

## ВЛИЯНИЕ ТРИПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА КОЛЛАГЕНА (GER) НА АДГЕЗИЮ И РАСПЛАСТЫВАНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЗАВИСИТ ОТ СВОЙСТВ АДГЕЗИВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

© В. П. Иванова,<sup>1, \*</sup> З. В. Ковалева,<sup>2</sup> В. В. Анохина,<sup>3</sup> А. И. Кривченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург,*

<sup>2</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,*

<sup>3</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет;*

\* *электронный адрес: valet@iephb.ru*

Изучено влияние трипептидного фрагмента коллагена GER на процессы прикрепления и распластывания эмбриональных фибробластов мыши линии STO к различным субстратам — полистироловому пластику и иммобилизованным на пластике поли-L-лизину, фибронектину или желатину. Установлено, что трипептид GER участвует в регуляции адгезии и распластывания фибробластов. При этом величина воздействия трипептида на клеточный ответ зависит как от способа внесения трипептида в культуральную среду, так и от типа используемого субстрата. При соинкубации фибробластов с трипептидом наблюдалась стимуляция адгезии и распластывания клеток на необработанном пластике и пластике, покрытом фибронектином или желатином. В то же время трипептид не изменяет клеточную адгезию на иммобилизованном поли-L-лизине. Предварительная обработка клеток трипептидом приводила к частичному ингибированию адгезии и распластывания фибробластов на фибронектине и желатине. Показано, что степень активации и ингибирования трипептидом адгезионных процессов на иммобилизованном фибронектине была выше, чем на иммобилизованном желатине. Полученные результаты свидетельствуют о сочетанном влиянии регуляторной активности трипептида GER (проявление которой зависело как от использованной дозы трипептида, так и от способа его внесения в питательную среду) и особенностей строения субстрата на протекание адгезии и распластывания эмбриональных фибробластов. Особенности строения субстрата определяются наличием в нем полимеров стирола и L-лизина, белков внеклеточного матрикса в нативной (фибронектин) или частично денатурированной (желатин) форме. Обсуждаются основные мишени, на которые может влиять трипептид GER при формировании взаимодействий клетки с субстратом.

Ключевые слова: трипептидный фрагмент коллагена, адгезия, распластывание, фибронектин, желатин, поли-L-лизин, полистирол, эмбриональные фибробласты.

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, DDR — discoidin domain receptor, GPVI — glycoprotein VI, SPARC — secreted protein, acidic, rich in cystein.

Адгезия клеток к окружающим их поверхностям относится к древнейшим биологическим явлениям, присущим всем формам жизни, начиная с одноклеточных и заканчивая многоклеточными организмами (Hynes, Zhao, 2000; Coates, Harwood, 2001; Sebé-Pedrós et al., 2010). По мере эволюционного развития живых организмов происходило усложнение строения адгезивных структур, обеспечивающих формирование контактов как между соседними клетками, так и между клетками и внеклеточным матриксом (ВКМ). Совершенствование адгезивных систем происходило в направлении создания, с одной стороны, высокоупорядоченных структур у участников клеточной адгезии, с другой — сложных многокомпонентных адгезивных систем, координируемых деятельностью различных генов и специфических регуляторных факторов.

Необходимой предпосылкой для прогрессивного развития клеточных адгезивных процессов явилась способность белков взаимодействовать друг с другом. В основе белок-белковых взаимодействий лежит принцип до-

менной организации белковых молекул, когда в первичной структуре полипептидов обособлялись различные по строению фрагменты, выполняющие определенную структурную или функциональную роль (Bornberg-Bauer et al., 2005; Pereira-Leal et al., 2006).

Практически все белки ВКМ благодаря наличию в их последовательностях белоксвязывающих доменов или модулей способны взаимодействовать с различными полипептидами (Kadler et al., 2008; Leiss et al., 2008). Коллаген, являющийся структурным компонентом ВКМ, может взаимодействовать не только с белками ВКМ (фибронектином, ламинином, SPARC и др.), но и со специфическими клеточными рецепторами — интегринами, тирозинкиназными рецепторами с дискоидиновыми доменами (DDR), гликопротеином VI (GPVI) и др. (Heino, 2007; Leitinger, Hohenester, 2007; Egeblad et al., 2010). Имеются свидетельства о наличии в молекулах коллагенов пептидных доменов, которые обеспечивают связывание коллагена со специфическими модулями белков (Sweeney et al.,

2008). При этом подобные места связывания в молекулах коллагенов могут находиться в коллагеновых доменах или в нативном состоянии (в форме тройной спирали), как например GXOGER-содержащие пептидные фрагменты (Knight et al., 2000; Siljander et al., 2004; Kim et al., 2005), или скрытом виде, как RGD-содержащие участки, свойства которых могут проявляться только после денатурации тройной спирали коллагеновых молекул (Pfaff et al., 1993). В процессах рецепторного связывания могут участвовать не только коллагеновые модули, но также и неколлагеновые (НК1) домены, наиболее изученными из которых являются НК1-домены коллагенов типа IV — аррестин (лиганд  $\alpha_1\beta_1$ -интегрина), канстатин (лиганд интегринов  $\alpha_5\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_5$  и  $\alpha_3\beta_1$ ) и тумстатин (лиганд интегринов  $\alpha_5\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_1$  и  $\alpha_6\beta_1$ ) (Mundel, Kalluri, 2007; Sudhakar, Vossani, 2008). Кроме доменов, связывающихся с белками с рецепторной или нерцепторной функцией, коллагены содержат пептидные модули, которые не участвуют в междоменном узнавании и физиологическая активность которых проявляется только после их высщепления в ходе неполного протеолиза коллагеновых молекул в процессе ремоделирования ВКМ.

Проведенные ранее исследования позволили нам выявить в первичной структуре  $\alpha$ -цепей различных типов коллагенов многократно повторяющийся трипептид GER (ТП-GER), обладающий способностью регулировать адгезионные свойства эпителиоподобных клеток (Иванова и др., 2008). Поскольку регуляторная активность пептидов зависит как от типа культивируемых клеток, так и от условий их микроокружения, в представленной работе исследовали влияние ТП-GER на адгезию и распластывание фибробластов на субстратах с различными свойствами.

### Материал и методика

Объектом исследования служили эмбриональные фибробласты мыши линии STO, полученной из коллекции культур США (American Type Culture Collection, ATCC).

Для проведения экспериментов клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Клетки, достигшие монослоя, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, Sigma, США) и суспендировали в питательной среде без сыворотки или с добавлением сыворотки.

Влияние ТП-GER, синтезированного на кафедре химии природных соединений СПбГУ, на адгезию клеток линии STO оценивали по описанному ранее методу (Иванова и др., 2008). Клетки инкубировали с ТП-GER (в концентрации от 10<sup>-10</sup> до 10<sup>-5</sup> М) или без него. ТП-GER вносили в клеточную суспензию или непосредственно перед постановкой реакции, или за 30 мин до высева клеток. Преинкубацию клеток проводили в неполной питательной среде при 37 °С. После добавления сыворотки (10 %) в инкубационную среду клетки (10<sup>6</sup>/мл) переносили в 96-луночные планшеты (Corning, США), обработанные или необработанные раствором желатина (20 мкг/мл в PBS, 18 ч при 4 °С, здесь и далее), фибронектина (10 мкг/мл) или поли-L-лизина (0.01 %), и выдерживали их 1 ч при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым.

Процесс распластывания клеток изучали на чашках Петри (Corning, США), покрытых или не покрытых раствором желатина или фибронектина (см. выше), в которые и вносили клетки (2 · 10<sup>5</sup>/мл) в питательной среде с добавлением 0.2 % сыворотки. В зависимости от цели эксперимента: 1) клетки преинкубировали (30 мин при 37 °С) с ТП-GER в концентрации от 10<sup>-10</sup> до 10<sup>-5</sup> М в неполной среде, после чего в нее добавляли сыворотку (0.2 %), или 2) ТП-GER вносили в клеточную суспензию непосредственно перед постановкой реакции. После этого клетки выдерживали 45 мин при 37 °С. Подсчет клеток проводили после их фиксации под микроскопом Axiovert 40C (Carl Zeiss, Германия). Распластанной считали клетку с выраженными отростками, нераспластанной — клетку округлой формы. Учитывали долю клеток с распластанным морфотипом.

При статистической обработке результатов использовали критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В качестве твердой поверхности, на которой исследовали протекание клеточной адгезии, использовали полистироловый пластик в исходном состоянии или покрытый поли-L-лизином (синтетическим поликатионом), фибронектином (белком ВКМ) или желатином (частично денатурированным коллагеном). ТП-GER вносили в клеточную суспензию непосредственно перед постановкой реакции, т. е. фибробласты соинкубировали с ТП-GER.

Согласно данным, представленным на рис. 1, ТП-GER увеличивает количество прикрепившихся клеток к необработанной пластиковой поверхности приблизительно на 30 % в диапазонах концентраций 10<sup>-10</sup>—10<sup>-9</sup> ( $P < 0.05$ ) и 10<sup>-6</sup>—10<sup>-5</sup> М ( $P < 0.05$ ) при соинкубации фибробластов с ТП-GER.

Показано, что ТП-GER практически не влиял на клеточную адгезию к иммобилизованному синтетическому поликатиону при всех исследованных концентрациях, но значительно увеличивал число прикрепившихся клеток к пластиковой поверхности, обработанной желатином или фибронектином (рис. 1). Интересно отметить, что вызванный ТП-GER эффект стимулирования клеточной адгезии на иммобилизованном желатине был значительно ниже такового на необработанном пластике и не зависел от величины действующих концентраций исследуемого трипептида. В случае адгезии фибробластов к иммобилизованному фибронектину наблюдались два максимума активности исследуемого ТП-GER, при этом во всем диапазоне изученных концентраций ТП-GER стимулировал клеточную адгезию. Стимулирующий эффект ТП-GER на адгезию клеток к иммобилизованному фибронектину достигал своего максимума при концентрациях 10<sup>-9</sup> и 10<sup>-5</sup> М ( $P < 0.01$ ), при этом доля прикрепившихся клеток возрастала соответственно на 46 и 37 % (рис. 1). Сужение пиков-максимумов в распределении зависимости эффект-доза в последнем случае, а также более высокие максимальные значения по сравнению с таковыми, полученными при прикреплении клеток к необработанной полистироловой поверхности, могут свидетельствовать в пользу проявления ТП-GER более выраженного стимулирующего эффекта на адгезионную способность фибробластов при высева их на пластик, покрытый фибронектином.

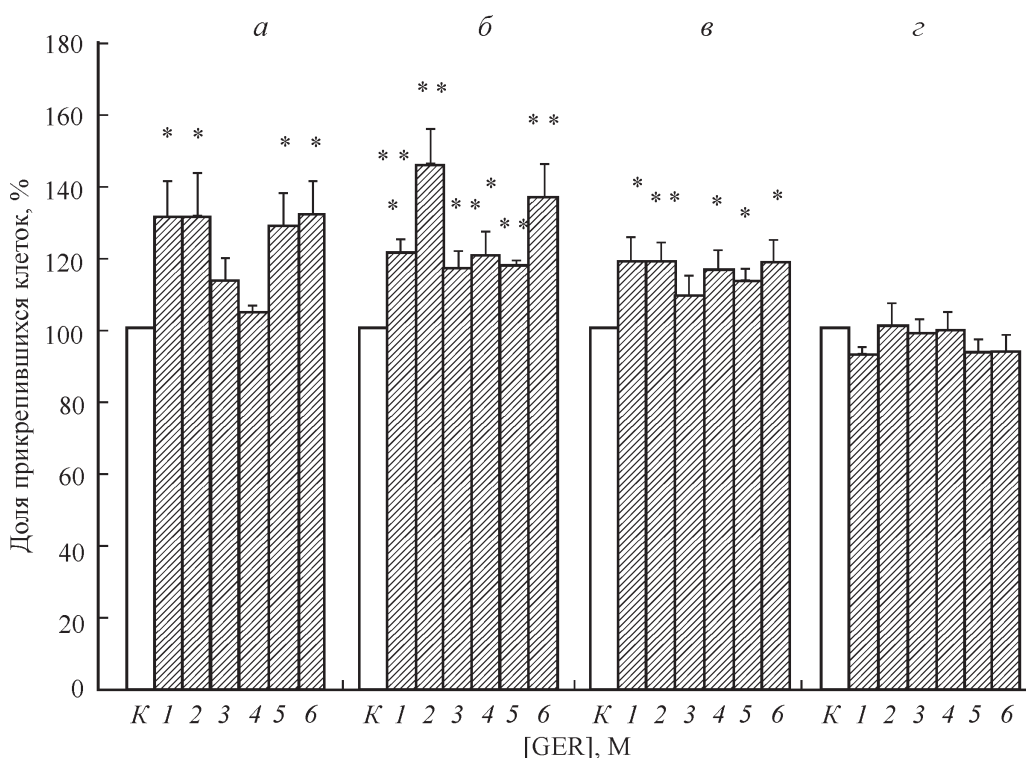


Рис. 1. Изменение уровня адгезии эмбриональных фибробластов к различным субстратам при соинкубации клеток с трипептидом GER.

Концентрация ТП-GER (М): К— контроль, 1—  $10^{-10}$ , 2—  $10^{-9}$ , 3—  $10^{-8}$ , 4—  $10^{-7}$ , 5—  $10^{-6}$ , 6—  $10^{-5}$ . а — необработанный пластик; б — пластик, покрытый фибронектином; в — пластик, покрытый желатином; з — пластик, покрытый поли-L-лизинном. ТП-GER вносили в полную среду непосредственно перед постановкой реакции. Достоверность отличий от контроля отмечена одной ( $P < 0.05$ ), двумя ( $P < 0.01$ ) или тремя ( $P < 0.001$ ) звездочками. Представлены данные 4—5 экспериментов.

Из полученных данных следует, что ТП-GER не оказывает влияния на прикрепление клеток к синтетическому поли-L-лизину. Взаимодействие клеток с поликатионом, как известно, осуществляется преимущественно посредством формирования неспецифических электростатических связей между свободными аминогруппами лизиновых остатков полимера и фосфатными группами молекул фосфолипидов, формирующих липидный бислой клеточных мембран (Reuter et al., 2009).

Отсутствие у ТП-GER влияния на процесс формирования взаимодействий поликатиона с клеточными мембранами, вероятно, обусловлено свойством полиэлектролитов вступать в кооперативные взаимодействия при наличии в биосистемах соответствующих структур (Кантор, Шиммель, 1985), в данном случае доменов, сформированных полярными фосфолипидами. По-видимому, столь малые регуляторные формы, как короткие пептиды, не могут ощутимо изменить характеристики взаимодействующих активных групп молекул поликатиона и фосфолипидов клеточных мембран. Это связано, во-первых, с монотонным характером распределения в молекуле поликатиона имеющихся реакционных групп, участвующих в образовании электростатических связей; во-вторых, само явление кооперативности обуславливает ускорение протекания основной, более энергетически выгодной, химической реакции, исключая тем самым возможность осуществления других процессов, в данном случае — взаимодействия ТП-GER как с полимерным носителем, так и с компонентами клеточных мембран.

Установлено также, что ТП-GER участвует в регуляции ВКМ-опосредованной адгезии фибробластов. Изме-

стно, что белки ВКМ (фибронектин, коллагены, витронектин, ламинины и др.) являются специфическими лигандами интегриновых рецепторов, которые, связываясь с белками ВКМ, способствуют прикреплению клеток к субстрату (Van der Flier, Sonnenberg, 2001; Hynes, 2002; Humphries et al., 2006).

Обнаруженный эффект усиления адгезии фибробластов к иммобилизованному желатину или фибронектину после высева на субстрат клеток сразу же после добавления в клеточную суспензию ТП-GER, по-видимому, обусловлен активацией интегриновых рецепторов. Возможно, ТП-GER в указанных условиях действует на инициальных этапах прикрепления клеток к субстрату. Взаимодействуя с определенными участками молекулы рецептора, ТП-GER может ускорять процессы перехода рецепторных молекул из свернутого (неактивного) состояния в развернутое (активное) состояние (Luo, Springer, 2006; Takagi, 2007). При этом головной домен внеклеточной области интегриновых молекул быстрее приобретает необходимую пространственную ориентацию во внеклеточном пространстве, поэтому сайты связывания рецепторов быстрее становятся доступными для ассоциации с лигандами (пептидными модулями желатина или фибронектина).

Кроме того, активация процессов адгезии фибробластов под действием ТП-GER может быть обусловлена ускорением конформационной подстройки поверхностных участков  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, формирующих сайты узнавания интегринов. Скорее всего, ТП-GER взаимодействует аллостерически через вторичные или третичные центры связывания, которые можно обозначить как доме-



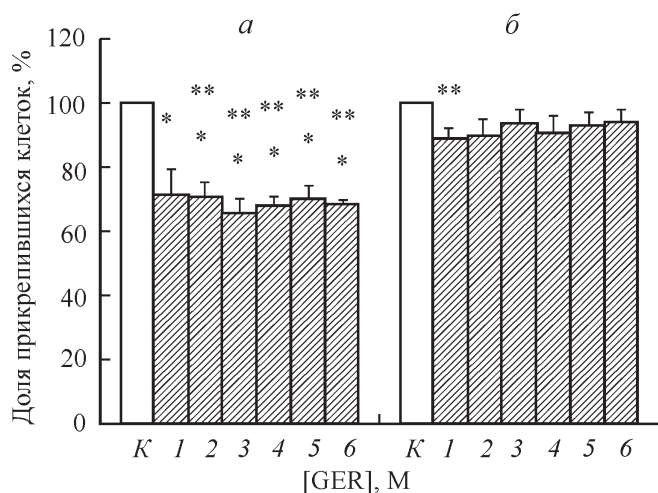


Рис. 2. Изменение уровня адгезии эмбриональных фибробластов на фибронектине и желатине после преинкубации клеток с трипептидом GER.

Предварительную инкубацию клеток с ТП-GER проводили в среде без сыворотки при 37 °С в течение 30 мин, после чего в питательную среду вносили сыворотку (10 %). Клетки сеяли на пластик, покрытый фибронектином (а) или желатином (б). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Представлены данные 4—6 экспериментов.

ны конформационной подстройки первичных центров связывания. По-видимому, такие домены конформационной подстройки не обладают высокой специфичностью связывания, но, вероятнее всего, содержат остатки разноименно заряженных аминокислот. При взаимодействии ТП-GER с такими модулями может происходить частичная нейтрализация заряда (или положительного, или отрицательного) на локальном участке рецептора, что приведет к местному изменению конфигурации интегрина молекулы и не может не сказаться на функциональной активности рецептора. Активация процессов лиганд-связывания под действием ТП-GER, в свою очередь, приведет к увеличению скорости создания кластеров интегринов и укрупнению этих кластеров, что, безусловно, будет способствовать росту адгезионной способности клеток.

Согласно исследованиям последних лет, часть интегрина рецепторов может взаимодействовать с RGD-содержащими пептидными фрагментами, входящими в состав таких компонентов ВКМ, как фибронектин, частично денатурированный коллаген или витронектин (Ruoslahti, 1996; Plow et al., 2000). В ряде работ для выявления сайтов связывания в молекулах интегринов проводили предварительную инкубацию клеток с RGD-содержащими пептидами, а также другими пептидами — миметиками ВКМ — с последующим высевом клеток на твердую поверхность, покрытую тем или иным белком ВКМ (Knight et al., 2000; Gigout et al., 2008; Eisenberg et al., 2009; Zannetti et al., 2009). Наличие мест связывания лигандов с интегринами рецепторами фиксировали по ингибированию адгезионной способности клеток в условиях эксперимента.

В связи с вышеизложенным на следующем этапе мы изучали влияние на клеточную адгезию 30-минутной инкубации суспендированных фибробластов с ТП-GER до высева их на иммобилизованный фибронектин или желатин. Оказалось, что после предварительной обработки клеток ТП-GER количество прикрепившихся клеток к пластиковой поверхности, покрытой как желатином, так

и фибронектином, уменьшалось (рис. 2). Интересно отметить, что и в этих экспериментальных условиях интенсивность клеточного ответа на действие ТП-GER при прикреплении фибробластов к желатину была существенно ниже таковой при высева клеток на иммобилизованный фибронектин. Так, число прикрепившихся клеток к иммобилизованному желатину сокращалось на 11 % ( $P < 0.05$ ) при наименьшей из исследованных концентраций ТП-GER, в то время как при высева клеток на иммобилизованный фибронектин этот показатель уменьшался приблизительно на 30 % ( $P < 0.01/P < 0.05$ ) при всех изученных концентрациях ТП-GER.

Различная степень ингибирования клеточной адгезии к желатину и к фибронектину после предварительной обработки суспендированных фибробластов ТП-GER может свидетельствовать о вовлечении различных интегрина рецепторов в процесс регуляции исследованным трипептидом клеточной адгезии на разных субстратах. Известно, например, что фибронектин может взаимодействовать с такими RGD-связывающими интегринами рецепторами, как  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_5$ ,  $\alpha_V\beta_6$  и  $\alpha_V\beta_8$  (Van der Flier, Sonnenberg, 2001; Pankov, Yamada, 2002; Takada et al., 2007), а денатурированный коллаген — только с  $\alpha_5\beta_1$ - и  $\alpha_V\beta_3$ -интегринами (Pfaff et al., 1993; Plow et al., 2000; Heino, 2007). Имеются данные об экспрессии эмбриональными фибробластами таких интегринов, как  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  и  $\alpha_V\beta_5$  (Bates et al., 1991; Plow et al., 2000). Тогда при высева эмбриональных фибробластов на иммобилизованный фибронектин могут активироваться все перечисленные типы интегрина рецепторов, а при высева клеток на желатин — только два из них ( $\alpha_5\beta_1$  и  $\alpha_V\beta_3$ ).

Для того чтобы произошла полноценная дифференцировка клеток, необходимым условием является не только прикрепление клеток к ВКМ, но и их распластывание на субстрате, свойства которого, как известно, определяют особенности протекания клеточного распластывания (Thodeti et al., 2003; Zemljic et al., 2007). В связи с этим исследовали влияние ТП-GER на процессы распластывания клеток на твердой поверхности. В качестве субстратов использовали необработанный культуральный пластик, а также иммобилизованные на пластике желатин и фибронектин. Эксперименты проводили по той же схеме, как и при изучении роли ТП-GER в регуляции клеточной адгезии. На первом этапе ТП-GER вносили в клеточную суспензию непосредственно перед постановкой реакции, на втором — за 30 мин до высева клеток на тот или иной субстрат.

Установлено, что при внесении ТП-GER в клеточную суспензию непосредственно перед постановкой реакции ТП-GER увеличивает количество распластанных клеток как на необработанном пластике, так и на поверхности, покрытой обоими белками ВКМ (рис. 3). Оказалось, что ТП-GER стимулировал протекание процесса распластывания фибробластов на неизменной полистироловой поверхности в тех же диапазонах концентраций, что и в случае регуляции трипептидом клеточной адгезии на том же субстрате. При этом количество распластанных клеток возрастало в 1.15—1.27 раза при концентрации ТП-GER  $10^{-10}$ — $10^{-9}$  М ( $P < 0.01/P < 0.05$ ) и в 1.25—1.35 раза при концентрации  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М ( $P < 0.05/P < 0.01$ ). Влияние ТП-GER в ходе распластывания клеток на иммобилизованном фибронектине было менее выраженным, чем при распластывании фибробластов на необработанном пластике. ТП-GER увеличивал количество

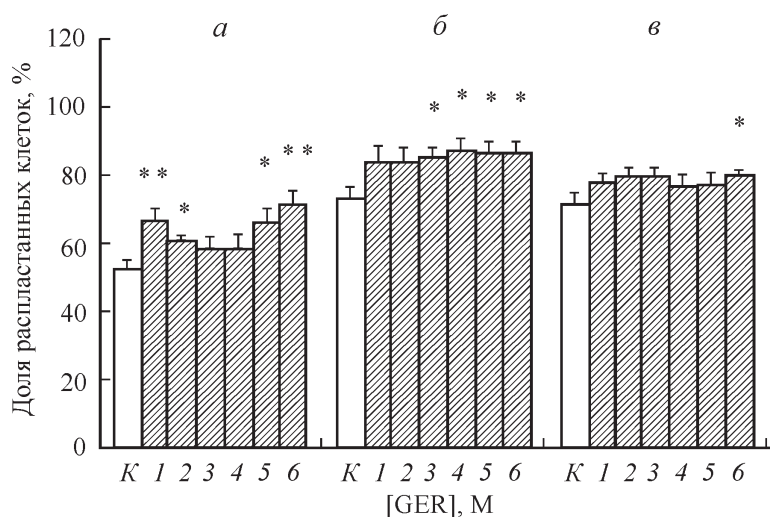


Рис. 3. Изменение степени распластывания эмбриональных фибробластов на различных субстратах при соинкубации клеток с трипептидом GER.

ТП-GER вносили в полную питательную среду (0.2 % сыворотки) непосредственно перед постановкой реакции. Клетки сеяли на необработанный (а) или покрытый фибронектином (б) и желатином (в) пластик. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Представлены данные 5—7 экспериментов.

распластанных клеток на фибронектине при концентрации от  $10^{-8}$  до  $10^{-5}$  М ( $P < 0.05$ ) в 1.17—1.19 раза по сравнению с контрольными значениями. Еще менее существенным было влияние ТП-GER в ходе распластывания клеток на пластике, обработанном желатином. На этом субстрате ТП-GER ускорял распластывание клеток только при одной из использованных концентраций —  $10^{-5}$  М ( $P < 0.05$ ).

Преинкубация фибробластов с ТП-GER в том же диапазоне концентраций приводила к уменьшению количества распластанных клеток как на желатине, так и на фибронектине (рис. 4). При этом ТП-GER ингибировал распластывание клеток на желатине при концентрации  $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М ( $P < 0.05$ ) в 1.16—1.22 раза, а на фибронектине при концентрациях  $10^{-7}$  и  $10^{-5}$  М ( $P < 0.05$ ) соответственно в 1.27 и 1.42 раза по сравнению с контролем.

Известно, что вскоре после первого контакта клеток с субстратом в местах локализации этих контактов формируются так называемые фокальные комплексы — небольшие лабильные адгезионные структуры, в состав которых входят  $\alpha_5\beta_3$ -интегрины, паксиллин, талин, винкулин и другие компоненты (Hynes, 2002; Zimerman et al., 2004). Часть фокальных комплексов подвергается разборке в ходе клеточного распластывания, а оставшиеся фокальные комплексы при определенных условиях (например, при оптимальной плотности лигандов интегриновых рецепторов) могут укрупняться, вовлекая в свой состав дополнительные белки (зиксин, тензин и  $\alpha_5\beta_1$ -интегрины), и затем формировать более зрелые фокальные контакты (Pankov et al., 2000; Mao, Schwarzbauer, 2005).

Можно предположить, что в ходе распластывания фибробластов на фибронектине после воздействия ТП-GER быстрее осуществляется переход от лабильных фокальных комплексов, в которых обычно отсутствуют  $\alpha_5\beta_1$ -интегрины, к ранним фокальным контактам, характеризующимся высоким содержанием  $\alpha_5\beta_1$ -интегринов, в отличие от распластанных на желатине клеток, соинкубированных с ТП-GER.

Адгезированные фибробласты, как известно, секретируют молекулы фибронектина, которые после укладки в фибриллы ассоциируют с  $\alpha_5\beta_1$ -интегринами (Pankov

et al., 2000; Singh et al., 2010). Связывание указанных интегринов с фибронектиновыми фибриллами, укладку которых может ускорять исследованный ТП-GER, будет способствовать не только объединению в группы уже существующих фокальных контактов, но и формированию новых адгезий. Это означает, что большее количество фокальных адгезий, образуемых клетками, обработанными ТП-GER, в единицу времени, приведет к увеличению числа распластанных фибробластов на иммобилизованном фибронектине. При высеве клеток на желатин ТП-GER также может активировать (но с меньшей интенсивностью) как процессы перехода менее устойчивых фокальных комплексов в более устойчивые фокальные контакты, так и протекание процессов фибрилlogenеза из димерных молекул фибронектина.

Не исключено также, что в ходе распластывания фибробластов на разных субстратах ТП-GER способен акти-

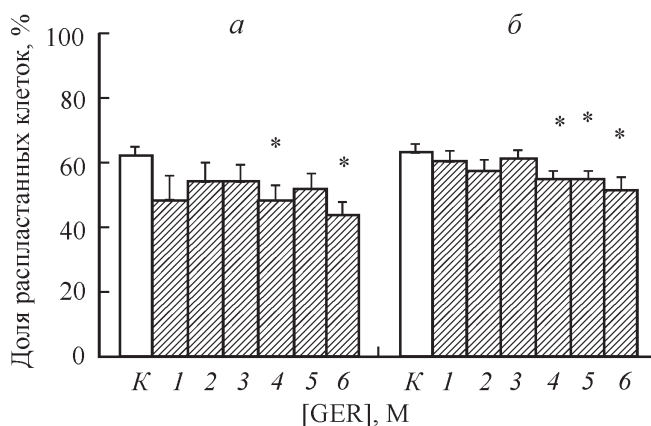


Рис. 4. Изменение степени распластывания эмбриональных фибробластов на фибронектине и желатине после преинкубации клеток с трипептидом GER.

Предварительную инкубацию клеток с ТП-GER проводили в среде без сыворотки при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, после чего в питательную среду вносили сыворотку (0.2 %). Клетки сеяли на пластик, покрытый фибронектином (а) или желатином (б). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Представлены данные 5 экспериментов.

вировать образование различающихся по составу клеточно-субстратных адгезионных структур. Так, в ходе распластывания на желатине фибробласты, обработанные ТП-GER, формируют сначала малые фокальные комплексы, активной единицей которых являются  $\alpha_v\beta_3$ -интегрины, с последующей трансформацией этих комплексов в более зрелые фокальные контакты. У клеток, распластывающихся на фибронектине в тех же условиях, сразу могут собираться крупные фокальные контакты, созреванию которых способствует включение в их состав  $\alpha_5\beta_1$ -интегринов. В результате распластывание клеток, соинкубированных с ТП-GER, будет происходить на фибронектине быстрее, чем на желатине.

При соинкубации фибробластов с ТП-GER может изменяться не только функциональная активность клеток и их компонентов, но и характеристики субстрата, с которым взаимодействуют клетки. Формирующийся ответ клеток при их распластывании зависит от плотности молекул ВКМ на твердой поверхности и пространственной организации субстратных белков (Hansen et al., 1994; Garcia et al., 1999; Irvine et al., 2002). Различная степень спирализации молекул желатина (денатурированный белок) и фибронектина (нативный белок) является одной из возможных предпосылок для образования качественно и количественно различных взаимодействий ТП-GER с разными по своим характеристикам субстратами. Деспирализованное состояние желатина обуславливает меньшую пространственную лабильность различных участков субстрата. Поэтому при взаимодействии ТП-GER с молекулами желатина существуют определенные пространственные ограничения для формирования на желатине участков с оптимальной плотностью модулей связывания с клетками.

В случае фибронектина таких ограничений нет, и взаимодействия ТП-GER с молекулами фибронектина будут более эффективны, т. е. будет увеличиваться число новых модулей, способных связываться с клетками, или активироваться функционирование уже существующих у фибронектина стационарных модулей связывания. Выявленный нами ингибирующий эффект ТП-GER на способность фибробластов распластываться на фибронектине и желатине после преинкубации клеток с этим соединением, вероятно, обусловлен его взаимодействием с определенными участками адгезивных рецепторов.

Полученные нами данные не позволяют идентифицировать участки последовательности молекул интегринов, посредством которых осуществляется связывание с ТП-GER. Вместе с тем не исключается возможность взаимодействия исследованного ТП-GER с RGD-связывающими участками определенной популяции интегринов, в результате чего происходит блокирование сайтов связывания у части рецепторов, а значит, частичное ингибирование клеточной адгезии и распластывания. Действительно, оба трипептида GER и RGD имеют некоторое сходство в строении. В состав этих соединений входят остаток глицина, остаток положительно заряженной аминокислоты — аргинина — и остаток отрицательно заряженной аминокислоты — аспарагиновой (RGD) или глутаминовой (GER) кислоты. Функционально значимыми для проявления химической реакционной способности чаще всего являются аминокислотные остатки с заряженными боковыми радикалами, в данном случае Arg и Asp/Glu (Шульц, Ширмер, 1982). Несмотря на то что расположение реакционноспособных аминокислотных остатков у трипептидов RGD и GER различается, вероятность обра-

зования электростатических связей между гуанидиновой группой и COOH-группой боковых радикалов, соответственно Arg и Glu, входящих в состав ТП-GER, с RGD-узлами последовательностями интегринов достаточно высока. Это связано с высокой конформационной подвижностью коротких пептидов в водных растворах и их способностью ввиду малых размеров приближаться на очень близкие расстояния к активным зонам рецепторных структур и формировать с ними устойчивые химические связи.

Помимо связывания ТП-GER с интегриновыми рецепторами по сайтам узнавания RGD-содержащих последовательностей в белках ВКМ не исключена также вероятность взаимодействия ТП-GER с участками интегринов, не содержащими RGD-узнающих последовательностей. Известно, например, что белки ВКМ (фибронектин и коллаген) могут взаимодействовать с интегриновыми рецепторами посредством не только RGD-содержащих доменов, но и других участков аминокислотных последовательностей. Так, фибронектин связывается с  $\alpha_5\beta_1$ - и  $\alpha_4\beta_1$ -интегринами через пептидные фрагменты PHSRN, IDAPS и KLDAPT (Mould, Humphries, 1991; Moyano et al., 1997; Feng, Mrksich, 2004), а молекулы коллагена типов I и IV — с интегринами  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$  и  $\alpha_{11}\beta_1$  посредством пентапептида GFOGER в нативной спирализованной форме (Knight et al., 2000) и дополнительно с  $\alpha_2\beta_1$ - или  $\alpha_3\beta_1$ -интегринами через пептидные фрагменты DGEA или FYFDLR (Staat et al., 1991; Underwood et al., 1995). Связываясь с подобными пептидными участками, ТП-GER может ограничивать доступ естественных лигандов к указанным сайтам взаимодействия.

В ходе ремоделирования ВКМ происходит частичная денатурация молекул коллагенов, индуцирующая освобождение пептидных сайтов (скрытых в молекулах предшественника и свернутых в пространстве), которые могут быть вовлечены в реакции связывания с интегриновыми рецепторами и формировать тем самым новые сигналы, получаемые клетками из трансформированного ВКМ. Степень деградации ВКМ, в том числе и коллагенов, может сигнализировать клетке о происходящих во внеклеточной среде процессах, таких как воспалительный и раневой процессы или опухолевая инвазия.

Любой тип повреждения ткани характеризуется функционированием протеиназ, свойства которых определяют специфику развертывания высших уровней укладки полипептидных цепей коллагена с элементами их частичного расщепления. Процесс частичной деградации коллагенов происходит постепенно, выявляя последовательно те или иные олигопептидные модули, способные в конкретных условиях микроокружения клеток взаимодействовать с определенными участками рецепторов адгезии, тем самым обеспечивая проведение сигнала об изменившихся условиях среды внутрь клетки. Получая множество подобных краткосрочных сигналов извне, клетки могут выработать векторный ответ, который позволит им либо восстановить поврежденные ткани, либо мигрировать из опасной зоны в другую, благоприятную для нормальной жизнедеятельности.

Высокий уровень повторяемости коротких пептидных фрагментов, характерный для первичной структуры коллагенов, по-видимому, является результатом тандемных дубликаций нуклеотидных последовательностей внутри предкового гена, кодирующего первичную  $\alpha$ -цепь коллагена, когда генный сегмент дублируется и копия



встраивается вслед за исходной (Yamada et al., 1980; Exposito et al., 2000). При этом однотипные модули в составе белков сохраняют частично или полностью свою древнюю исходную структурную или регуляторную функцию. В частности, если известный трипептид GPO выполняет структурную функцию в молекуле коллагенов (Van der Rest, Garrone, 1991), то изученный нами трипептидный фрагмент GER при выделении из молекулы предшественника в ходе ремоделирования коллагена может осуществлять регуляцию клеточной адгезии.

В результате проведенных исследований показано, что ТП-GER участвует в регуляции процессов адгезии и распластывания эмбриональных фибробластов линии STO. При этом величина изменения биологического эффекта под воздействием ТП-GER зависела как от способа внесения ТП-GER в культуральную среду, так и от типа используемого субстрата. При соинкубации фибробластов с ТП-GER наблюдали стимуляцию адгезии и распластывания клеток на необработанном пластике, а также на иммобилизованном желатине или фибронектине. Одновременно ТП-GER практически не влиял на клеточную адгезию на иммобилизованном поли-L-лизине. Предварительная инкубация клеток с ТП-GER приводила к частичному ингибированию адгезии и распластывания фибробластов на фибронектине и желатине. Предполагается, что ТП-GER действует на инициальных этапах прикрепления клеток к субстрату, регулируя активность интегриновых рецепторов посредством взаимодействия либо с вторичными доменами конформационной подстройки центров связывания рецепторов с лигандами (при соинкубации клеток с ТП-GER), либо непосредственно с лигандсвязывающими модулями интегринов (при преинкубации клеток с ТП-GER). Установлено также, что степень активации адгезионных процессов, наблюдаемая при соинкубации клеток с ТП-GER, на иммобилизованном фибронектине была выше таковой на иммобилизованном желатине. Возможно, этот эффект связан не только с активацией ТП-GER различных типов интегриновых рецепторов или формированием различающихся по составу и времени функционирования фокальных адгезий, но и с возможной структуризацией молекул субстрата (фибронектина или желатина) исследованным трипептидом.

#### Список литературы

- Иванова В. П., Ковалева З. В., Забелинский С. А., Гринчук Т. М., Кривченко А. И. 2008. Роль трипептидного фрагмента коллагена GER в активации адгезии и модификации жирнокислотного состава фосфолипидов мембран клеток линии СНО-К1. Цитология. 50 (4): 309—316.
- Кантор Ч., Шиммель П. 1985. Биофизическая химия. М.: Мир. 3, 536 с.
- Шульц Г., Ширмер Р. 1982. Принципы структурной организации белков. М.: Мир. 360 с.
- Bates R. C., Rankin L. M., Lucas C. M., Scott J. L., Krissansen G. W., Burns G. F. 1991. Individual embryonic fibroblasts express multiple  $\beta$  chains in association with the  $\alpha$ v integrin subunit. Loss of  $\beta$ 3 expression with cell confluence. J. Biol. Chem. 266: 18 593—18 599.
- Bornberg-Bauer E., Beaussart F., Kummerfeld S. K., Teichmann S. A., Weiner J. 2005. The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. Cell. Mol. Life Sci. 62: 435—445.
- Coates J. C., Harwood A. J. 2001. Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. J. Cell Sci. 114: 4349—4358.
- Egeblad M., Rasch M. G., Weaver V. M. 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. Curr. Opin. Cell Biol. 22: 697—706.
- Eisenberg J. L., Piper J. L., Mrksich M. 2009. Using self-assembled monolayers to model cell adhesion to the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> type III domains of fibronectin. Langmuir. 25: 13 942—13 951.
- Exposito J. Y., Cluzel C., Lethias C., Garrone R. 2000. Tracing the evolution of vertebrate fibrillar collagens from an ancestral  $\alpha$  chain. Matrix Biol. 19: 275—279.
- Feng Y., Mrksich M. 2004. The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism. Biochemistry. 43: 15 811—15 821.
- Garcia A. J., Vega M. D., Boettiger D. 1999. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. Mol. Biol. Cell. 10: 785—798.
- Gigout A., Jolicoeur M., Nelea M., Raynal N., Farndale R., Buschmann M. D. 2008. Chondrocyte aggregation in suspension culture is GFOGER-GPP- and  $\beta$ 1 integrin-dependent. J. Biol. Chem. 283: 31 522—31 530.
- Hansen L. K., Mooney D. J., Vacanti J. P., Ingber D. E. 1994. Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth. Mol. Biol. Cell. 5: 967—975.
- Heino J. 2007. The collagen family members as cell adhesion proteins. BioEssays. 29: 1001—1010.
- Humphries J. D., Byron A., Humphries M. J. 2006. Integrin ligands at a glance. J. Cell Sci. 119: 3901—3903.
- Hynes R. O. 2002. Integrins. Bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 110: 673—687.
- Hynes R. O., Zhao Q. 2000. The evolution of cell adhesion. J. Cell Biol. 150: 89—95.
- Irvine D. J., Hue K. -A., Mayes A. M., Griffith L. G. 2002. Stimulation of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. Biophys. J. 82: 120—132.
- Kadler K. E., Hill A., Canty-Laird E. G. 2008. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. Curr. Opin. Cell Biol. 20: 495—501.
- Kim J. K., Xu Y., Xu X., Keene D. R., Gurusiddappa S., Liang X., Wary K. K., Höök M. 2005. A novel binding site in collagen type III for integrins  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 $\beta$ 1. J. Biol. Chem. 280: 32 512—32 520.
- Knight C. G., Morton L. F., Peachey A. R., Tuckwell D. S., Farndale R. W., Barnes M. J. 2000. The collagen-binding A-domains of integrins  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. J. Biol. Chem. 275: 35—40.
- Leiss M., Beckmann K., Girós A., Costell M., Fässler R. 2008. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly *in vivo*. Curr. Opin. Cell Biol. 20: 502—507.
- Leitinger B., Hohenester E. 2007. Mammalian collagen receptors. Matrix Biol. 26: 146—155.
- Luo B. H., Springer T. A. 2006. Integrin structure and conformational signaling. Curr. Opin. Cell Biol. 18: 579—586.
- Mao Y., Schwarzbauer J. E. 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. Matrix Biol. 24: 389—399.
- Mould A. P., Humphries M. J. 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 in the CO-OH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. EMBO J. 10: 4089—4095.
- Moyano J. V., Carnemolla B., Dominguez-Jimenez C., Garcia-Gila M., Albar J. P., Sanchez-Aparicio P., Leprini A., Querze G., Zardi L., Garcia-Pardo A. 1997. Fibronectin type III 5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrins. J. Biol. Chem. 272: 24 832—24 836.
- Mundel T. M., Kalluri R. 2007. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. Microvascul. Res. 74: 85—89.
- Pankov R., Cukierman E., Katz B. -Z., Matsumoto K., Lin D. C., Lin S., Hahn C., Yamada K. M. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. J. Cell Biol. 148: 1075—1090.

- Pankov R., Yamada K. M. 2002. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115 : 3861—3863.
- Pereira-Leal J. B., Levy E. D., Teichmann S. A. 2006. The origin and evolution of functional modules: lessons from protein complexes. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361 : 507—517.
- Pfaff M., Aumailley M., Specks U., Knolle J., Zerwes H. G., Timpl R. 1993. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Exp. Cell Res.* 206 : 167—176.
- Plow E. E., Haas T. A., Zhang L., Loftus J., Smith J. W. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275 : 21 785—21 788.
- Reuter M., Schwieger C., Meister A., Karlsson G., Blume A. 2009. Poly-L-lysines and poly-L-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophys. Chem.* 144 : 27—37.
- Ruoslahti E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 12 : 697—715.
- Seb e-Pedr s A., Roger A. J., Lang F. B., King N., Ruiz-Trillo I. 2010. Ancient origin of the integrin-mediated adhesion and signaling machinery. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 10 142—10 147.
- Siljander P. R., Hamaia S. W., Peachy A. R., Slatter D. A., Smethurst P. A., Ouwehand W. H., Knight C. G., Farndale R. W. 2004. Integrin activation state determines selective for novel recognition sites in fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* 279 : 47 763—47 772.
- Singh P., Carraher C., Schwarzbauer J. E. 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 26 : 397—419.
- Statz W. D., Fok K. F., Zutter M. M., Adams S. P., Rodriguez B. A., Santoro S. A. 1991. Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen. *J. Biol. Chem.* 266 : 7363—7367.
- Sudhakar A., Boosani C. S. 2008. Inhibition of tumor angiogenesis by tumstatin: insights into signaling mechanisms and implications in cancer regression. *Pharmaceutical Res.* 25 : 2731—2739.
- Sweeney S. M., Orgel J. P., Fertala A., McAuliffe J. D., Turner K. R., DiLullo G. A., Chen S., Antipova O., Perumal S., Ala-Kokko L., Forlino A., Cabral W. A., Barnes A. M., Mari-  
ni J. C., San Antonio J. D. 2008. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J. Biol. Chem.* 283 : 21 187—21 197.
- Takada Y., Ye X., Simon S. 2007. The integrins. *Genome Biol.* 8 : 215.1—215.9.
- Takagi J. 2007. Structural basis for ligand recognition by integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 : 557—564.
- Thodeti C. K., Albrechtsen R., Graustund M., Asmar M., Larson C., Takada Y., Mercurio A. M., Couchman J. R., Wewer U. M. 2003. ADAM12/Syndecan-4 signaling promotes  $\beta_1$  integrin-dependent cell spreading through protein kinase C $\alpha$  and RhoA. *J. Biol. Chem.* 278 : 9576—9584.
- Underwood P. A., Bennett F. A., Kirkpatrick A., Bean P. A., Moss B. A. 1995. Evidence for the location of a binding sequence for the  $\alpha_2\beta_1$  integrin of endothelial cells, in the  $\beta_1$  subunit of laminin. *Biochem. J.* 309 : 765—771.
- Van der Flier A., Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305 : 285—298.
- Van der Rest M., Garrone R. 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5 : 2814—2823.
- Yamada Y., Avvedimento V. E., Mudryj M., Ohkubo H., Vogeli G., Irani M., Pastan I., de Crombrugge B. 1980. The collagen gene: evidence for its evolutionary assembly by amplification of a DNA segment containing an exon of 54 bp. *Cell.* 22 : 887—892.
- Zannetti A., Del Vecchio S., Iommelli F., Del Gatto A., De Luca S., Zaccaro L., Papaccioli A., Sommella J., Panico M., Speranza A., Grieco P., Novellino E., Saviano M., Pedone C., Salvatore M. 2009. Imaging of  $\alpha_v\beta_3$  expression by a bifunctional chimeric RGD peptide not cross-reacting with  $\alpha_v\beta_5$ . *Clin. Cancer Res.* 15 : 5224—5233.
- Zemljic J. S., Znidarcic T., Svetina S., Batista U. 2007. The effect of substrate and adsorbed proteins on adhesion, growth and shape of CaCo-2 cells. *Cell Biol. Int.* 31 : 1097—1108.
- Zimmerman B., Volberg T., Geiger B. 2004. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 58 : 143—159.

Поступила 17 V 2012

#### THE EFFECT OF THE COLLAGEN TRIPEPTIDE FRAGMENT (GER) ON THE ADHESION AND SPREADING OF FIBROBLASTS DEPENDS ON THE PROPERTIES OF ADHESIVE SURFACE

V. P. Ivanova,<sup>1</sup> Z. V. Kovaleva,<sup>2</sup> V. V. Anokhina,<sup>3</sup> A. I. Krivchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS,  
<sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>3</sup> St. Petersburg State University;  
e-mail: valet@iephb.ru

The effect of collagen tripeptide fragment GER on the adhesion and spreading of mouse embryonic fibroblasts STO to different substrates — polystyrene plastic and immobilized on plastic poly-L-lysine, fibronectin or gelatin was studied. Tripeptide GER has been found to participate in the regulation of fibroblast adhesion and spreading. Therewith, the tripeptide effect value on cell response was dependent both on the mode of tripeptide addition to culture medium and on the type of used substrate. During cocubation of fibroblasts with the tripeptide the stimulation of cell attachment and spreading to untreated plastic and plastic coated with fibronectin or gelatin was observed. At the same time the tripeptide did not change cell adhesion to immobilized poly-L-lysine. Preincubation of cells with the tripeptide resulted in partial inhibition of fibroblast adhesion and spreading on fibronectin- and gelatin-coated substrata. It was shown that the extent of activation and inhibition of adhesive processes on fibronectin was higher than such ones on gelatin after tripeptide treating. The data obtained support the assumption about concerted action of tripeptide GER (activity of which was dependent both on the used concentration of the tripeptide and on the mode of tripeptide addition to culture medium) and chemical characteristics of substrate (polymers of styrene and L-lysine, ECM proteins in native (fibronectin) or partly denatured (gelatin) form) on the cell adhesion and spreading. The main targets on which the GER peptide may affect during the formation of cell-substrate interactions are discussed.

Key words: collagen tripeptide fragment, adhesion, spreading, fibronectin, gelatin, poly-L-lysine, embryonic fibroblasts.