

На правах рукописи

ЕРМАКОВА

Ирина Игоревна

**ПРОТЕОГЛИКАНЫ КУЛЬТУРЫ МИОБЛАСТОВ L6J1: ХАРАКТЕРИСТИКА
И ВЛИЯНИЕ НА АДГЕЗИЮ, ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ
МИОБЛАСТОВ**

03.00.25 – гистология, цитология и клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2008

Работа выполнена в Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук
МОРОЗОВ ВЛАДИМИР ИГОРЕВИЧ
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
ВОРОБЬЕВ ВЛАДИМИР ИОСИФОВИЧ
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

кандидат биологических наук
КУЛЬМИНСКАЯ АННА АЛЕКСЕЕВНА
Петербургский институт ядерной физики РАН им. Б.
П. Константинова, Гатчина

Ведущая организация:

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Защита состоится 19 декабря 2008г. в 15 ч на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.
факс: (812) 297-0341
e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru
сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан “ ____ ” ноября 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из фундаментальных задач клеточной биологии является изучение механизмов взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом, который не только служит структурным каркасом ткани, но и влияет на рост и развитие контактирующих с ним клеток. Интенсивно развивающимся направлением таких исследований является выяснение функциональной роли протеогликанов – большого класса мультифункциональных соединений внеклеточного матрикса, состоящих из корового белка, ковалентно связанного с одной или более полисахаридными цепями – гликозаминогликанами. Эти углеводные цепи в значительной степени сульфатированы и несут большой отрицательный заряд, благодаря которому протеогликанов сильно гидратированы, что важно для обеспечения механической прочности ткани (Iozzo and Murdoch, 1996). С другой стороны, появляется все больше данных, подтверждающих разнообразные регуляторные функции протеогликанов (Iozzo, 2000; Kresse and Schonherr, 2001; Cool and Nurcombe, 2006; Evanko et al., 2007). Этим соединениям отводят роль модуляторов активности ростовых факторов (Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Iozzo and Murdoch, 1996; Langsdorf et al 2007), секретируемых клетками ферментов и их ингибиторов (Bernfield et al., 1999; Iozzo, 2000). С регуляторными молекулами, такими, например, как факторы роста, взаимодействуют углеводные цепи протеогликанов, усиливая или подавляя действие факторов (Taipale and Keski-Oja, 1996). Протеогликанов влияют на адгезию и миграцию клеток, участвуют в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки (Iozzo, 2000).

Большой интерес протеогликанов вызывают в связи с развитием и регенерацией мышечной ткани (Velleman et al., 2006; Liu C. et al., 2006; Droguett et al., 2006). На участие протеогликанов в миогенезе указывают данные об увеличении их синтеза в скелетных мышцах в условиях регенерации ткани при патологиях (Alvarez et al., 2002) или при повреждении (Caceres et al., 2000; Casar et al., 2004). Показано, что миогенез в ходе эмбрионального развития и при регенерации поврежденной мышцы сопровождается изменением спектра протеогликанов (Young et al., 1990; Velleman et al., 1999; Casar et al., 2004). Состав протеогликанов изменяется в ходе миогенеза на фоне динамических изменений структуры мышечной ткани: происходит активация сателлитных клеток, их пролиферация и слияние с образованием миотуб, из которых формируются мышечные волокна (Charge & Rudnicki, 2004). Эти процессы невозможны без участия компонентов внеклеточного матрикса, в том числе протеогликанов, которые могут, как влиять на взаимодействие миобластов с внеклеточным матриксом, так и регулировать действие ростовых факторов

(bFGF, HGF и TGF β), контролирующих пролиферацию и дифференцировку этих клеток (Velleman et al., 1999). Несмотря на значительное количество работ, посвященных выяснению роли протеогликанов в регуляции процессов миогенеза, конкретные функции протеогликанов и механизмы их участия в этих событиях остаются в большой степени на уровне предположений.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении характеристик протеогликанов, синтезируемых миообластами L6J1, и исследовании их влияния на адгезию, пролиферацию и дифференцировку этих клеток.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) выделить протеогликаны культуры миообластов;
- 2) определить основные классы протеогликанов культуры миообластов по составу гликозаминогликанов;
- 3) идентифицировать основные протеогликаны культуры миообластов;
- 4) изучить влияние протеогликанов/гликозаминогликанов на адгезию миообластов;
- 5) исследовать действие протеогликанов/гликозаминогликанов на пролиферацию миообластов;
- 6) изучить действие протеогликанов/гликозаминогликанов на дифференцировку миообластов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Хондроитинсульфат-содержащие протеогликаны являются преобладающим классом протеогликанов во всех составляющих культуры миообластов L6J1 – внеклеточном матриксе, клетках и культуральной среде.

2. Основным протеогликаном внеклеточного матрикса миообластов является версикан, а основным протеогликаном культуральной среды, кондиционированной миообластами, – бигликан.

3. Гликозаминогликаны – углеводные компоненты протеогликанов – влияют на пролиферацию миообластов, модулируя активность фактора роста bFGF: гепарин (аналог гепарансульфата ткани) и дерматансульфат увеличивают, а хондроитинсульфат снижает пролиферацию миообластов в присутствии bFGF.

4. Гликозаминогликан гепарин замедляет дифференцировку миообластов.

Научная новизна. Впервые проведено выделение и изучены характеристики протеогликанов культуры миообластов L6J1. Показано, что хондроитинсульфат-содержащие протеогликаны представляют основной класс этих соединений в культуральной среде, внеклеточном матриксе и самих миообластах. В качестве мажорных протеогликанов культуры миообластов идентифицированы хондроитинсульфат-содержащие протеогликаны бигликан и

версикан, причем впервые показано, как они распределяются в культуре клеток: версикан остается в составе внеклеточного матрикса, а бигликан синтезируется клетками в среде культивирования. Проведено систематическое исследование влияния протеогликанов/гликозаминогликанов на основные функции клетки, включая адгезию, пролиферацию и дифференцировку миобластов. Впервые показано, что протеогликаны, синтезированные миобластами, подавляют их адгезию, причем устранение углеводных цепей протеогликанов с помощью ферментов приводит к нормальному прикреплению и распластыванию миобластов. Обнаружено различное влияние разных классов гликозаминогликанов на пролиферацию миобластов в присутствии bFGF: гепарин и дерматансульфат ускоряют рост клеток, а хондроитинсульфат снижает пролиферацию миобластов. В экспериментах по дифференцировке миобластов впервые обнаружено, что гепарин замедляет образование миотуб из миобластов.

Теоретическое и практическое значение работы. Работа имеет фундаментальный характер и направлена на изучение роли протеогликанов в регуляции клеточных функций. В то же время полученные данные могут составить основу для разработки новых подходов, способных ускорить восстановление повреждений мышечной ткани.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 2 статьи и 6 тезисов.

Основные положения работы были представлены на VI Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток», на 10-й Пущинской школе – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», на 10-й Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье», на Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре», на II съезде Общества клеточной биологии, на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов и на научных семинарах Отдела клеточных культур Института цитологии РАН.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающих 160 ссылок. Диссертация изложена на 106 страницах и иллюстрирована 39 рисунками и 8 таблицами.

Работа выполнена при финансовой поддержке СПб НЦ РАН (проекты 2-63-2005, 2-71-2006 и 2-95-2007).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование миобластов L6J1. Трансформированные миобласты крысы L6J1 были получены из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в среде DMEM, содержащей 10 %



Рис. 1. Схема выделения протеогликанов из культуры миобластов L6J1.

эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС). Прижизненные фотографии клеток делали с помощью камеры Canon на микроскопе Carl Zeiss, Германия, об. 10x (адгезия миобластов) и с помощью встроенной камеры на микроскопе Nikon Eclipse TS-100, об. 10x (дифференцировка миобластов).

Выделение протеогликанов. Для выделения ПГ из культуры миобластов L6J1 была использована комбинация методов, описанных в литературе (Yanagishita et al., 1987; Carey et al., 1990; Brown et al., 1999; Iozzo, 2001). Процедура выделения ПГ из культуральной среды, ВКМ и миобластов была сходной и состояла, за исключением первого этапа, из ряда общих стадий (рис. 1). Первый этап включал обработку культуральной среды двойным объемом буфера А. Клетки и ВКМ снимали с поверхности флаконов с помощью пластиковых скребков буфером В. Клеточную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 4 °С и 100 g (r_{cp} 9 см). Супернатант, содержащий компоненты ВКМ, использовали для выделения

ПГ ВКМ, осажденные миобласты лизировали буфером С и лизат клеток осветляли с помощью центрифугирования в течение 20 мин при 4 °С и 2000 g (r_{cp} 9 см). Далее все составляющие клеточной культуры (культуральная среда, ВКМ и миобласты) обрабатывали в течение 2 ч сорбентом Q-сефароза при постоянном перемешивании для извлечения ПГ. Сорбент помещали в колонки, которые последовательно промывали буфером D и буфером E (по 25 объемов колонки). Элюцию ПГ с Q-сефарозы проводили в градиенте концентрации NaCl (0.2-1.5 М) (20 объемов колонки). Содержание белка во фракциях определяли по Бредфорд, содержание ПГ – с помощью красителя 1,9-диметилметиленовый синий (ДМС). Фракции градиента объединяли (объединенные фракции I–IV) с учетом профиля элюции, диализовали, концентрировали с помощью ультрафильтрации и лиофилизировали.

Анализ углеводного состава протеогликанов. Ферментативное расщепление ПГ с целью анализа состава ГАГ проводили с помощью ферментов хондроитиназа ABC, специфически расщепляющая хондроитин/дерматансульфаты, и гепариназа III, специфически расщепляющая гепарансульфаты. Лиофилизированные фракции, содержащие максимальное количество ПГ, растворяли в буфере, pH 7.5, оптимизированном для обоих ферментов и содержащем 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. Для каждой фракции готовили 3 пробы: 1) контроль – без добавления фермента; 2) 0.4 ед/мл гепариназы III (25 °С); 3) 0.5 ед/мл хондроитиназы ABC (37 °С). Ферментативное расщепление ГАГ проводили в течение 5 ч. Ход реакции прослеживали по уменьшению концентрации ГАГ, которую оценивали с помощью ДМС. Содержание ГАГ рассчитывали по разнице оптической плотности образца ПГ, не содержащего ферменты, и образца, обработанного каждым из ферментов в отдельности, в соответствии с формулой:

$$\text{ГАГ (\%)} = \frac{A^0_{525} - A'_{525}}{A^0_{525}}, \text{ где } A^0_{525} - \text{оптическая плотность исходного образца без}$$

фермента, A'_{525} - оптическая плотность образца после обработки одним из ферментов.

Электрофоретический анализ коровых белков протеогликанов. Анализ коровых белков ПГ культуры миобластов проводили в процессе электрофореза материала, полученного после обработки ферментами хондроитиназа ABC, хондроитиназа AC (специфически расщепляет хондроитинсульфаты) и гепариназа III. Лиофилизированные фракции растворяли в воде, измеряли концентрацию белка и ГАГ и готовили 3 пробы для каждой фракции из расчета 5 мкг ГАГ в пробе (как описано выше). В пробы 2 и 3 добавляли 4-кратный буферный раствор, содержащий 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 16 mM CaCl₂ в случае гепариназы III, и 200 mM Tris-HCl, pH 7.3, 240 mM NaOAc в случае хондроитиназы AC и ABC (проба : буфер – 3 : 1). По завершении ферментативной обработки пробы анализировали с помощью электрофореза в 7 %-ном ПААГ (Laemmli, 1970). Гели

последовательно окрашивали 0.1 % альциановым синим в растворе 50 %-ого этанола и 10 %-ной уксусной кислоты в течение 2 ч, после чего отмывали тем же раствором без красителя, затем окрашивали 0.1 % Кумасси R-250 в растворе 10 %-ной уксусной кислоты и 5 %-ого этанола, после чего гель отмывали тем же раствором без красителя. Далее для идентификации ПГ проводили масс-спектрометрический анализ коровых белков ПГ, выявленных в результате ферментативной обработки и электрофореза.

Масс-спектрометрический анализ протеогликанов. Идентификацию ПГ осуществляли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF в НИИ физико-химической медицины МЗ РФ (Москва) при участии М. Серебряковой, а также в AG Bioanalytic (Leipzig) при участии М. Федоровой. Масс-спектры были получены на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером. Масс-спектры анализировали при помощи программы Mascot. Поиск по «пептидному фингерпринту» был проведен в базе данных NCBI среди белков млекопитающих с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

Изучение влияния протеогликанов на адгезию миобластов. В лунки 24-луночного планшета вносили по 20 мкг/мл ПГ культуральной среды, ПГ ВКМ, декорина, белка ВКМ фибронектина (любезно предоставлен сотрудником Института цитологии РАН Д.А. Гамазиным) в 0.5 мл PBS. Кроме того, адгезию миобластов анализировали при использовании следующих комбинаций препаратов: 1) фибронектин (20 мкг/мл) и декорин (20 и 100 мкг/мл); 2) фибронектин (20 мкг/мл) и ПГ ВКМ(КС) (20 и 100 мкг/мл). Планшет выдерживали 8 ч при 4-6 °С, убирали жидкую фазу, лунки промывали PBS и в каждую ячейку вносили 2×10^4 миобластов L6J1 в 0.5 мл DMEM. Через 6 ч состояние клеток анализировали под микроскопом (ув. 100х). При изучении влияния полисахаридных цепей ПГ на адгезию миобластов клетки вносили в лунки после обработки иммобилизованного субстрата (смесь фибронектина с ПГ в концентрации 100 мкг/мл) хондроитиназой ABC.

Изучение влияния гликозаминогликанов в комбинации с фактором роста фибробластов на пролиферацию миобластов. В ячейки 24-луночного планшета высевали по 2×10^4 миобластов L6J1 в 1 мл DMEM, содержащей 10 % ЭБС. Через 1 сут полную среду убирали, клетки промывали DMEM без ЭБС и оставляли в этой же среде на 12 ч. Затем среду заменяли на такую же неполную среду, содержащую 100 нг/мл ГАГ, 20 нг/мл ростового фактора bFGF и 3 мКи/мл [^3H]-тимидина. Через 18 или 24 ч среду убирали, клетки промывали PBS и снимали PBS, содержащим смесь трипсина и версена. Радиоактивность клеточной суспензии подсчитывали на жидкостно-сцинтилляционном счетчике LS 6500 ("Beckman", Австрия) в сцинтилляционном коктейле на основе диоксана.

Изучение влияния гликозаминогликанов и протеогликана декорина на дифференцировку миобластов. В лунки 24-луночного планшета высевали по 10^5 миобластов в 1 мл полной среды. Через 2 сут инициировали дифференцировку миобластов (Jin et al., 1991; Kroll et al., 1994), заменяя полную среду на среду, содержащую 0.5 % ЭБС и различные ГАГ (гепарин, хондроитинсульфат, дерматансульфат) или ПГ декорин в концентрации 1 мкг/мл. На 6, 10 и 14-е сутки культивирования клетки фотографировали и далее фотографии клеток анализировали с помощью программы ImageJ и полученные данные обрабатывали в программе Microsoft Office Excel. К параметрам клетки – площадь (A – area) и периметр (P – perimeter), измеренным программой ImageJ, добавляли еще один параметр – коэффициент вытянутости клетки (Rp/Ra), рассчитанный по формуле $Rp/Ra = \frac{P}{2\sqrt{\pi A}}$ (Rp/Ra = 1 - круглая

клетка; Rp/Ra = ∞ - бесконечно вытянутая клетка). В качестве показателей дифференцировки рассчитывали: 1) количество миотуб относительно количества всех клеток

$$\frac{n_{\text{миотуб}}}{n_{\text{миобластов}} + n_{\text{миотуб}}} \times 100\%, \text{ где } n - \text{ количество клеток; 2) среднюю площадь клетки} - \frac{\sum A}{n}; \text{ 3)}$$

среднюю вытянутость клетки - $\frac{\sum Rp/Ra}{n}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение протеогликанов из культуральной среды, клеток и ВКМ

Таблица 1. Содержание белка и ГАГ в отдельных фракциях культуры миобластов

Фракция клеточной культуры	Объем фракции (мл)	ГАГ (мг)	Белок (мг)	Концентрация ГАГ (мкг/мл)	Концентрация белка (мг/мл)
ВКМ	1000	0.3	100	0.3	0.1
Клетки	250	0.7	480	2.6	1.9
Культуральная среда	2500	4.3	10500	1.7	4.2

Примечание. Расчет количества ГАГ проведен по данным ионообменной хроматографии.

Выделение ПГ культуры миобластов было проведено из материала, собранного после наращивания 10^9 клеток. Объем фракций культуры миобластов – ВКМ, клеток и культуральной среды, из которых выделяли ПГ, а также количество ГАГ и белка в этих фракциях приведены в табл. 1. ГАГ не удалось определить с помощью ДМС в исходных фракциях и их количество было рассчитано по результатам ионообменной хроматографии.

Количество ПГ в исходных фракциях сопоставимо с количеством ГАГ, которые составляют,

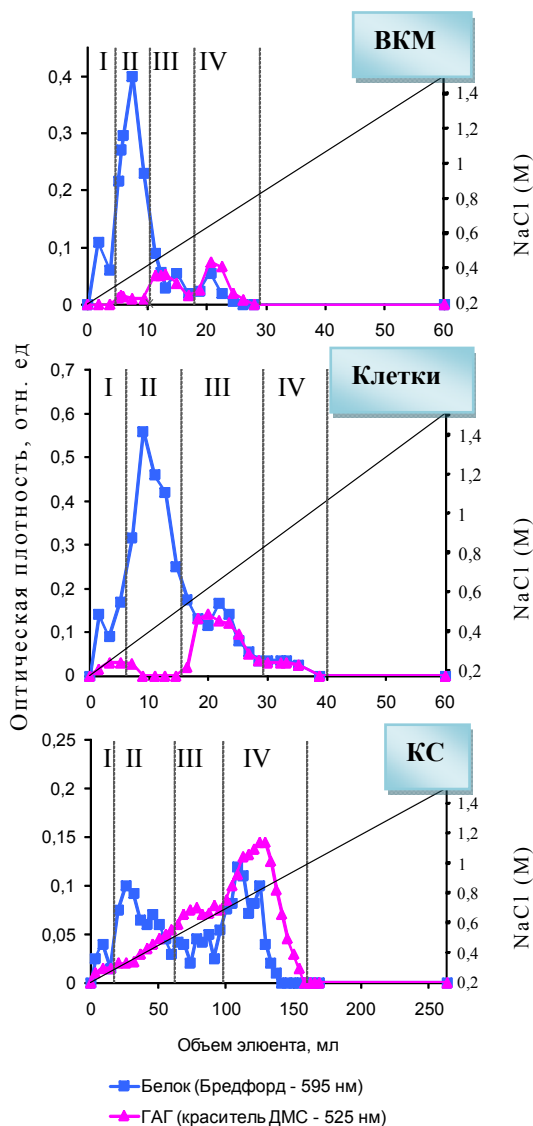


Рис. 2. Графики элюции с Q-сефарозы протеогликанов внеклеточного матрикса (ВКМ), миобластов (Клетки) и культуральной среды (КС). I – IV – объединенные фракции градиента

как правило, не меньше половины молекулы ПГ по массе. Проведенные расчеты свидетельствуют об очень малой концентрации ПГ во всех составляющих культуры миобластов (культуральная среда, ВКМ и миобласты) по сравнению с концентрацией белка (табл. 1).

В результате разделения ПГ с помощью ионообменной хроматографии были получены по 4 фракции ПГ культуральной среды, ВКМ и клеток (I–IV), объединенные в соответствии с профилем элюции (рис. 2). Во всех случаях первой при концентрации NaCl 0.3 М выходит белковая фракция, практически не содержащая ГАГ. Во второй фракции (0.4-0.5 М NaCl) содержится основная часть белка с небольшим количеством ГАГ. Белковые пики практически не перекрываются с пиками ГАГ, что дает возможность отделить белковую фракцию от фракций ГАГ. Элюция основной массы ГАГ происходит в виде двух пиков (фракции III и IV соответственно) при анализе ВКМ (0.5 М и 0.65 М NaCl) и культуральной среды (0.6 М и 0.8 М NaCl). Для клеток характерен только один пик ПГ (0.65 М NaCl), тогда как другие пики ПГ не

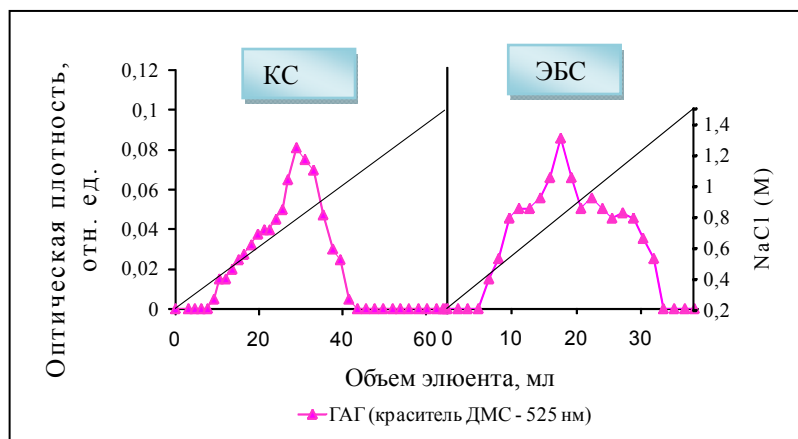


Рис. 3. Графики элюции с Q-сефарозы ПГ культуральной среды, миобластов L6J1 (КС) и эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС).

выявляются.

Наибольшее количество ПГ присутствует в культуральной среде, а наименьшее – в ВКМ (табл. 1). Высокое содержание ПГ в культуральной среде заставило нас предположить, что хотя бы часть ПГ

попадает в культуральную среду из ЭБС. Для выяснения этого вопроса было проведено выделение ПГ из среды DMEM, содержащей 10 % ЭБС, и равного объема такой же среды, кондиционированной миобластами (рис. 3). Оказалось, что высота пика и ионная сила (0.8 M NaCl), при которой наблюдается основной пик ПГ, сходны в обоих случаях. Это позволило заключить, во-первых, что в ЭБС есть ПГ и, во-вторых, что основная масса ПГ кондиционированной миобластами культуральной среды представлена ПГ ЭБС. ПГ, синтезированные самими клетками в культуральную среду, могут быть выявлены при сопоставлении электрофореграмм ПГ культуральной среды и ЭБС.

Характеристика выделенных протеогликанов.

Анализ углеводного состава ПГ. При анализе углеводного состава ПГ были использованы ферменты, специфически разрушающие хондроитин/дерматансульфаты (хондроитиназа ABC) и гепарансульфаты (гепариназа III). Обработка этими ферментами

Таблица 2. Углеводный состав протеогликанов основных фракций культуры миобластов L6J1.

Показатели	Культуральная среда		Клетки		ВКМ	
	Геп. III	С. ABC	Геп. III	С. ABC	Геп. III	С. ABC
Содержание гепарансульфатов (%)	8.7	-	19.6	-	26.1	-
Содержание хондроитин/дерматансульфатов (%)	-	91.3	-	50.9	-	65.2
Суммарное содержание гликозаминогликанов трех классов (%)	100		70.5		91.3	

Примечание. Геп. III – гепариназа III; С. ABC – хондроитиназа ABC.

фракций, содержащих наибольшее количество ПГ (фракция III для клеток, фракции III и IV для ВКМ и культуральной среды), позволила определить конкретные классы выделенных ПГ и их относительное содержание в составляющих клеточной культуры (табл. 2). Ферментативная обработка ПГ ВКМ и клеток выявила преобладающее содержание хондроитин/дерматансульфатов по сравнению с гепарансульфатами – 2.6:1 для клеток и 2.5:1 для ВКМ. ПГ культуральной среды по результатам анализа состоят более чем на 90 % из хондроитин/дерматансульфатов.

Электрофоретический анализ фракций

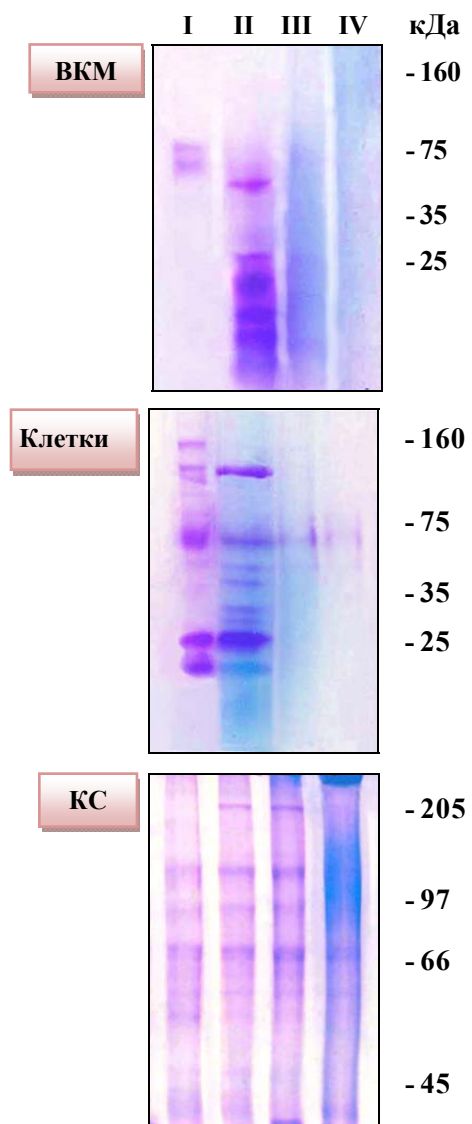


Рис. 4. Электрофорез в 7 %-ном ДСН-ПААГ фракций протеогликанов внеклеточного матрикса (ВКМ), миобластов (клетки) и культуральной среды (КС), полученных после разделения на Q-сефарозе.

I – IV – объединенные фракции градиента

протеогликанов ВКМ, миобластов и культуральной среды. Объединенные фракции ПГ (I-IV) ВКМ, миобластов и культуральной среды, полученные в результате ионообменной хроматографии, анализировали с помощью электрофореза в 7 %-ном ПААГ (рис. 4). Для окраски белков в геле использовали Кумасси G-250 (фиолетовая окраска), а для окраски отрицательно заряженных ГАГ – альциановый синий (синяя окраска). Результаты электрофоретического анализа этих фракций ПГ полностью согласуются с графиками элюции ПГ с Q-сефарозы (рис. 2). Исключение составила фракция II ПГ миобластов, которая дала синее окрашивание в ПААГ, но на графике элюции окраски этой фракции ДМС не было получено, что, возможно, связано с наличием в этой фракции гиалуроновой кислоты или нуклеиновых кислот, которые окрашиваются альциановым синим, но не взаимодействуют с красителем ДМС.

Выявление коровых белков и масс-спектрометрическая идентификация выделенных протеогликанов. Коровые белки выделенных ПГ выявляли при сопоставлении электрофореграмм фракций ПГ до и после обработки ферментами.

Для анализа были взяты фракции, которые содержали максимальное количество ПГ по результатам ионообменной хроматографии: фракция III ПГ миобластов, фракции III и IV ПГ ВКМ, фракция IV культуральной среды. Согласно данным, приведенным в табл. 2, ПГ ВКМ и культуральной среды состоят преимущественно из хондроитин/дерматансульфатов, а также содержат небольшое количество гепарансульфатов. Обработка этих фракций хондроитиназой ABC и гепариназой III позволила выявить коровые белки ПГ при электрофорезе. На рис. 5 приведены данные электрофоретического анализа ПГ ВКМ после ферментативной обработки. Электрофорез фракций III и IV ПГ ВКМ показал, что ПГ обеих

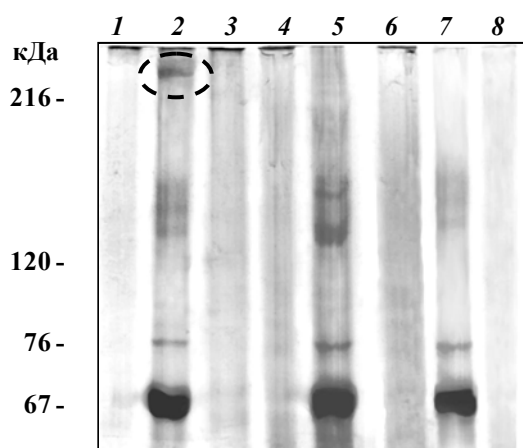


Рис. 5. Электрофорез фракций III и IV ПГ ВКМ в 7 %-ном ДСН-ПААГ.

1 – фракция III ВКМ (контроль без фермента); 2 – фракция III ВКМ после обработки хондроитиназой АС; 3 – фракция III ВКМ после обработки гепариназой III; 4 – фракция IV ВКМ (контроль без фермента); 5 – фракция IV ВКМ после обработки хондроитиназой АС; 6 – фракция IV ВКМ после обработки гепариназой III; 7 – хондроитиназа АС; 8 – гепариназа III.

фермент (дорожка 7), можно объяснить присутствием БСА в фирменном препарате хондроитиназы АС. В отличие от хондроитиназы АС, обработка фракций III и IV (дорожки 3 и 6) гепариназой IV не приводит к появлению новых полос по сравнению с контролем без ферментативной обработки (дорожки 1 и 4).

Масс-спектрометрический анализ коровых белков протеогликанов ВКМ показал, что высокомолекулярный коровый белок фракции III ВКМ является протеогликаном версиканом. Анализ коровых белков, выявленных во фракции IV, не дал достоверных результатов.

С помощью обработки ПГ фракции III клеток смесью хондроитиназа АС и гепариназа

фракций – высокомолекулярные соединения, которые не входят в 7 %-ный ПААГ и задерживаются на старте (рис. 5, дорожки 1 и 4 соответственно). В результате обработки фракций III и IV хондроитиназой АС, специфичной в отношении хондроитинсульфатов, появляются новые белковые полосы (дорожки 2 и 5). При сопоставлении этих полос с картиной, которую дает сам фермент (дорожка 7), к коровым белкам ПГ могут быть отнесены полоса с мол. массой около 230 кДа, обнаруженная во фракции III, и полосы в области мол. масс 140–165 кДа, которые слабо выявляются во фракции III (дорожка 2) и становятся более отчетливыми во фракции IV (дорожка 5). Полосы, выявляющиеся в контроле на

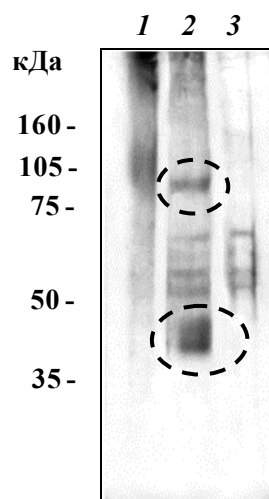


Рис. 6. Электрофорез фракции IV ПГ культуральной среды в 7 %-ном ДСН-ПААГ.

1 – фракция IV культуральной среды (контроль без фермента); 2 – фракция IV культуральной среды после обработки хондроитиназой АВС; 3 – фермент хондроитиназа АВС.

III был выявлен высокомолекулярный белок (>200 кДа), которого нет ни в контроле без ферментативной обработки, ни в препарате фермента, и который, по-видимому, является коровым белком ПГ клеток. При масс-спектрометрическом анализе этого белка не было получено достоверных данных, позволяющих идентифицировать ПГ.

ПГ культуральной среды по данным анализа углеводного состава практически полностью представлены хондроитин/дерматансульфат ПГ, вследствие чего они были подвергнуты ферментативному расщеплению одним ферментом хондроитиназа ABC (рис. 6). Электрофорез ПГ фракции IV культуральной среды после ферментативной обработки позволил обнаружить 2 белковые полосы, очевидно, представляющие собой коровые белки ПГ: широкую полосу с мол. массой около 40 кДа и полосу с мол. массой около 90 кДа (дорожка 2). Электрофорез этой фракции после ферментативной обработки в градиентном

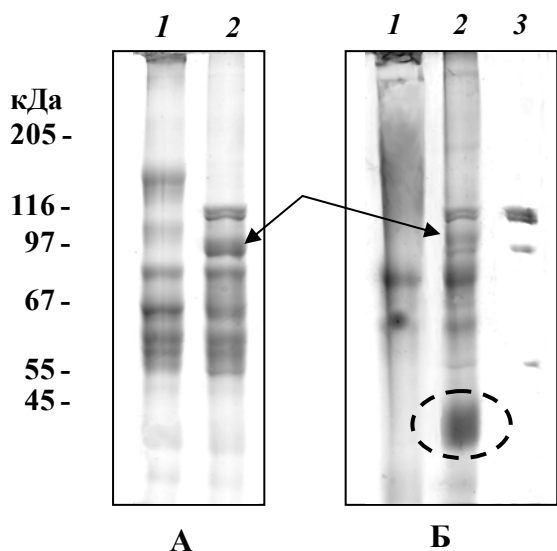


Рис. 7. Электрофорез фракции IV ПГ эмбриональной бычьей сыворотки (А) и культуральной среды (Б) в 7 %-ном ДСН-ПААГ.

1 – фракция IV КС(ЭБС) (контроль без фермента); 2 – фракция IV КС(ЭБС) после обработки хондроитиназой ABC; 3 – фермент хондроитиназа ABC.

геле 3 – 15 % дал возможность обнаружить еще один коровый белок ПГ культуральной среды с мол. массой более 300 кДа.

Учитывая то, что ПГ культуральной среды могут быть синтезированы миообластами, а также происходить из ЭБС (как было показано нами ранее), провели сравнительный электрофорез ПГ культуральной среды и ЭБС. На рис. 7 представлен электрофорез фракции IV ПГ культуральной среды и ЭБС, содержащей подавляющее количество ПГ, до и после ферментативной обработки хондроитиназой ABC. В случае ЭБС обработка ферментом привела к исчезновению полосы в области 140 кДа (рис. 7, А, дорожка 1) и появлению одной

новой полосы (рис. 7, А, дорожка 2), не считая полос фермента, в отличие от препарата ПГ культуральной среды, ферментативное расщепление которого привело к появлению 2 новых полос (рис. 7, Б, дорожка 2). Полоса с мол. массой около 90 кДа, которая есть в обоих препаратах, очевидно представляет собой коровый белок ПГ сыворотки. Более низкомолекулярный белок в районе 40 кДа, проявившийся только в препарате культуральной среды, по-видимому, является коровым белком ПГ, синтезированного самими миообластами.

Масс-спектрометрически проанализированные коровьи белки культуральной среды оказались коровьими белками ПГ бигликана (рис. 6, дорожка 2, низкомолекулярный белок), ПГ интер-альфа-ингибитора трипсина (рис. 6, дорожка 2, высокомолекулярный белок) и ПГ коллагена XII. Интер-альфа-ингибитор трипсина, очевидно, является ПГ сыворотки, поскольку есть и в культуральной среде и в ЭБС (рис. 7, А). ПГ бигликан, коровий белок которого появляется только после расщепления фракции IV ПГ культуральной среды, по-видимому, синтезируется самими миообластами

Влияние протеогликанов на адгезию миобластов.

ПГ ВКМ, как и ПГ культуральной среды (далее ВКМ(КС)), нанесенные на подложку в концентрации 20 мкг/мл, полностью препятствовали адгезии миобластов (рис. 8, а). В качестве контролей использовали ПГ декорин, который подобно ПГ ВКМ(КС) содержит цепи хондроитинсульфата, и фибронектин. Декорин, как и ПГ ВКМ(КС), ингибировал адгезию клеток (рис. 8, б), тогда как на фибронектине происходило нормальное прикрепление и распластывание клеток (рис. 8, в).

Распластывание миобластов на фибронектине ухудшалось при добавлении к нему декорина или ПГ ВКМ(КС) в концентрации 20 мкг/мл (рис. 9, а, з), причем ПГ ВКМ(КС) ингибировали адгезию сильнее по сравнению с декорином. Увеличение концентрации декорина и ПГ до 100 мкг/мл (концентрация, необходимая для последующей ферментативной обработки) усилило их ингибирующее действие на адгезию миобластов (рис. 9, б, д), а в случае ПГ ВКМ(КС) вызвало агрегацию клеток (рис. 9, д). Обработка субстрата, состоящего из 20 мкг/мл фибронектина и 100 мкг/мл декорина или ПГ

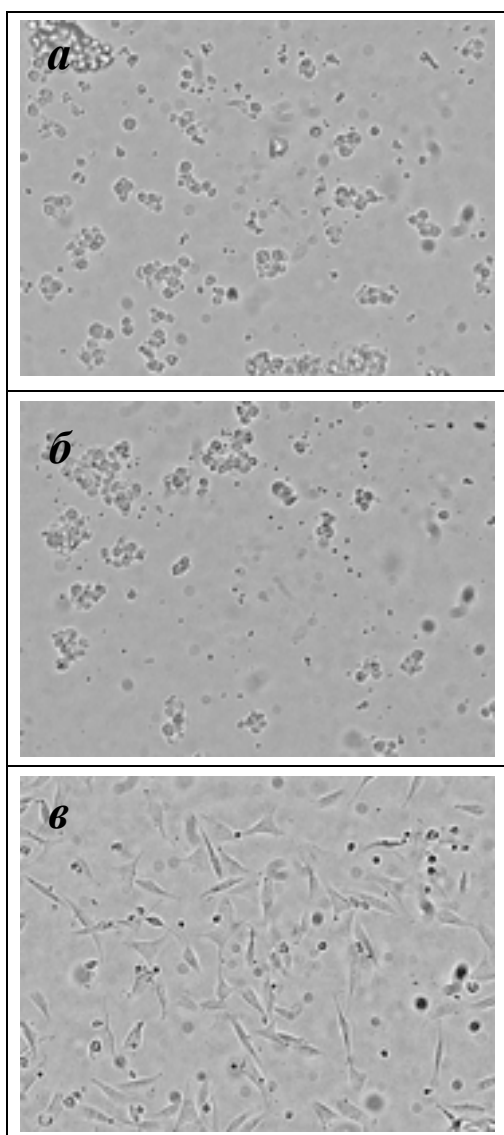


Рис. 8. Адгезия миобластов L6J1 на протеогликанах ВКМ(КС) (а), декорине (б) и фибронектине (в). Здесь и на рис. 9 показаны прижизненные микрофотографии клеток. Об.10х.

ВКМ(КС), хондроитиназой АВС, расщепляющей цепи хондроитинсульфата, привела к нормализации адгезии и расплывания миобластов (рис. 9, в, е).

Данные, полученные при изучении адгезии миобластов под действием хондроитинсульфат ПГ, указывают на возможность участия ПГ в регуляции адгезивных свойств миобластов. ПГ ВКМ миобластов и декорин, относящиеся к классу хондроитинсульфат ПГ, подавляют адгезию миобластов. Ингибирующее действие ПГ опосредовано их углеводными цепями.

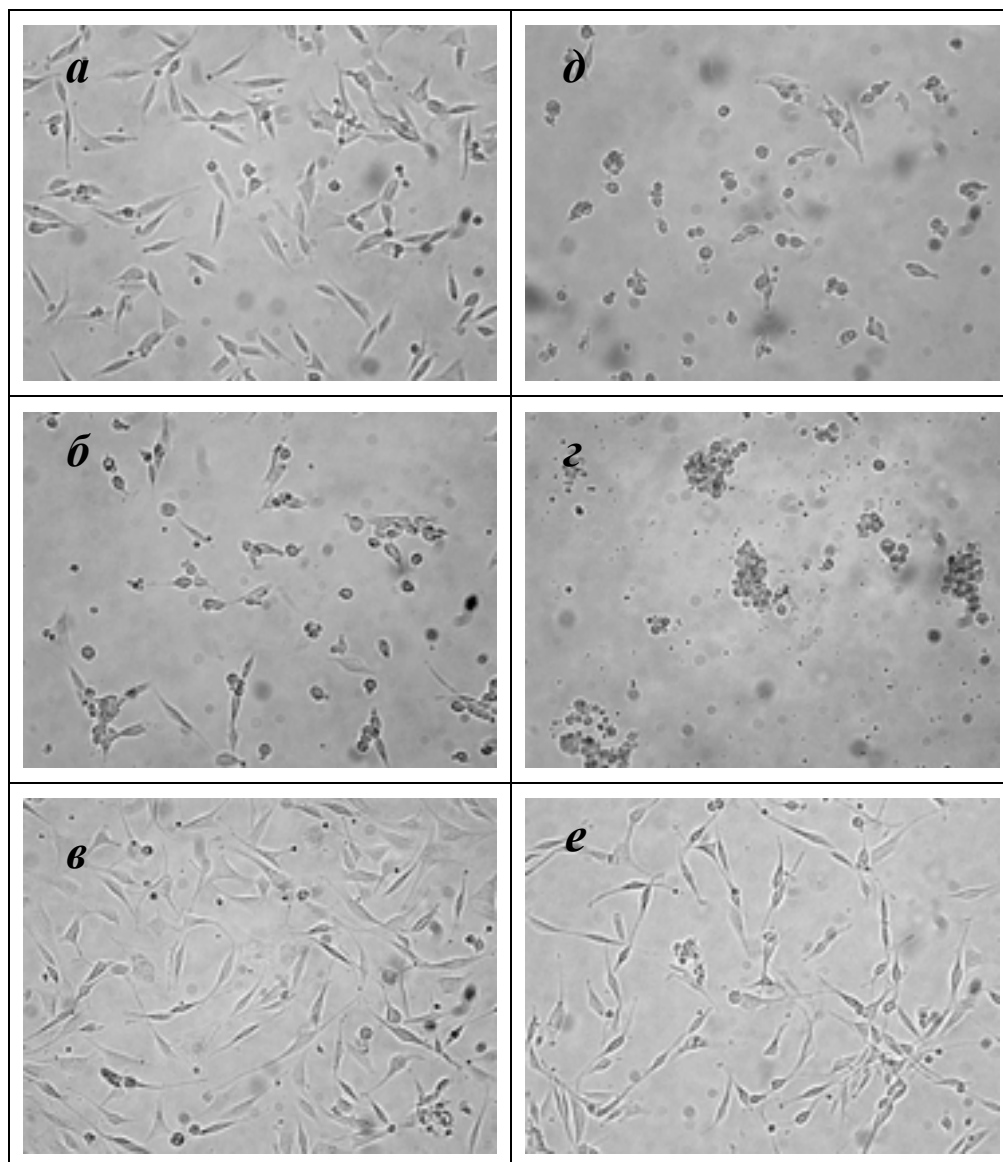


Рис. 9. Адгезия миобластов L6J1 на фибронектине в присутствии декорина и протеогликанов ВКМ(КС). Везде фибронектин (20 мкг/мл) и дополнительно: а – декорин (20 мкг/мл); б – декорин (100 мкг/мл); в – декорин (100 мкг/мл) с последующей обработкой нанесенного субстрата хондроитиназой АВС; г – ПГ ВКМ(КС) (20 мкг/мл); д – ПГ ВКМ(КС) (100 мкг/мл); е – ПГ ВКМ(КС) (100 мкг/мл) с последующей обработкой нанесенного субстрата хондроитиназой АВС.

Влияние протеогликанов и гликозаминогликанов в комбинации с основным фактором роста фибробластов (*bFGF*) на пролиферацию миобластов.

ГАГ являются компонентами ПГ, и именно они связывают факторы роста, модулируя их действие на клетки, поэтому собственно ГАГ часто используют для анализа функций ПГ. Гепарин не входит в состав ПГ, но его рассматривают как аналог гепарансульфат ПГ ткани. Исходя из определяющей роли состава углеводных цепей ПГ в регуляции активности факторов роста, исследовали влияние ГАГ разных классов (гепарин, хондроитинсульфат,

дерматансульфат) в сочетании с *bFGF* на пролиферацию миобластов.

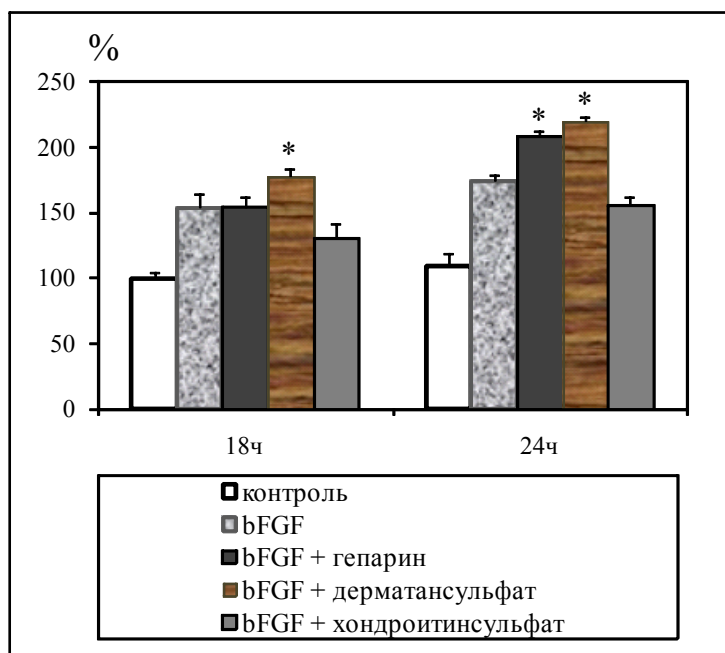


Рис. 10. Действие *bFGF* (20 нг/мл) и гликозаминогликанов на пролиферацию миобластов L6J1.

N = 3; приведены средние +/- SD; *t*-тест; * $p < 0.05$.

Концентрация ГАГ была выбрана на основе данных, приведенных в литературе (Villena and Brandan 2004). Результаты оценки действия ГАГ как модуляторов активности *bFGF* приведены на рис. 10. Добавление в инкубационную среду, наряду с *bFGF*, различных ГАГ модулирует действие фактора. Гепарин к 24 ч вызвал некоторое увеличение включения метки.

Дерматансульфат наиболее эффективно стимулировал активирующее пролиферацию миобластов действие *bFGF* – в точке 24 ч прирост включения метки в присутствии дерматансульфата составил 20 % по отношению к действию самого фактора. Напротив, добавление хондроитинсульфата привело даже к некоторому снижению действия *bFGF*. Полученные данные указывают на разнонаправленное действие различных ГАГ ПГ в комбинации с *bFGF* на ростовую активность миобластов. При этом гепарин и дерматансульфат могут усиливать действие ростовых факторов, тогда как в присутствии хондроитинсульфата интенсивность пролиферации миобластов имеет тенденцию к снижению.

Влияние гликозаминогликанов (хондроитинсульфат, дерматансульфат, гепарин) и протеогликана декорина на дифференцировку миобластов.

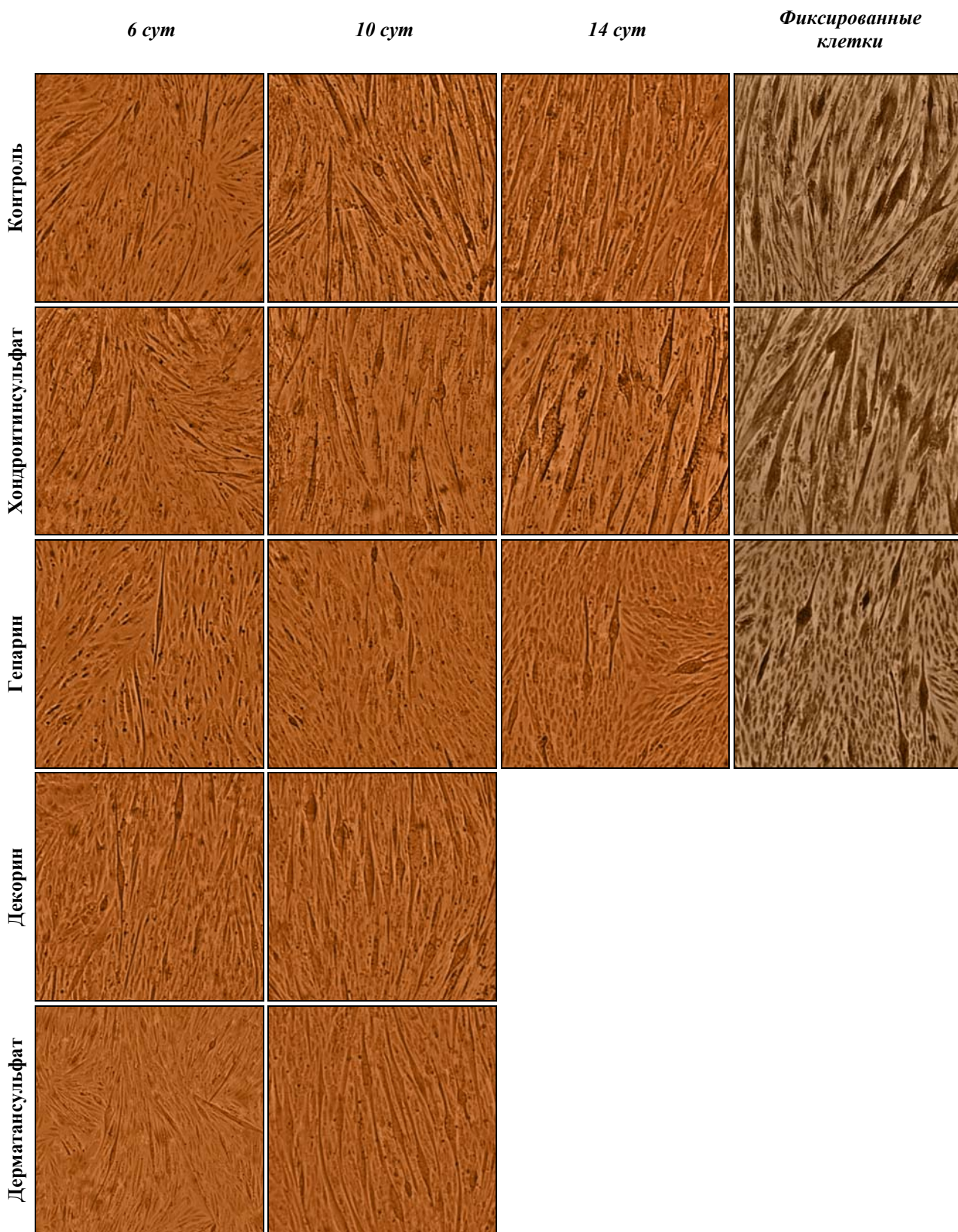


Рис. 11. Дифференцировка миобластов L6J1 в присутствии гликозаминогликанов (хондроитинсульфат, дерматансульфат, гепарин) и декорина. Показаны прижизненные фотографии клеток везде кроме последней колонки, в которой приведены снимки клеток, фиксированных на 14-е сутки культивирования и окрашенных по Романовскому-Гимзе.

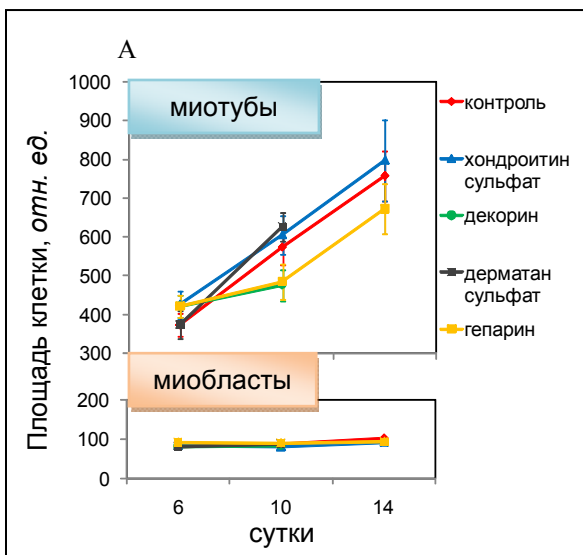


Рис. 12. Изменение площади клетки (миобласта или миотубы) в процессе дифференцировки миобластов на разных сроках культивирования.

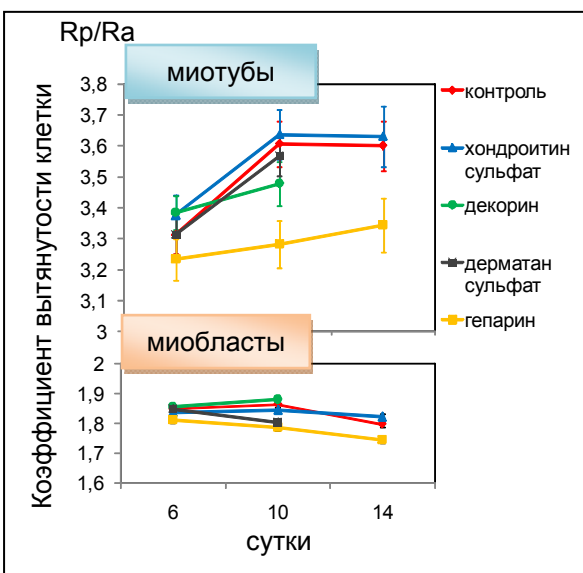
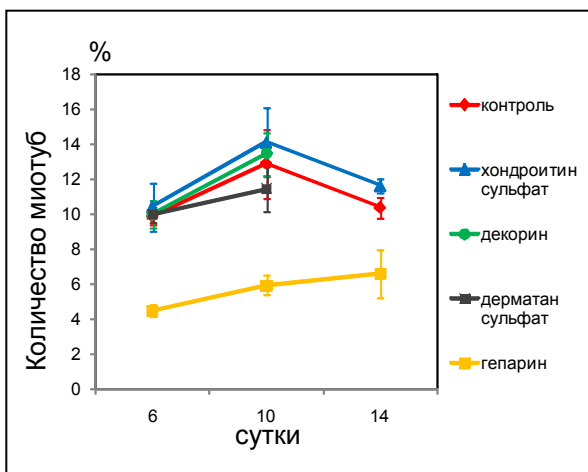


Рис. 13. Изменение вытянутости клетки (миобласта или миотубы) в процессе дифференцировки миобластов на разных сроках культивирования.



На рис. 11 приведены фотографии миобластов, полученные на разных сроках дифференцировки. Анализ фотографий с помощью программы ImageJ позволил выделить две популяции клеток (миотубы и миобласты), которые различались по вытянутости и площади. На рис. 12 и рис. 13 представлена динамика изменения этих параметров клеток в течение 2 нед дифференцировки. Миобласты в целом однородны по площади и вытянутости на всех сроках культивирования, в то время как площадь и степень вытянутости миотуб возрастает в ходе дифференцировки (рис. 12 и рис. 13). Вытянутость миотуб в присутствии гепарина достоверно меньше, чем в контроле, на всех сроках культивирования. Между тем нет различий по вытянутости миотуб между остальными добавками и контролем (рис. 13).

Количество миотуб относительно всех клеток на фотографии возрастает по мере культивирования для всех добавок (рис. 14). В случае гепарина количество миотуб также возрастает, но медленнее, чем в контроле. В присутствии гепарина появляется в среднем в 2 раза меньше миотуб, чем в контроле (рис. 14). В присутствии остальных агентов количество миотуб достоверно не отличается от контроля.

Рис. 14. Изменение относительного количества миотуб в процессе дифференцировки миобластов на разных сроках культивирования.

ВЫВОДЫ

- 1) Доля протеогликанов, выделенных из всех фракций (культуральная среда, клетки и внеклеточный матрикс) культуры миобластов L6J1, составляет 0.04-0.30 % от содержания белка.
- 2) Основным классом протеогликанов культуры миобластов L6J1 являются хондроитин/дерматансульфат протеогликаны, составляющие 91, 51 и 65 % общего количества протеогликанов культуральной среды, клеток и внеклеточного матрикса соответственно.
- 3) По результатам масс-спектрометрического анализа основным хондроитинсульфат-содержащим протеогликаном культуральной среды, кондиционированной миобластами L6J1 является бигликан, а внеклеточного матрикса – версикан.
- 4) Протеогликаны внеклеточного матрикса миобластов L6J1 и культуральной среды, а также хондроитин/дерматансульфат декорин, препятствуют адгезии миобластов. Ферментативная деградация углеводных цепей хондроитиназой ABC устраняет ингибирующее адгезию миобластов действие протеогликанов.
- 5) Углеводные компоненты протеогликанов – гликозаминогликаны – влияют на пролиферацию миобластов L6J1 в присутствии основного фактора роста фибробластов. Дерматансульфат, а также гепарин, в сочетании с фактором роста фибробластов усиливают стимулирующее пролиферацию миобластов действие фактора, тогда как хондроитинсульфат подавляет рост-стимулирующую активность фактора.
- 6) Гликозаминогликан гепарин замедляет дифференцировку миобластов, в то время как другие гликозаминогликаны – хондроитинсульфат, дерматансульфат – и протеогликан декорин не влияют на скорость дифференцировки. Миотубы, образующиеся в присутствии гепарина, имеют менее вытянутую форму.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Мокрушин А.Л., Морозов В.И. Протеогликаны эмбриональных фибробластов крысы RAT 2. Тр. VI Междунар. конференции «Молекулярная генетика соматических клеток», 12-16.12.2005, Москва. С. 94.
2. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Морозов В.И. Выделение протеогликанов из культуры эмбриональных миобластов крысы. 10-я Пущинская школа – конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века», 17-21.04.2006, Пущино. С. 74.
3. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Мокрушин А.Л., Черткова Т.А., Морозов В.И. Протеогликаны культуры трансформированных миобластов крысы L6J1. Цитология. 2006. Т. 48. № 9. С. 762.
4. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Мокрушин А.Л., Черткова Т.А., Романюк А.В., Морозов В.И. Выделение и характеристика протеогликанов культуры миобластов крысы L6J1. Биохимия. 2007. Т. 72. № 4. С. 560-567.
5. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Мокрушин А.Л., Черткова Т.А. Протеогликаны скелетных мышц как регуляторы активности фактора роста гепатоцитов. Тр. 10-й Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье», 20-21.04.2007, Санкт-Петербург. С. 275-276.
6. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Мокрушин А.Л., Черткова Т.А., Морозов В.И. Изучение состава протеогликанов, синтезируемых трансформированными миобластами крысы L6J1 в культуре. Цитология. 2007. Т. 49. № 9. С. 745.
7. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Мокрушин А.Л., Черткова Т.А., Морозов В.И. Протеогликаны внеклеточного матрикса миобластов l6j1. Характеристика и влияние на адгезию миобластов. Тр. IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11-15.05.2008, Новосибирск. С. 108.
8. **Ермакова И.И.**, Сакута Г.А., Мокрушин А.Л., Черткова Т.А., Романюк А.Л., Морозов В.И. Протеогликаны внеклеточного матрикса миобластов l6j1. Характеристика и влияние на адгезию миобластов. Цитология. 2008. Т.50. № 8. С. 692-699.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Alvarez K, Fadic R, Brandan E. (2002) *J. Cell Biochem.*, 85, 703–713 — Bernfield M., Götte M., Park P.W., Reizes O., Fitzgerald M.L., Lincecum J., Zako M. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 729–777 — Brown C.T., Nugent M. A., Lau F. W., Trinkaus-Randall V. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 7111–7119 — Carey D. J., Stahl R. C. (1990) *J. Cell Biol.*, 111, 2053–2062 —

Charge S.B.P., Rudnicki M.A. (2004) *Physiol. Rev.*, 84, 209–238 — Cool S. M., Nurcombe V. (2006) *J. Cell. Biochem.*, 99, 1040–1051 — Cáceres S., Cuellar C., Casar J.C., Garrido J., Schaefer L., Kresse H., Brandan E (2000) *Eur. J. Cell Biol.*, 79, 173–181 — Casar J.C., Cabello-Verrugio C., Olguin H., Aldunate R., Inestrosa N.C., Brandan E. (2004) *J. Cell Sci.*, 117, 73–84 — Droguett R, Cabello-Verrugio C, Riquelme C, Brandan E (2006) *Matrix Biol.*, 25, 332–341 —Evanko S. P., Tammi M. I., Tammi R. H., Wight T. N. (2007) *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 59, 1351–1365 — Iozzo R.V. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 18843–18846 — Iozzo R.V., Murdoch A. D. (1996) *FASEB J.*, 10, 598–614 — Iozzo R.V. (2000) N.Y., Marcel Dekker Inc., 442 p. — Iozzo R.V. (2001). *Methods Mol. Biol.*, 171, 576 p. — Jin P., Sejersen T., Ringertz N.R. (1991) *J Biol Chem.*, 266, 1245–1249 — Kresse H., Schonherr E. (2001) *J. Cell. Physiol.*, 189, 266–274 — Kroll T.G., Peters B.P., Hustad C.M., Jones P.A., Killen P.D., Ruddon R.W. (1994) *J Biol Chem.*, 269, 9270–9277 — Laemmli U.K. (1970) *Nature*, 227, 680–685 — Langsdorf A., Do A.T., Kusche-Gullberg M., Emerson C.P.J., Ai X. (2007) *Dev. Biol.*, 311, 464–477 — Liu C, McFarland DC, Nestor KE, Velleman SG (2006) *Poult Sci.*, 85, 422–428 — Ruoslahti E., Yamaguchi Y. (1991) *Cell*, 64, 867–869 — Taipale J., Keski-Oja J. (1996) *FASEB J.*, 11, 51–59 — Velleman S.G., Liu X., Eggen K.H., Nestor K.E. (1999) *Poult. Sci.*, 78, 1619–1626 — Velleman S.G., Liu C., Coy C.S., McFarland D.C. (2006) *Dev. Growth Differ.* 48, 271–276 — Villena J., Brandan E. (2004) *J. Cell Physiol.*, 198, 169–178 — Yanagishita M., Hascall V.C. (1987) *Methods in Enzymology.*, 138, 279–289 — Young H.E., Carrino D.A., Caplan A.I. (1990) *Mech. Ageing Dev.*, 53, 179–193.