

## МЕТОД АНАЛИЗА БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, СИНТЕЗИРУЕМОГО КЛЕТКАМИ В КУЛЬТУРЕ

© Л. В. Туроверова,<sup>1,\*</sup> М. Г. Хотин,<sup>1</sup> Н. М. Юдинцева,<sup>1</sup> К.-Э. Магнуссон,<sup>2</sup> М. И. Блинова,<sup>1</sup>  
Г. П. Пинаев,<sup>1</sup> Д. Г. Тентлер<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

и <sup>2</sup>Отдел клинической и экспериментальной медицины Линчепингского университета, Швеция;

\*электронный адрес: [lvtur@mail.ru](mailto:lvtur@mail.ru); [dtentler@mail.ru](mailto:dtentler@mail.ru)

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой высокоорганизованную мультимолекулярную структуру, необходимую для жизнедеятельности любых организмов. Хотя в настоящее время довольно много известно о структурных компонентах ВКМ, получение всего комплекса этих белков является достаточно сложным процессом, поскольку в состав ВКМ входят фибриллярные белки и протеогликаны, которые образуют сложные мультимолекулярные сети. В настоящей работе мы постарались подобрать наиболее щадящие условия для снятия клеток в культуре без повреждения клеточной мембраны с последующей экстракцией белков ВКМ. В исследовании были использованы клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431 и фибробласты, полученные из нормальной и рубцовой кожи человека. Показано, что снятие клеток с поверхности культуральных чашек раствором ЭДТА не повреждает их мембран. Последующая обработка оставшихся на поверхности культуральных чашек матриксных белков уксусной кислотой для перевода коллагена из фибриллярной формы в молекулярную значительно улучшает возможность фракционирования белков ВКМ. Для снятия белков нами использовался буфер, разработанный на основе буфера для проб по методу Laemmli. С помощью разработанного метода были получены препараты белков ВКМ, синтезируемые клетками в культуре, пригодные для анализа одно- и двумерным электрофорезом, а также для идентификации отдельных белков методами масс-спектрометрии. Эти исследования позволят сравнить белковый состав ВКМ, полученного из разных источников, и понять, как может влиять отсутствие или наличие того или иного белка на структуру и свойства матрикса исследуемых клеток.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, фибробласты, коллагены, фибронектин.

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс.

За последние годы внимание к белкам внеклеточного матрикса (ВКМ) возросло в связи с интенсивными исследованиями процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток млекопитающих и разработкой новых методов их культивирования для медицинских и научных целей. Показано, что ВКМ выполняет не только структурную функцию в организации тканей, как считалось ранее, но также участвует в регуляции множества клеточных процессов. ВКМ представляет собой смесь белков и полисахаридов, которые выполняют различные функции (см. обзоры: Bornstein, Sage, 2002; Daley et al., 2008). Основными структурными белками ВКМ являются коллагены, ламинины, фибронектин и эластин. Эти белки находятся в виде больших мультимолекулярных сетей и придают жесткость и стабильность тканям, а также являются лигандами мембранных клеточных рецепторов. Пропорции структурных белков в составе ВКМ строго тканеспецифичны. Кроме того, в состав матрикса входит большое количество низкомолекулярных мономерных белков, таких как белки, участвующие в синтезе и организации ВКМ (MMP, TIMP, SPARC и PLAU), протеогликаны, взаимодействующие с интегринами (SIBLING и EDIL3),

и ростовые факторы (Stupack, Cheresch, 2007; Daley et al., 2008). Основным источником синтеза внеклеточного матрикса являются фибробласты.

В современной литературе есть целый ряд работ, описывающих различные методы получения белков ВКМ. Однако все предлагаемые методы являются многоступенчатыми и весьма сложными в использовании. Кроме того, в работах крайне редко приводятся данные чистоты отделения клеток от наработанного ими матрикса, что является очень важным фактором при получении этих белков. Попытки выделения матрикса, описанные в литературе, касаются самых разных тканей и клеточных линий. Так, например, в работе Хедмана с соавторами по изоляции матрикса из культур фибробластов человека (Hedman et al., 1979) предложен метод экстракции белков дезоксигалатом натрия и гипотоническим Трис-буферным раствором. Однако в данной работе не указывается, насколько полно снимались клетки перед экстракцией и не повреждались ли они в процессе удаления. Такие данные необходимо учитывать, так как при повреждении клеточных мембран препарат внеклеточного матрикса может быть загрязнен клеточным материалом, а следовательно, опре-

деленные белки могут быть внутриклеточного происхождения. Кроме того, для визуализации белков авторам пришлось применить радиоактивно меченные аминокислоты, что обусловлено крайне малым количеством полученного материала. Столь низкая эффективность предложенного метода делает дальнейший анализ белков крайне затруднительным. Предложенный в другой работе (Samrath et al., 1987) метод получения белка остеогенина, связанного с ВКМ, также представляет собой многоэтапный процесс, включающий в себя экстракцию гуанидингидрохлоридом, аффинную хроматографию на гепарин-сефарозе, гидроксипатитную хроматографию, гель-фильтрацию и жидкостную хроматографию высокого давления (HPLC). Столь же сложные методы были применены при получении матрикса остеобластов (Grünert et al., 2007) и перинейрального матрикса (Deera et al., 2006). Более подробное описание существующих методов получения белков ВКМ из различных тканей и культур клеток приведено в соответствующей литературе (Cunningham, 1987).

Настоящая работа была направлена на разработку подхода, позволяющего анализировать полный набор белков ВКМ, синтезируемых клетками различных типов в культуре. Основным требованием к разрабатываемому методу являлось получение препарата белков ВКМ, свободного от внутриклеточного материала и пригодного для дальнейшего анализа входящих в него белков. В результате нами был разработан метод получения и эффективного разделения белков матрикса, синтезируемого фибробластами кожи человека в культуре, непосредственно участвующими в синтезе белков базальной мембраны. Примененный нами подход позволяет получить белки ВКМ в количестве, достаточном для их анализа протеомными методами.

### Материал и методика

**Клетки.** В работе использовали клетки эпидермоидной карциномы человека линии А431 (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН), рубцовые и нормальные фибробласты кожи человека. Для получения фибробластов использовали нормальную и рубцовую кожу, полученную в результате косметологических операций и любезно предоставленную сотрудниками косметологических фирм Медакс и Capital Med. Фибробласты выделяли методом миграции клеток из нормальной и рубцовой кожи взрослых доноров. Кожу промывали раствором PBS (137 мМ NaCl, 7 мМ NaHPO<sub>4</sub>, 1,5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 267 мМ KCl, pH 7.4) и нарезали на небольшие фрагменты (5—10 мм). Затем фрагменты помещали в чашки Петри, накрывали покровным стеклом и добавляли среду DMEM (ICN, США), содержащую 18 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США). Миграция фибробластов из кусочков кожи начиналась через 3—5 сут. Через 14—20 сут фибробласты образовывали монослой, после чего пассировались. В экспериментах использовали клетки 4—8-го пассажей.

**Получение белков ВКМ.** Клетки (фибробласты и А431) снимали с поверхности чашек 2 мМ раствором ЭДТА на PBS в течение 3—5 мин при 37 °С. Снятые клетки убирали, а оставшиеся на чашках нарабатанные ими белки промывали 3 раза тем же раствором. Полноту снятия клеток контролировали под микроскопом. После полного удаления клеток оставшиеся белки заливали 5%-ной

уксусной кислотой и оставляли на ночь при 4 °С. Затем кислоту убирали, чашки заливали раствором следующего состава: 125 мМ Трис-HCl, pH 6.8, 0.1 % SDS, 10 % глицерина, 1 % ДТТ, 0.05 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Германия) и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Белки снимали скребком, процедуру снятия повторяли 3 раза. Белковые экстракты объединяли, добавляли 5 объемов подкисленного ацетона и оставляли на ночь при -20 °С для формирования осадков. Белки матрикса получали центрифугированием при 7000 g в течение 15 мин.

Кроме того, мы получали фракцию белков матрикса, растворимых в Тритоне X-100. Для этого клетки снимали, как описано выше, а чашки заливали 1%-ным раствором Тритона X-100, инкубировали 30 мин при 37 °С. Процедуру повторяли 3 раза. В остальном методика получения этой фракции была такой же, как описано выше. Полученные образцы обеих фракций растворяли в буфере для одномерного (Laemmli) или двумерного электрофореза (буфере для регидратации: 8 М мочевины, 2 % CHAPS, 20 мМ ДТТ и 0.1 % Тритона X-100). Оставшиеся белки после экстракции Тритоном X-100 растворяли в буфере (Laemmli) для проб.

**Получение клеточного лизата.** Чашки с клетками промывали теплым раствором PBS, далее всю работу вели при 4 °С. Клетки заливали буфером Rira (50 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, 1 % дезоксихолата натрия, 1 % Тритона X-100, 0.1 % SDS, pH 7.2). Непосредственно перед работой добавляли коктейль ингибиторов протеаз. После вскрытия клеток ДНК осаждали 1 объемом этанола и центрифугировали (10 000 g в течение 5 мин). Супернатант переносили в чистые пробирки и осаждали 4 объемами ацетона. Белковый осадок формировался при -20 °С в течение ночи. После центрифугирования при 10 000 g в течение 5 мин осадки растворяли в буфере для проб.

**Иммуноблотинг белков.** Белки разделяли в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS в Трис-глициновом буфере (Laemmli, 1970). После разделения белки переносили на мембрану PVDF в Трис-глициновом буфере, содержащем 20 % метанола и 0.1 % SDS, с помощью установки для переноса (BioRad, США). После переноса мембрану промывали 20 мин раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween 20, далее блокировали 5%-ным раствором обезжиренного сухого молока, разведенного в PBS, содержащем 0.1 % Tween 20. Для визуализации сигнала использовали систему хемилюминесценции ECL с использованием субстратов люминола (1.25 мМ) и паракумаровой кислоты (0.2 мМ), 0.01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 150 мМ Трис-HCl, pH 8.8. Хемилюминесцентное излучение регистрировали с помощью рентгеновской пленки Kodak X-Omat K Film или системы Chemidoc (BioRad, США).

**Двумерный электрофорез.** Двумерный электрофорез проводили на оборудовании фирмы Amersham (Швеция) в соответствии с рекомендациями производителя с небольшими изменениями. Белковые комплексы внеклеточного матрикса растворяли в следующем буфере: 8 М мочевины, 2 % CHAPS, 20 мМ ДТТ и 0.1 % Тритона X-100. Проводили регидратацию гель-стрипов (pH 3—10) в течение ночи для максимальной абсорбции пробы. Затем проводили изофокусировку — разделение белков в гель-стрипе по их изоэлектрической точке по программе: 200 В в течение 30 мин, подъем с 200 до 3500 В в течение 90 мин и 3500 В в течение 4 ч при 20 °С. После этого инкубировали стрип по 10 мин в эквilibрирующем буфере

(6 М мочевины, 30 % глицерина, 2 % SDS и 0.05 М Трис-HCl, pH 6.8) с добавлением 2 % ДТТ, затем стрип переносили в эквilibрирующий буфер, содержащий 2.5 % иодоцетамида. Разделение белков во втором направлении проводили в градиентном геле 1—16 % при 15 °С по программе: 200 В, 20 мА в течение 20 мин, 200 В, 50 мА в течение 70 мин. После электрофореза гели инкубировали в течение ночи в фиксирующем буфере (10 % уксусной кислоты и 20 % метанола) и окрашивали Кумасси (Page Blue Protein Staining, Fermentas, Литва) или серебром с использованием набора Silver Stain (Fermentas, Литва).

Использовали следующие антитела: моноклональные на фибронектин человека (Sigma, США), моноклональные на коллаген I человека (Chemicon, США) и моноклональные на PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (Santa Cruz, США).

### Результаты и обсуждение

Отработку метода выделения белков ВКМ проводили на клетках линии A431. Основной проблемой, стоявшей при разработке метода выделения белков ВКМ, было получение препарата белков, не содержащих клеточного материала и удобного для последующего анализа протеомными методами. Для получения по возможности наиболее полного набора белков ВКМ клетки удаляли с поверхности культуральных чашек раствором ЭДТА (см. раздел «Материал и методика»), что позволило избежать разрушения клеток, а следовательно, и загрязнения внеклеточного материала внутриклеточными белками. При этом снятые с культуральных чашек раствором ЭДТА и повторно помещенные в среду клетки сохраняли способность к дальнейшему культивированию.

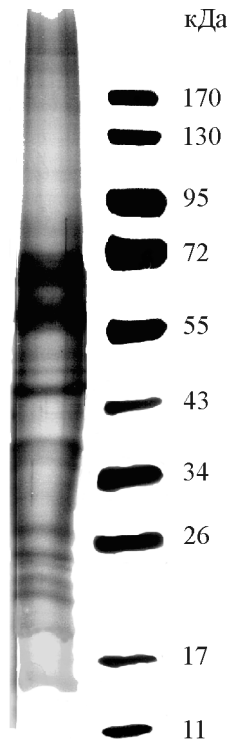


Рис. 1. Электрофореграмма белков ВКМ клеток A431. Белки разделяли в SDS ПААГ и окрашивали серебром.

— 34 кДа  
1 2

Рис. 2. Иммуноблоты белков ВКМ (1) и клеточного лизата (2) клеток линии A431 с антителами к PCNA (Proliferating cell nuclear antigen).

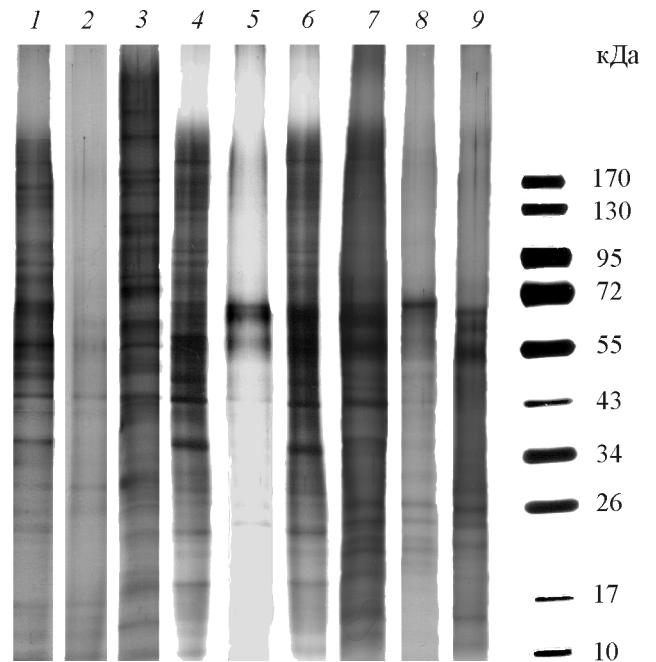


Рис. 3. Гель-электрофорез препаратов белков ВКМ рубцовых фибробластов (дорожки 1—3), нормальных фибробластов (дорожки 4—6) и клеток A431 (дорожки 7—9), полученных разными методами.

1, 4, 7 — препараты белков ВКМ без фракционирования; 3, 6, 9 — растворимые в Тритоне X-100 фракции белков ВКМ (см. раздел «Материал и методика»); 2, 5, 8 — белки ВКМ, оставшиеся после удаления Тритон-растворимой фракции; белки были окрашены серебром.

Одной из основных проблем анализа ВКМ является присутствие большого количества полимерных белков, таких как коллагены, и белково-полисахаридных соединений (протеогликаны и гликопротеины). Эти соединения, взаимодействуя между собой, образуют сети, кото-

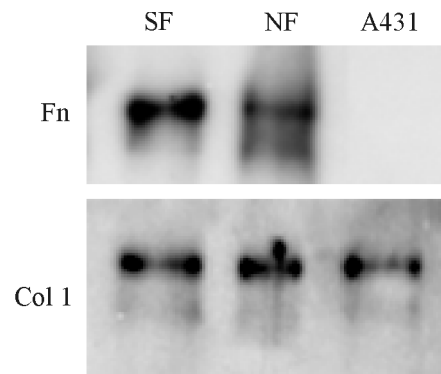


Рис. 4. Иммуноблот белков ВКМ с антителами к фибронектину (Fn) и коллагену I (Col 1).

NF и SF — белки ВКМ нормальных и рубцовых фибробластов соответственно, A431 — белки ВКМ клеток линии A431.

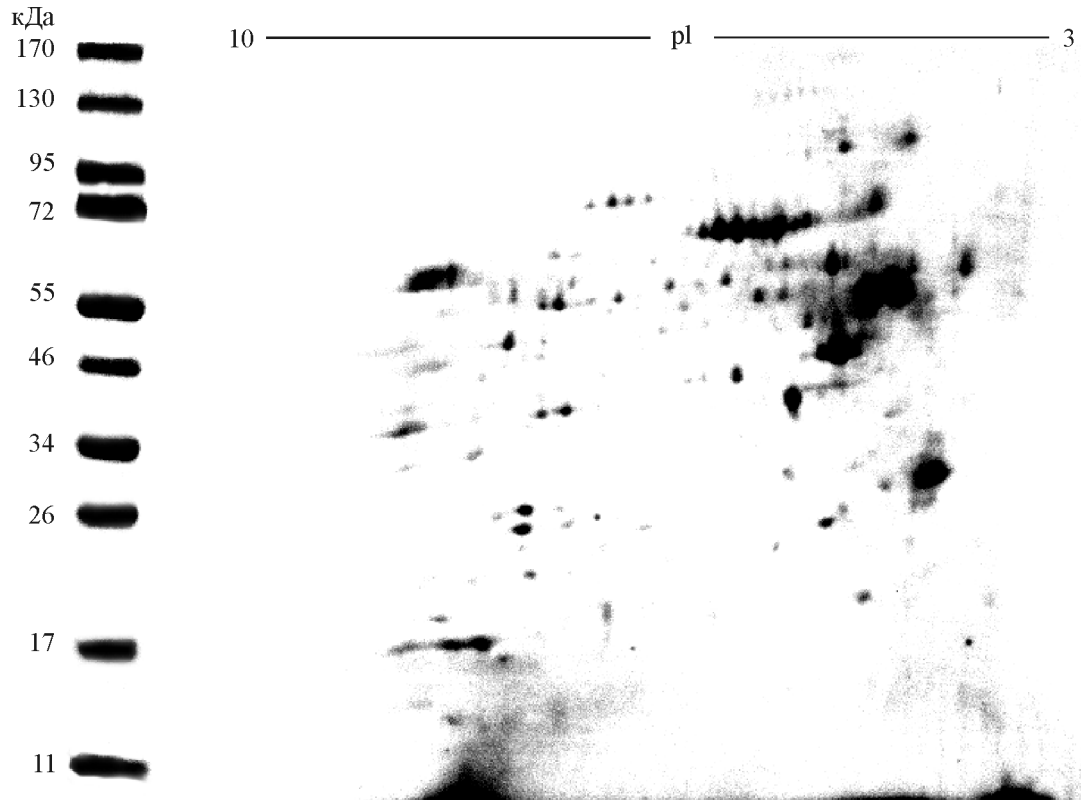


Рис. 5. Электрофореграмма белков ВКМ клеток линии А431.

Белки были фракционированы с помощью двумерного геля-электрофореза и окрашены Кумасси.

рые мешают фракционированию белков в процессе электрофореза и дальнейшему анализу электрофореграмм. Для максимальной денатурации присутствующих в матриксе белков мы применили ряд последовательных экстракций различными денатурирующими агентами (см. раздел «Материал и методика»). Полученные препараты были проанализированы с помощью SDS геля-электрофореза (рис. 1). На рис. 1 видно, что при помощи разработанного метода получили белки матрикса, синтезируемые клетками в культуре, в количестве, достаточном для их визуализации методом серебрения и успешного разделения в полиакриламидном геле.

Получив фракции белков ВКМ, нужно было убедиться, что полученный материал не загрязнен клеточными белками. Для этого белки разделяли при помощи денатурирующего геля-электрофореза с последующим переносом белков на мембрану PVDF, и затем методом Вестерн-блоттинга определяли взаимодействие данных белков с антителами против PCNA (proliferating cell nuclear antigen) — белка, участвующего в синтезе и репарации ДНК и отличающегося высоким уровнем экспрессии. Результаты Вестерн-блоттинга, приведенные на рис. 2, свидетельствуют о том, что эти антитела взаимодействуют только с клеточным лизатом (2) и не взаимодействуют с

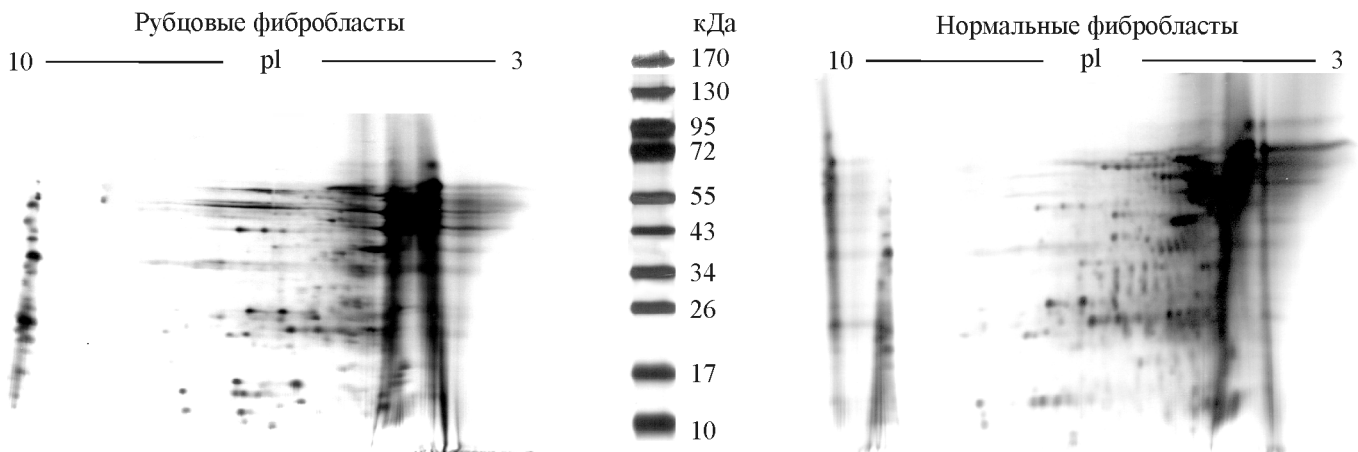


Рис. 6. Электрофореграмма белков ВКМ рубцовых и нормальных фибробластов.

Белки были фракционированы с помощью двумерного геля-электрофореза и окрашены серебром.

белками матрикса клеток А431 (1). Эти данные подтверждают, что полученные препараты ВКМ не содержат клеточного материала и являются внеклеточными белками.

На рис. 3 представлены электрофореграммы разделения белков матрикса, синтезируемого клетками А431, фибробластами из нормальной кожи и рубцовой ткани, в ПААГ (градиентный гель 8—16 %). Проанализировали как полный состав белков матрикса, так и две отдельные фракции: растворимую и не растворимую в Тритоне Х-100. Полученные данные говорят о том, что белковый состав ВКМ клеток А431, нормальных и рубцовых фибробластов различен. Тритон-растворимые фракции также имеют разный набор белков.

Для подтверждения правильности наших предположений относительно эффективности разработанного метода выделения белков ВКМ мы проверили взаимодействие белков матрикса с антителами против коллагена 1 и фибронектина. Данные Вестерн-блоттинга приведены на рис. 4. Результаты свидетельствуют о том, что полученные нами препараты действительно содержат основные белки матрикса. При этом степень ответа на антитела против коллагена 1 примерно одинакова в матриксе всех исследуемых клеток. Гидролиз фибрилл коллагена 1, вероятнее всего, имел место в процессе обработки материала в течение ночи в 5%-ной уксусной кислоте при 4 °С. Этот этап получения белков ВКМ был введен в связи с тем, что гидролиз фибриллярных коллагенов необходим для наиболее полной экстракции матрикса.

При взаимодействии антител к фибронектину с белками матрикса нормальных и рубцовых фибробластов был получен четкий ответ на уровне 130—170 кДа. В то же время белки ВКМ клеток линии А431 не взаимодействуют с антителами к фибронектину. Есть мнение (Boudreau, Bissell, 1998; Ruoslahti, 1999) о том, что у раковых клеток наблюдаются повышенная адгезия к фибронектину и аномальная активация соответствующих интегринных рецепторов, что связано с их способностью к метастазированию. Возможно, отсутствие фибронектина среди белков, секретируемых в ВКМ клетками А431, связано с названными нарушениями. Фибронектин является мультифункциональным белком и взаимодействует с такими важными компонентами ВКМ, как коллаген, фибрин и гепарин, а также со специфическими рецепторами мембран. Активация фибронектином интегринных рецепторов ведет к стимуляции сигнальных путей, которые способствуют прикреплению, миграции и дифференцировке клеток. Эти характеристики позволяют фибронектину играть важную роль в клеточной адгезии и передаче сигналов между клетками и компонентами матрикса (Grinnell et al., 1992).

С целью проверки пригодности разработанного метода для исследования белков матрикса, синтезируемого клетками в культуре, протеомными методами мы проанализировали полученные белки ВКМ двумерным электрофорезом. Результаты фракционирования белков ВКМ клеток А431 представлены на рис. 5. На рис. 5 видно, что белки ВКМ, полученные разработанным нами методом, четко разделяются по изоэлектрической точке и молекулярной массе. При этом их количество достаточно для визуализации с помощью Кумасси, что делает потенциально возможным последующую идентификацию отдельных белков методами масс-спектрометрии. Проведенное сравнение белкового состава матрикса нормальных и рубцовых фибробластов (рис. 6) продемонстрировало различия между ними, особенно хорошо заметное в низкомолекулярной области (10—50 кДа). В этой области в матрик-

се рубцовых фибробластов появляются дополнительные белки по сравнению с нормальными фибробластами. С другой стороны, в области более высоких молекулярных масс в матриксе нормальных фибробластов белков значительно больше, чем в матриксе рубцовых. Эти данные могут оказаться важными для изучения формирования структуры кожной ткани, и в дальнейших исследованиях внимание будет обращено на идентификацию отдельных белков.

Результаты данного исследования показали, что разработанный метод получения белков ВКМ позволяет сравнивать полный комплекс белков ВКМ, синтезируемых клетками разных типов в культуре, и дает возможность анализировать отдельные его компоненты протеомными методами. Нами были показаны кардинальные различия между матриксами трансформированных клеток А431 и дермальных фибробластов. Также были обнаружены и более тонкие различия по белкам ВКМ фибробластов из нормальной и рубцовой кожной ткани. Последующая идентификация конкретных белков ВКМ может дать информацию для поиска ключевых компонентов матрикса, необходимых для нормального развития кожной ткани и предотвращения патологических изменений.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и программы Visby Шведского института.

#### Список литературы

- Bornstein P., Sage E.H. 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 : 608—616.
- Boudreau N., Bissell M.J. 1998. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 : 640—646.
- Cunningham L.W. 1987. *Methods in enzymology*. Vol. 144. Structural and contractile proteins. Pt D: Extracellular matrix.
- Daley W.P., Peters S.B., Larsen M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.* 121 : 255—264.
- Deepa S.S., Carulli D., Galtrey C., Rhodes K., Fukuda J., Mikami T., Sugahara K., Fawcett J.W. 2006. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 281 : 17 789—17 800.
- Grinnell F., Ho C.H., Wysocki A. 1992. Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *J. Invest. Dermatol.* 98 : 410—416.
- Grünert M., Dombrowski C., Sadasivam M., Manton K., Cool S.M., Nurcombe V. 2007. Isolation of a native osteoblast matrix with a specific affinity for BMP2. *J. Mol. Histol.* 38 : 393—404.
- Hedman K., Kurkinen M., Alitalo K., Vaheri A., Johansson S., Höök M. 1979. Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. *J. Cell Biol.* 81 : 83—91.
- Laemmlis U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Ruoslahti E. 1999. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv. Cancer Res.* 76 : 1—20.
- Sampath T.K., Muthukumar N., Reddi A.H. 1987. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84 : 7109—7113.
- Stupack D.G., Cheresh D.A. 2007. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115 : 3729—3738.

## ANALYSIS OF EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS PRODUCED BY CULTURED CELLS

*L. V. Turoverova,<sup>1,\*</sup> M. G. Khotin,<sup>1</sup> N. M. Yuditseva,<sup>1</sup> K.-E. Magnusson,<sup>2</sup> M. I. Blinova,<sup>1</sup>  
G. P. Pinaev,<sup>1</sup> D. G. Tentler<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,

and <sup>2</sup> Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine, Sweden;

\* e-mail: lvtur@mail.ru; dtentler@mail.ru

Extracellular matrix (ECM) is a highly organized multimolecular structure essential for vital function of any organism. Although a lot of data on the extracellular matrix components has been accumulated, an isolation of the entire set of these proteins still remains to be a complex procedure since ECM contains fibrillar proteins and proteoglycans, which form multidomain net-like structures. In the presented study, we developed a method for isolation of ECM proteins from cell cultures. Human epidermoid carcinoma cells A431 and fibroblasts obtained from normal and scar human skin were used. We showed that EDTA solution removed cells from culture plates without destroying the cell membrane. Following treatment of remaining ECM proteins with acetic acid in order to dissociate collagen fibrils significantly improved fractioning of ECM proteins. Extraction of the remained proteins from culture plate surface was preformed using a buffer developed on the basis of Laemmli probe buffer. With this method, we isolated ECM proteins synthesized by culturing cells and suitable for a future analysis by SDS PAGE and two-dimentional electrophoresis as well as for identification of individual proteins by mass-spectrometry. This study may allow comparing protein contents of ECMs isolated from different sources, and elucidate influences of various proteins on the protein and the properties of extracellular matrix of investigated cells.

Key words: extracellular matrix, fibroblasts, collagen, fibronectin.

---