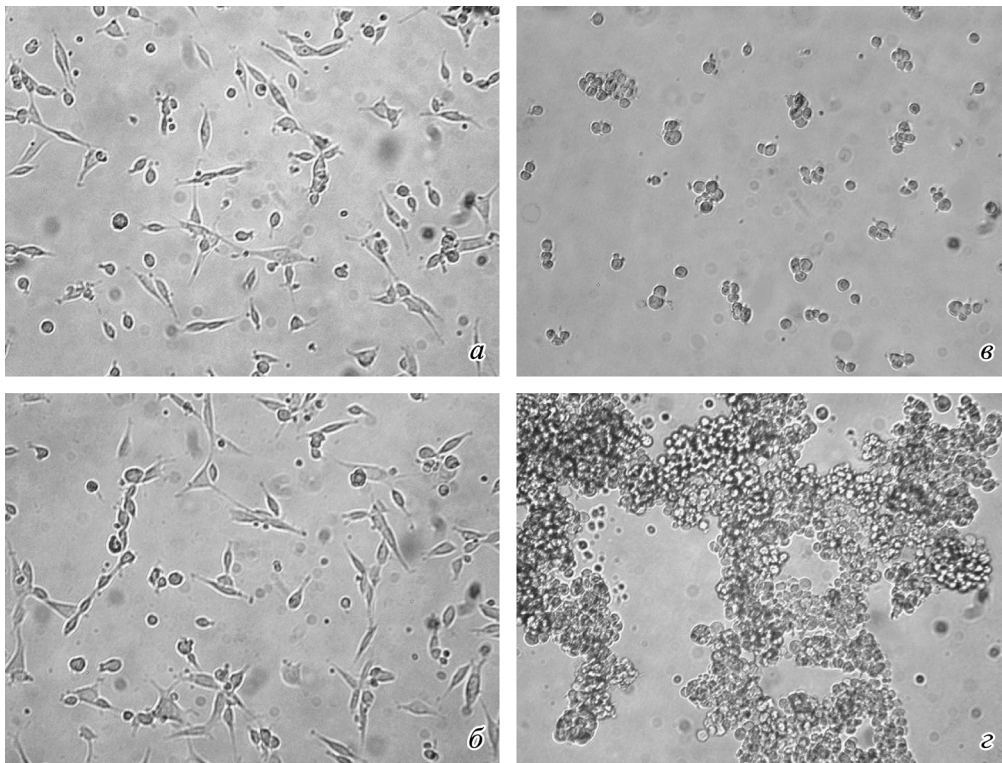


Рис. 3. Адгезия миобластов на протеогликанах ВКМ.

а — ВКМ; б — ВКМ(—); в — ВКМ(—) + ПГ ВКМ, 1 мкг/мл; г — ВКМ(—) + ПГ ВКМ, 10 мкг/мл. Здесь и на рис. 4, 5 показаны прижизненные микрофотографии клеток. Об. 10Х.

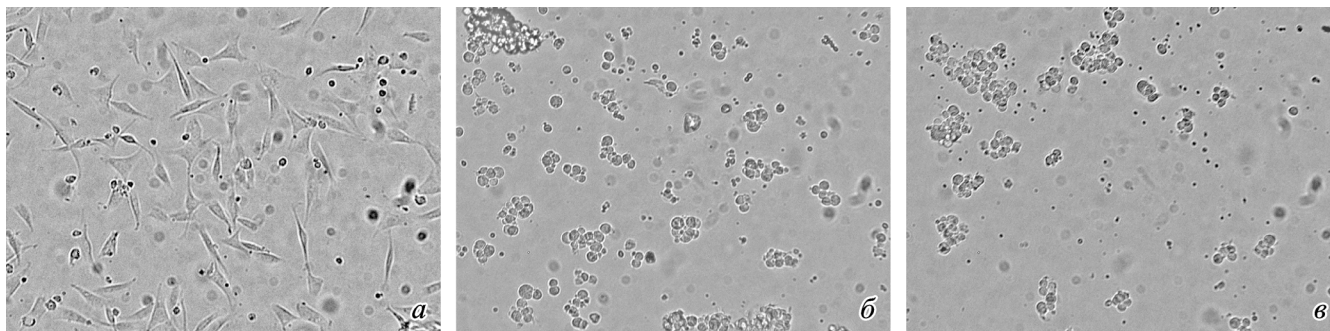


Рис. 4. Адгезия миобластов на фибронектине (а), декорине (б) и протеогликанах ВКМ(КС) (в).

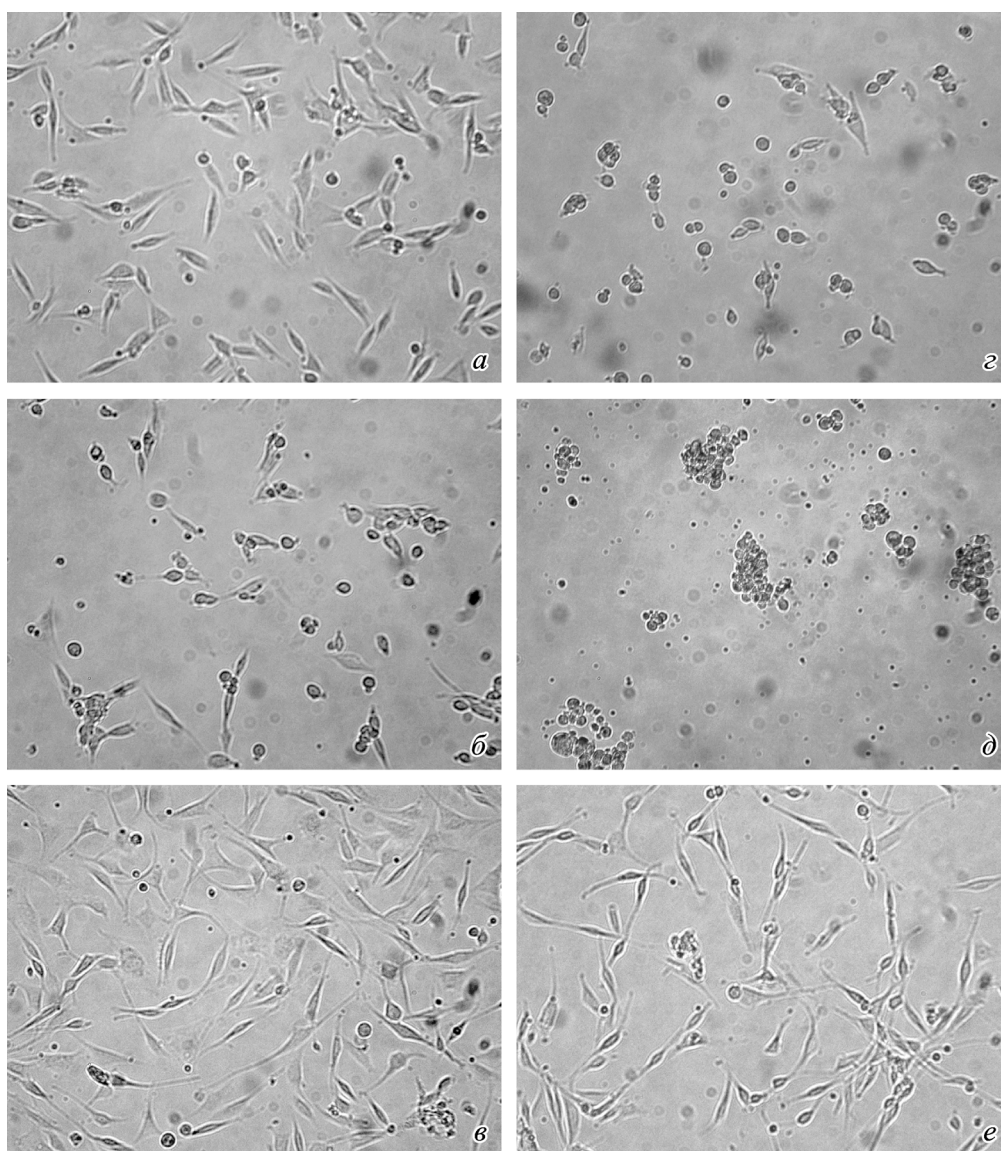


Рис. 5. Адгезия миобластов на фибронектине (20 мкг/мл) в присутствии декорина и протеогликанов ВКМ(КС).

a — декорин, 20 мкг/мл; *б* — декорин, 100 мкг/мл; *в* — декорин, 100 мкг/мл, с последующей обработкой нанесенного субстрата хондроитиназой АС; *г* — протеогликаны ВКМ(КС), 20 мкг/мл; *д* — протеогликаны ВКМ(КС), 100 мкг/мл; *е* — протеогликаны ВКМ(КС), 100 мкг/мл, с последующей обработкой нанесенного субстрата хондроитиназой АС.

канов ВКМ(КС) вызывало агрегацию клеток (рис. 5, д). Обработка субстрата, состоящего из 20 мкг/мл фибронектина и 100 мкг/мл декорина или протеогликанов ВКМ(КС), хондроитиназой АС, расщепляющей цепи хондроитинсульфата, приводила к нормализации прикреплению и распластывания миобластов (рис. 5, в, е).

Обсуждение

В результате проделанной работы получены и охарактеризованы протеогликианы ВКМ, синтезируемые трансформированными миобластами L6J1 в культуре, и исследовано влияние этих протеогликанов, а также полученных нами ранее протеогликанов КС на адгезию миобластов. Показано, что элюция основной массы протеогликанов ВКМ с Q-сефарозы происходит при 0.65 М NaCl. По литературным данным, эта концентрация соли характерна для элюции хондроитинсульфат протеогликанов при их разделении на Q-сефарозе (Iozzo, 2001). Ранее с помощью обработки выделенных протеогликанов хондроитиназой АВС, которая расщепляет цепи хондроитинсульфата дерматансульфата, нами было показано, что протеогликианы культуры миобластов представлены преимущественно хондроитинсульфат и дерматансульфат протеогликанами (Ермакова и др., 2007). В настоящей работе проведен дополнительный анализ состава ГАГ протеогликанов ВКМ с использованием хондроитиназы АС, специфически расщепляющей только хондроитинсульфаты (рис. 2). Электрофорез фракций II и III протеогликанов ВКМ после ферментативной обработки этих фракций выявил практически полное расщепление полисахаридных цепей протеогликанов, локализованных в контрольном препарате на старте (рис. 2, дорожка 1). Исчезновение высокомолекулярного материала, локализованного на старте, сопровождалось появлением набора полос белков, часть которых является коровыми белками протеогликанов (рис. 2, дорожка 4). После исключения полос, принадлежащих препарату хондроитиназы АС, стабилизированной добавлением БСА (контроль на фермент — рис. 2, дорожка 7), к этим белкам можно отнести полосу с мол. массой около 230 кДа. По величине молекулярной массы этот белок может быть коровым белком хондроитинсульфат протеогликана версикана, обнаруженного в мышечной ткани (Iozzo, Murdoch, 1996). Полосы с мол. массами 140—165 кДа также могут иметь отношение к коровым белкам протеогликанов, однако сведения о протеогликанах с такими коровыми белками для скелетных мышц в литературе отсутствуют.

При изучении влияния протеогликанов на адгезию и распластывание миобластов не было выявлено различий в поведении клеток ни на ВКМ, содержащем протеогликианы, ни на ВКМ(-), не содержащем таковых. Клетки одинаково хорошо распластывались на обоих субстратах. Сходное поведение клеток на ВКМ и ВКМ(-) можно, вероятно, объяснить тем, что в соответствии с нашими расчетами доля протеогликанов в препарате ВКМ составляет около 1 %, поэтому белки ВКМ, а не протеогликианы определяют адгезивные свойства ВКМ. Для выявления влияния выделенных протеогликанов на адгезию миобластов мы использовали ВКМ(-), к которому были добавлены протеогликианы ВКМ до концентрации 5 % (20 мкг/мл ВКМ(-) + 1 мкг/мл протеогликанов ВКМ). На таком субстрате клетки полностью теряли способность к прикреплению и распластыванию. Увеличение концентрации

протеогликанов ВКМ до 50 % привело к сильной агрегации миобластов (рис. 3, в). Можно предположить, что увеличение концентрации протеогликанов вызвало ослабление контактов клеток с субстратом и в то же время усилило межклеточные взаимодействия. На возможность образования агрегатов клеток под действием протеогликанов и сульфатированных полисахаридов указано в ряде работ (Yamagata et al., 1989; Shinomura et al., 1991; Дьяков, 1993; Kamiya et al., 2006).

Тот факт, что протеогликианы ВКМ и декорин (рис. 2, б, в) ингибируют адгезию миобластов, может указывать на отсутствие рецепторов у этих клеток к данным протеогликанам, хотя подобные рецепторы обнаружены на клетках других типов (Iozzo, 2000). С другой стороны, если рецепторы к исследуемым протеогликанам на миобластах существуют, то отсутствие связывания с клеточной поверхностью может быть вызвано стерическими затруднениями при взаимодействии рецепторов с иммобилизованными на пластике протеогликанами.

Ингибирование адгезии миобластов к фибронектину протеогликанами, продемонстрированное нами на примере протеогликанов ВКМ, принадлежащих к классу хондроитинсульфатов, может быть специфично как для определенных типов клеток, так и для определенных хондроитинсульфат протеогликанов. Так, показано, что бычьи дермальные фибробласты одинаково хорошо распластываются на фибронектине (20 мкг/мл) и на смеси фибронектина (20 мкг/мл) с хондроитинсульфат или дерматансульфат протеогликанами (300 мкг/мл), полученными из суставного хряща коровы (Lewandowska et al., 1987). С другой стороны, дерматансульфат протеогликианы в опытах авторов ингибировали адгезию к фибронектину клеток VALB/c 3T3 в значительной степени уже при концентрации 100 мкг/мл, в то время как хондроитинсульфат протеогликианы в концентрации 300 мкг/мл не оказывали влияния на адгезию этих клеток к данному белку. В нашем исследовании хондроитинсульфат протеогликианы из ВКМ миобластов препятствовали распластыванию этих клеток на фибронектине, причем заметный эффект наблюдался уже при концентрации протеогликанов 20 мкг/мл.

Еще один пример разного влияния представителей одного класса протеогликанов на адгезию клеток к субстрату был получен в нашем исследовании: протеогликианы ВКМ(КС) (хондроитинсульфат протеогликианы преимущественно) ингибировали адгезию миобластов к фибронектину более эффективно, чем хондроитинсульфат протеогликан декорин. Так, субстрат, состоящий из фибронектина (20 мкг/мл) и декорина (100 мкг/мл), препятствовал адгезии миобластов не полностью, в то время как протеогликианы ВКМ(КС) в той же концентрации вызвали округление и агрегацию всех клеток. Возможно, что различное влияние декорина и протеогликанов ВКМ(КС) на адгезию миобластов к фибронектину можно объяснить большим сродством протеогликанов ВКМ(КС) к этому белку. С помощью аффинной хроматографии показали, что дерматансульфат протеогликианы прочнее связываются с фибронектином, в то время как хондроитинсульфат протеогликианы взаимодействуют с ним слабее (Lewandowska et al., 1987). В соответствии с этими данными подавление адгезии клеток на фибронектине при добавлении дерматансульфат протеогликанов в опытах авторов оказалось более сильным. По-видимому, различная аффинность к фибронектину возможна и у разных представителей одного класса протеогликанов, например хондро-

итинсульфатов, что может быть одной из причин различного влияния декорина и протеогликанов ВКМ(КС) на адгезию миобластов.

Учитывая имеющиеся в литературе данные о том, что протеогликаны могут взаимодействовать с фибронектином как через коровый белок, так и через полисахаридные цепи (Iozzo, 2000), мы обработали субстрат, состоящий из фибронектина и протеогликанов ВКМ, хондроитиназой АС, разрушающей цепи хондроитинсульфата. Если комбинация фибронектина с протеогликанами препятствовала прикреплению и распластыванию миобластов, то после обработки субстрата хондроитиназой АС клетки адгезировали так же хорошо, как на исходном фибронектине. Несмотря на то что разрушение полисахаридных цепей протеогликанов привело к восстановлению адгезии миобластов, их коровые белки могли остаться в связанном с фибронектином состоянии. Вместе с тем можно считать, что устранение полисахаридных цепей восстанавливает адгезию миобластов, тогда как коровые белки, даже если они остаются на фибронектине, не влияют на приращение и распластывание миобластов на этом белке, что согласуется с литературными сведениями для других типов клеток (Lewandowska et al., 1987; Yamagata et al., 1989).

Данные, полученные нами при изучении адгезии миобластов под действием хондроитинсульфата протеогликанов, хорошо согласуются с результатами экспериментов, проведенных *in vivo*, в которых выявлена взаимосвязь высоких концентраций протеогликанов и различных патологий, связанных с поведением клеток. Например, варикозная болезнь вен сопряжена с увеличением содержания гликозаминогликанов, в основном гиалуронана, наряду со снижением содержания коллагена в стенке сосудов (Drubaix et al., 1997). Сочетание диабета с атеросклерозом вызывает характерные изменения сосудистой стенки, что выражается в резком утолщении интимы, которое сопровождается столь же заметным увеличением содержания гиалуронана и хондроитинсульфата бигликана (McDonald et al., 2007). При изучении механизмов патологического тромбообразования при атеросклерозе показано, что на границе тромба и атеросклеротической бляшки (в местах «эрозии бляшки») аккумулируется большое количество хондроитинсульфата протеогликана версикана и гиалуронана, тогда как концентрация бигликана и декорина снижается (Kolodgie et al., 2002). Такие изменения содержания протеогликанов в зоне эрозии уменьшают адгезивность эндотелиоцитов и, например, увеличивают адгезивность тромбоцитов по отношению к базальной мембране сосудов. Лейкоциты мышей, нокаутированные по гену синдекана-1 (гепарансульфат протеогликан, участвующий во взаимодействии лейкоцитов с эндотелием сосудов), обнаруживают повышенную адгезию к эндотелию сосудов ретины глаза (Götte et al., 2002). На основании экспериментов с TNF- α авторы отводят синдекану-1 роль негативного регулятора воспалительного ответа, опосредованного лейкоцитами. Следовательно, различные патологии могут сочетаться с изменением спектра протеогликанов тканей, а изменение спектра протеогликанов может влиять на адгезивные свойства клеток.

Таким образом, наряду с данными литературы результаты нашей работы указывают на участие протеогликанов ВКМ в регуляции адгезивных свойств ВКМ. Механизм этой регуляции может быть основан на изменении как содержания, так и соотношения различных классов

протеогликанов ВКМ. При этом хондроитинсульфат протеогликанов могут играть роль отрицательного регулятора, снижая адгезивность ВКМ.

Авторы выражают искреннюю благодарность д-ру Г. П. Пинаеву за критические замечания, сделанные при подготовке рукописи к печати.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра (проекты 2-63-2005, 2-71-2006 и 2-95-2007).

Список литературы

- Дьяконов И. А. 1993. Влияние иммобилизации в полисахаридные гранулы на функциональные свойства клеток животных: Автореф. канд. дис. СПб. 20 с.
- Ермакова И. И., Сакута Г. А., Мокрушин А. Л., Черткова Т. А., Романюк А. В., Морозов В. И. 2007. Выделение и характеристика протеогликанов культуры миобластов крысы L6J1. Биохимия. 72 : 560—567.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Brandan E., Fuentes M. E., Andrade W. 1991. The proteoglycan decorin is synthesized and secreted by differentiated myotubes. Eur. J. Cell Biol. 55 : 209—216.
- Brandan E., Larrain J. 1998. Heparan sulfate proteoglycans during terminal skeletal muscle cell differentiation: possible functions and regulation of their expression. Basic Appl. Myol. 8 : 107—113.
- Carrino D. A., Caplan A. I. 1984. Isolation and partial characterization of high-buoyant-density proteoglycans synthesized *in ovo* by embryonic chick skeletal muscle and heart. J. Biol. Chem. 259 : 12 419—12 430.
- Carrino D. A., Sorrell J. M., Caplan A. I. 1999. Dynamic expression of proteoglycans during chicken skeletal muscle development and maturation. Poult. Sci. 78 : 769—777.
- Casar J. C., Cabello-Verrugio C., Olguin H., Aldunate R., Inestrosa N. C., Brandan E. 2004. Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. J. Cell Sci. 117 : 73—84.
- Charge S. B. P., Rudnicki M. A. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol. Rev. 84 : 209—238.
- Cornelison D. D., Wilcox-Adelman S. A., Goetinck P. F., Rauvala H., Rapraeger A. C., Olwin B. B. 2004. Essential and separable roles for syndecan-3 and syndecan-4 in skeletal muscle development and regenerations. Genes. Develop. 18 : 2231—2236.
- Culp L. A., Rollins B. J., Buniel J., Hitri S. J. 1978. Two functionally distinct pools of glycosaminoglycan in the substrate adhesion site of murine cells. Cell Biol. 79 : 788—801.
- Droguett R., Cabello-Verrugio C., Riquelme C., Brandan E. 2006. Extracellular proteoglycans modify TGF- β bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation. Matrix Biol. 25 : 332—341.
- Drubaix I., Robert L., Maraval M., Robert A. M. 1997. Synthesis of glycoconjugates by human diseased veins: modulation by procyanidolic oligomers. Int. J. Exp. Pathol. 78 : 117—121.
- Farndale R. W., Buttle D. J., Barrett A. J. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochim. biophys. acta. 883 : 173—177.
- Götte M., Joussen A. M., Klein C., Andre P., Wagner D. D., Hinkes M. T., Kirchhof B., Adamis A. P., Bernfield M. 2002. Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43 : 1135—1141.
- Guidetti G., Bertoni A., Viola M., Tira E., Balduini C., Torti M. 2002. The small proteoglycans decorin adhesion and activation of human platelets. Blood. 100 : 1707—1714.

Iozzo R. V. 2000. Proteoglycans: structure, biology, and molecular interactions. New York: Marcel Dekker Inc. 442 p.

Iozzo R. V. 2001. Proteoglycan protocols. Methods Mol. Biol. 171 : 576 p.

Iozzo R. V., Murdoch A. D. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. FASEB J. 10 : 598—614.

Kamiya N., Watanabe H., Habuchi H., Takagi H., Shinomura T., Shimizu K., Kimata K. 2006. Versican/Pg-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecular crucial for mesenchymal condensation. J. Biol. Chem. 281 : 2390—2400.

Kolodgie F. D., Burke A. P., Farb A., Weber D. K., Kutys R., Wight T. N., Virmani R. 2002. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22 : 1642—1648.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.

Lewandowska K., Choi H. U., Rosenberg K. C., Zardi L., Culp L. A. 1987. Fibronectin-mediated adhesion of fibroblasts: inhibition by dermatan sulfate proteoglycan and evidence for a cryptic glycosaminoglycan-binding domain. J. Cell Biol. 105 : 1443—1454.

Liu C., McFarland D. C., Nestor K. E., Velleman S. G. 2006. Differential expression of membrane-associated heparan sulfate

proteoglycans in the skeletal muscle of turkeys with different growth rates. Poult. Sci. 85 : 422—428.

McDonald T. O., Gerrity R. G., Jen C., Chen H. J., Wark K., Wight T. N., Chait A., O'Brien K. D. 2007. Diabetes and arterial extracellular matrix changes in a porcine model of atherosclerosis. J. Histochem. Cytochem. 55 : 1149—1157.

Perissinotto D., Iacopetti P., Bellina I., Doliana R., Colombatti A., Pettway Z., Bronner-Fraser M., Shinomura T., Kimata K., Mörgelin M., Löfberg J., Perris R. 2000. Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. Development. 127 : 2823—2842.

Shinomura T., Nshida Y., Kimata K. 1991. In: Articular cartilage and osteoarthritis. New York: Raven Press. 35—44.

Velleman S. G. 2002. Role of the extracellular matrix in muscle growth and development. J. Anim. Sci. 80 : E8—E13.

Winnemoller M., Schmidt G., Kresse H. 1991. Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin. Eur. J. Cell Biol. 54 : 10—17.

Yamagata M., Suzuki S., Akiyama S. K., Yamada K. M., Kimata K. 1989. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. J. Biol. Chem. 264 : 8012—8018.

Поступила 7 IV 2008

PROTEOGLYCANS OF L6J1 MYOBLAST EXTRACELLULAR MATRIX. CHARACTERISTICS AND EFFECT ON MYOBLAST ADHESION

I. I. Ermakova,^{1,2,*} T. A. Chertkova,¹ A. L. Mokrushin,¹ A. V. Romaniouk,³ G. A. Sakuta,¹ V. I. Morozov^{1,4}

¹ Institute of Cytology RAS, ² I. P. Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg,

³ Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, and

⁴ St. Petersburg Scientific Research Institute of Physical Culture;

* e-mail: irinabiochem@mail.ru

Proteoglycans were isolated from extracellular matrix of L6J1 rat myoblasts and their influence on myoblast adhesion was studied. Proteoglycan digestion with chondroitinase AC and heparinase III degrading the polysaccharide moieties revealed that chondroitin sulfate proteoglycans are the main class of myoblast extracellular matrix proteoglycans. Electrophoresis of enzymatically processed proteoglycans was used to examine their core proteins. Myoblast adhesion was suppressed by proteoglycans or the mixture of proteoglycans and fibronectin/extracellular matrix. When being processed with chondroitinase AC the combined substrate of fibronectin and proteoglycans lost the capability of myoblast adhesion suppression. Thus, as a result of presented work the proteoglycans of L6J1 rat myoblast extracellular matrix were isolated and purified. The main class of proteoglycans was chondroitin sulphate proteoglycans. Isolated proteoglycans suppressed myoblast adhesion and this effect was mediated by polysaccharide moieties of proteoglycans.

Key words: myoblasts, extracellular matrix, proteoglycans, chondroitin sulfate, adhesion.