

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доцент Олексій Юрійович Нипорко

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**ЗМІНА ПРОФІЛЮ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ
HERG2 ПІД ВПЛИВОМ ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ
РІЗНОГО ГЕНЕЗУ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

студента спеціальності 091 Біологія

ОП “Біоінформатика та структурна біологія”

Мосейко Владислава Валентиновича

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

к.б.н Драган Анатолій Іванович

Робота виконана у R&D відділі компанії Preci
під керівництвом **А.І. Ганопольського**

Оцінка захисту роботи

Київ 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Мосейко В.В. Зміна профілю експресії білків клітинної лінії HerG2 під впливом екстрацелюлярного матриксу різного генезу – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП “Біоінформатика та структурна біологія”

Ця робота присвячена дослідженню змін профілю експресії білків клітинної лінії HerG2 під впливом екстрацелюлярного матриксу (ЕСМ) різного генезу. Основною метою дослідження було порівняння біополімерного матеріалу на основі ЕСМ, отриманого з саркоми м'яких тканин людини, з комерційно доступним ЕСМ (Matrigel) та визначення їх впливу на морфологію та генетичну експресію клітин HerG2.

У процесі дослідження були розроблені методики отримання високоякісного ЕСМ без використання травних ферментів, таких як пепсин, що дозволило зберегти природну структуру білків. Фізико-хімічна характеристика отриманого біополімеру показала, що він має здатність переходити з рідкого стану при +4°C у гелеподібний стан при +37°C, що робить його перспективним для біомедичних застосувань.

Дослідження морфологічних змін клітин HerG2 показало, що клітини, культивовані на новому ЕСМ, продемонстрували значні зміни, включаючи формування філоподій та перебудову цитоскелета, порівняно з клітинами, культованими на Matrigel та пластиковій поверхні. Це свідчить про підвищену адгезивну здатність та краще імітування природного мікрооточення клітин.

Подальший аналіз експресії генів показав, що під впливом біополімерного матеріалу змінюється активність генів, пов'язаних з адгезією, цитоскелетом та міжклітинними взаємодіями. Підвищена експресія генів, які

кодують колаген-зв'язуючі та фібронектин-зв'язуючі білки, вказує на специфічну молекулярну взаємодію клітин з компонентами ЕСМ, що відкриває нові можливості для розуміння механізмів клітинної поведінки у штучно створеному мікрооточенні.

Порівняльний аналіз з Matrigel показав, що розроблений ЕСМ забезпечує кращу імітацію природного ЕСМ, що підтверджується як морфологічними змінами клітин, так і їхньою генетичною експресією. Це підкреслює ефективність та унікальність розробленого матеріалу, роблячи його перспективним для подальшого використання в тканинній інженерії, біомедичних дослідженнях та клінічних застосуваннях.

Загалом, результати цього дослідження створюють нові можливості для розробки більш ефективних і біологічно адекватних матеріалів, які можуть значно покращити методи лікування та діагностики в сучасній медицині.

Ключові слова: екстрацелюлярний матрикс; ЕСМ; НерG2; експресія генів; білковий профіль; колаген; фібронектин; ламінін; клітинна адгезія; цитоскелет; тканинна інженерія; біомедичні дослідження; гелеутворення; Matrigel.

ABSTRACT

Moseiko V.V. Changes in the Protein Expression Profile of the HepG2 Cell Line under the Influence of Extracellular Matrix of Different Origins – Master's Thesis in the Specialty 091 Biology, Educational Program “Bioinformatics and Structural Biology”

This thesis is dedicated to the investigation of changes in the protein expression profile of the HepG2 cell line under the influence of extracellular matrix (ECM) of different origins. The primary aim of the study was to compare a biopolymer material based on ECM derived from human soft tissue sarcoma with commercially available ECM (Matrigel) and to determine their effects on the morphology and genetic expression of HepG2 cells.

During the study, methods were developed to obtain high-quality ECM without the use of digestive enzymes such as pepsin, which allowed for the preservation of the natural protein structure. The physicochemical characterization of the obtained biopolymer showed that it has the ability to transition from a liquid state at +4°C to a gel-like state at +37°C, making it promising for biomedical applications.

The study of morphological changes in HepG2 cells revealed that cells cultured on the new ECM demonstrated significant changes, including the formation of filopodia and cytoskeleton reorganization, compared to cells cultured on Matrigel and plastic surfaces. This indicates enhanced adhesive capacity and better simulation of the natural cellular microenvironment.

Further gene expression analysis showed that the activity of genes related to adhesion, cytoskeleton, and intercellular interactions changes under the influence of the biopolymer material. Increased expression of genes encoding collagen-binding and fibronectin-binding proteins indicates specific molecular interactions of cells with ECM components, opening new opportunities for understanding the mechanisms of cellular behavior in an artificially created microenvironment.

Comparative analysis with Matrigel demonstrated that the developed ECM provides a better imitation of natural ECM, as evidenced by both morphological changes in cells and their genetic expression. This underscores the effectiveness and uniqueness of the developed material, making it promising for further use in tissue engineering, biomedical research, and clinical applications.

Overall, the results of this study create new opportunities for the development of more effective and biologically adequate materials that can significantly improve treatment and diagnostic methods in modern medicine.

Keywords: extracellular matrix; ECM; HepG2; gene expression; protein profile; collagen; fibronectin; laminin; cell adhesion; cytoskeleton; tissue engineering; biomedical research; gel formation; Matrigel.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ.....	УМОВНИХ	9
ВСТУП.....		13
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....		17
1.1. Типи екстрацелюлярних матриць		17
1.2. Компоненти екстрацелюлярних матриць.....		19
1.2.1. Протеоглікани та гіалуронан.....		19
1.2.2. Колагени.....		20
1.2.2.1. Фібрилярні колагени.....		22
1.2.2.2. Колагени, що утворюють мережі.....		23
1.2.2.3. Колагени, пов'язані з фібрилами		24
1.2.2.4. Колагени, пов'язані з мембраною.....		25
1.2.2.5. Прикріплюючі волокна.....		25
1.2.2.6. Колагени, що формують бусини та філати.....		25
1.2.2.7 MULTIPLEXIN.....		26
1.2.3. Еластин та еластин-асоційовані білки.....		27
1.2.4. Фібронектин.....		29
1.2.5. Ламініни.....		30

1.2.6. Матрицелюлярні білки.....	32
1.3. Протеази позаклітинної матриці.....	34
1.3.1 Матрикс-металопротеази.....	35
1.3.2 Система плазміноген/плазмін.....	36
1.3.3 Протеази катепсину.....	37
1.4. Рецептори екстрацелюлярної матриці.....	38
1.4.1. Інтегрини.....	38
1.4.2. Рецептори домену дискоїдину.....	39
1.4.3. CD44.....	39
1.5 In vitro симулювання ECM.....	40
1.5.1 Шлях до винаходу <i>Matrigel</i> ®.....	40
1.5.2. Пухлина EHS.....	41
1.5.3 <i>Matrigel</i> ®.....	42
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	44
2.1 Атомно-силова мікроскопія.....	44
2.2. Імуноферментний аналіз.....	45

2.3	Покриття	плашки
coating.....		46
2.4	Розморозка первинних гепатоцитів або HepG2	47
2.5	Подвійне покриття плашки overlay/sandwich-cultured для первинних гепатоцитів або HepG2.....	48
2.6	Фарбування та аналіз клітин.....	48
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....		50
3.1	Порівняння складу та властивостей модельних об'єктів	50
3.2	Вплив ЕСМ на морфологію клітин та експресію генів	54
ВИСНОВКИ.....		58
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		60

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ADAMs - A disintegrin and metalloproteases (дисинтегрини та металопротеази)

ADAMTSs - ADAMs with thrombospondin motifs, (ADAMs із мотивами тромбоспондіну)

CS - Chondroitin sulfate (хондроїтин сульфат)

CSPG4 - Chondroitin sulfate proteoglycan 4 (хондроїтин сульфатовий протеоглікан 4)

DDRs - Discoidin domain receptors (рецептори домену дискоїдина)

EMILIN-1 - Elastin microfibril interface located protein 1 (білок, розташований на інтерфейсі мікрофібрила еластину 1)

EGF - Epidermal growth factor (епідермальний фактор росту)

EGFR - Epidermal growth factor receptor (рецептор епідермального фактору росту)

ECMs - Extracellular matrices, (екстрацелюлярні матриці)

ER - Endoplasmic reticulum (ендоплазматична сітка)

EMT - Epithelial-to-mesenchymal transition (епітеліально-мезенхімний перехід)

FACITs - Fibril-associated collagens with interrupted triple helices, (колагени, пов'язані з фібрилями з перерваними трійними спіральними ланцюгами)

FGFs - Fibroblast growth factors (фактори росту фібробластів)

FN - Fibronectin (фібронектин)

GAGs - Glycosaminoglycans (глікозаміноглікани)

HS - Heparan sulfate (гепаран сульфат)

HA - Hyaluronan (гіалуронан)

KS - Keratan sulfate (кератан сульфат)

LG - Laminin globular (глобулярний ламінін)

LCC - Laminin coiled-coil (спіралеподібний ламінін)

LN - Laminin N-terminal (N-кінцевий ламінін)

LOX - Lysyl oxidase (лізілоксидаза)

MMPs - Matrix metalloproteinases (матрикс-металопротеази)

MACITs - Membrane-associated collagens with interrupted triple helices, (колагени, пов'язані з мембраною, з перерваними трійними спіральними ланцюгами)

MT1-MMP - Membrane type 1-MMP (мембранний тип 1-матрикс-металопротеази)

MAGPs - Microfibril-associated glycoproteins (глікопротеїни, пов'язані з мікрофібрилами)

MULTIPLEXIN - Multiple triple-helix domains and interruptions (багатократні домени з трійними спіральними ланцюгами та перервами)

NC - Non-collagenous (неколагеновий)

OPN - Osteopontin (остеопонтин)

PAIs - Plasminogen activator inhibitors (інгібітори активаторів плазміногену)

PGs - Proteoglycans (протеоглікани)

SPARC - Secreted protein acidic and rich in cysteine (виділен білок, кислий та багатий на цистеїн)

SLRPs - Small leucine-rich proteoglycans (малий білок, багатий на лейцин, протеоглікани)

STIM1 - Stromal interaction molecule 1 (молекула взаємодії зі структурою 1)

TNs - Tenascins (тенасцини)

TN-C - Tenascin-C (тенасцин-C)

TN-X - Tenascin-X (тенасцин-X)

TN-W - Tenascin-W (тенасцин-W)

TSP-1 - Thrombospondin-1 (тромбоспондин-1)

tPA - Tissue-type plasminogen activator (тканинний тип активатора плазміногену)

TGF- β - Transforming growth factor- β (фактор зростання, трансформуючий ростовий фактор- β)

TNF- α - Tumor necrosis factor α (фактор некрозу пухлини α)

uPA - Urokinase plasminogen activator (активатор урокінази плазміногену)

VEGFA - Vascular endothelial growth factor A (фактор росту судинного ендотелію А)

VEGFR2 - Vascular endothelial growth factor receptor 2 (рецептор фактору росту судинного ендотелію 2)

ВСТУП

Екстрацелюлярна матриця (ЕСМ) - це неклітинна тривимірна макромолекулярна мережа, що складається з колагенів, протеогліканів/глікозаміногліканів, еластину, фібронектину, ламінінів та кількох інших глікопротеїнів. Компоненти матриці зв'язуються один з одним, а також з рецепторами адгезії клітин, утворюючи складну мережу, в якій розташовані клітини в усіх тканинах і органах. Рецептори на поверхні клітин передають сигнали в клітини від ЕСМ, які регулюють різноманітні клітинні функції, такі як виживання, ріст, міграція і диференціація, і є життєво важливими для збереження нормальної гомеостазу. ЕСМ є високодинамічною структурною мережею, яка постійно піддається ремоделюванню за участю кількох ферментів, що розкладають матрицю, під час нормальних та патологічних умов.

Актуальність цього дослідження зумовлена декількома важливими аспектами, які стосуються сучасної біомедичної науки та медицини. Однією з головних проблем у регенеративній медицині та тканинній інженерії є створення матеріалів, що можуть адекватно імітувати природне мікрооточення клітин. Екстрацелюлярний матрикс (ЕСМ) відіграє критичну роль у забезпеченні структурної підтримки та регуляції клітинної поведінки. Тому розробка біополімерів на основі ЕСМ, які б точно відтворювали властивості природного матриксу, є надзвичайно важливою для просування цих галузей.

Окрім того, сучасні методи дослідження раку потребують більш точних моделей, що здатні відтворювати складні взаємодії між клітинами та їхнім мікрооточенням. Комерційні продукти, такі як Matrigel, мають обмежену схожість з природним ЕСМ людського організму, що може впливати на

точність результатів досліджень і, як наслідок, на ефективність розроблених терапевтичних засобів.

Значущим є і дослідження впливу ЕСМ на морфологію клітин та експресію генів. Взаємодія клітин з їхнім мікрооточенням впливає на безліч клітинних процесів, включаючи проліферацію, диференціацію, адгезію та міграцію. Розуміння цих процесів і можливість їх контролю є ключовими для розробки нових терапевтичних підходів і матеріалів для тканинної інженерії.

Мета даного дослідження полягає в розробці та характеризації біополімерного матеріалу на основі екстрацелюлярного матриксу (ЕСМ) для застосування у тканинній інженерії та біомедичних дослідженнях. Вивчення властивостей цього матеріалу, його впливу на клітинну морфологію та експресію генів має на меті розширити наше розуміння механізмів взаємодії клітин із їхнім мікрооточенням, що може привести до розробки більш ефективних методів тканинної регенерації, лікування захворювань та поліпшення клітинних культур для використання у дослідженнях.

Для вирішення поставленої мети дослідження були сформульовані наступні задачі:

1. Отримання біополімерного матеріалу на основі екстрацелюлярного матриксу (ЕСМ) з використанням певних методів обробки
2. Характеризація фізико-хімічних властивостей отриманого біополімеру, зокрема, його гелеутворення при різних температурах та властивостей в залежності від хімічного складу.
3. Дослідження впливу біополімеру на морфологію клітин, включаючи зміни форми, розміру та цитоскелета, за допомогою клітинних моделей.

4. Аналіз експресії генів клітин під впливом біополімерного матеріалу, що дозволить з'ясувати молекулярні механізми взаємодії клітин із матрицею.
5. Порівняння отриманих результатів з відомими комерційними матеріалами, такими як Matrigel, для оцінки ефективності та унікальності розробленого біополімеру.

Наукова новизна. У цьому дослідженні було вперше розроблено та характеризувано біополімерний матеріал на основі екстрацелюлярного матриксу (ЕСМ) з використанням спеціалізованих методів обробки та децелюляризації. Цей матеріал відрізняється від існуючих комерційних аналогів і має унікальні фізико-хімічні властивості, які роблять його потенційно корисним для застосування у тканинній інженерії та біомедичних дослідженнях. Крім того, вперше досліджено вплив цього біополімерного матеріалу на морфологію клітин та їхню генетичну експресію, що розширює наше розуміння молекулярних механізмів взаємодії між клітинами і їхнім мікрооточенням. Також використано нові клітинні моделі та різноманітні субстрати для культивування клітин, що дозволило провести детальні порівняльні аналізи та зробити висновки про вплив біополімерного матеріалу на різні клітинні системи. Ці новаторські підходи дозволяють поширити наші знання у галузі тканинної інженерії та біомедицини, а також можуть мати практичне значення для розробки нових методів терапії та діагностики захворювань.

Практичне застосування роботи. Використання ЕСМ різного генезу у тривимірних клітинних культурах може значно покращити якість досліджень, пов'язаних із клітинними взаємодіями і морфогенезом. Це важливо для вивчення основних біологічних процесів, а також для розробки нових методів лікування. Застосування цих знань у створенні біоактивних імплантатів та протезів, які сприяють інтеграції з навколишніми тканинами

та стимулюють їх регенерацію, має потенціал для значного покращення результатів лікування пацієнтів.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Типи екстрацелюлярних матриць

Усі тканини та органи містять суміш клітин і неклітинних компонентів, які утворюють організовані мережі - екстрацелюлярні матриці (ECMs). ECMs служать не лише фізичними каркасами, в які вбудовані клітини, але й регулюють багато клітинних процесів, таких як ріст, міграція, диференціація, виживання, гомеостаз та морфогенез [1-3]. ECMs складаються з великої кількості макромолекул матриці, точний склад та структура яких відмінні від тканини до тканини. Основні складові ECMs - це білки, що утворюють волокна, такі як сімейство колагенів, еластин, фібронектин (FN), ламініни, глікопротеїни, протеоглікани (PGs) та глікозаміноглікани (GAGs), які є високомолекулярними і високогідратованими молекулами. У більшості тканин основними складовими ECMs є колаген типу I. У хрящі - колаген типу II. Вони часто зв'язуються з іншими колагенами, а також білками ECM та PGs для створення великих фібрильних структур. Ці супрамолекулярні структури пов'язані між собою іншими молекулами ECM, які також взаємодіють між собою, будуючи складну тривимірну матричну мережу [3].

ECMs можна класифікувати на два основних типи, які відрізняються складом та структурою: інтерстиціальні та перичеллярні матриці. Інтерстиціальні матриці оточують клітини, в той час як перичеллярні матриці знаходяться в непрямому контакті з клітинами. Наприклад, базальна мембрана, яка є типом перичеллярної матриці, розташована на інтерфейсі між паренхімою та сполучною тканиною, надає анкерний шар для паренхімальних клітин, щоб утримувати їх разом і запобігати розриву. Базальні мембрани складаються з колагену типу IV, ламінінів, нідогену 1 і 2,

та протеогліканів, таких як перлекан, агрін, колаген типу XV та колаген типу XVIII [4]. Базальні мембрани складаються з полімеру ламініну, який забезпечує, головним чином, адгезію епітеліальних клітин, і мережі колагену типу IV, яка стабілізує загальну структуру. Обидва білки взаємодіють з іншими компонентами базальної мембрани, які діють як молекулярні з'єднувачі [5]. Наприклад, агрегати, що містять перлекан, відіграють роль у тісному зв'язку мережі колагену типу IV та ламініну [6], а також впливають на гідратацію та, отже, біомеханічні властивості базальних мембран [5].

Клітини, вбудовані в ECMs, взаємодіють із цією макромолекулярною мережею за допомогою своїх поверхневих рецепторів, таких як інтегрини, рецептори домену дискоїдина (DDRs), поверхневі протеоглікани (PGs) та рецептор гіалуронану (HA) CD44. Зміна структури ECM напряду диктує поведінку клітин, саме через взаємодію з переліченими рецепторами. Усі типи клітин (епітеліальні, фібробласти, імунні клітини, ендотеліальні клітини) синтезують та виділяють матричні макромолекули під контролем множини сигналів, що беруть участь у формуванні ECMs. Зміни в складі та структурі компонентів ECMs впливають на загальну структуру та біомеханічні властивості утвореної мережі, а також на передачу сигналів клітинам, модулюючи їхні відповіді. Різноманітні фактори росту, цитокіни та хемокіни відкладаються в межах ECMs, зв'язуючись з конкретними молекулами ECM, і можуть бути вивільнені та діяти протягом фізіологічно значущого часу [7, 8].

Ремоделювання ECM відбувається за фізіологічних умов та у патологічних процесах. Наприклад, протеолітичний розклад, спричинений ферментами, такими як матрикс-металопротеази (MMPs), дисинтегрини та металопротеази (ADAMs), ADAMs із мотивами тромбоспондіну (ADAMTSs), активатори плазміногену, а також розкладання ланцюгів гепаран сульфату (HS), за посередництвом гепаранази, звільняють зв'язуючі з гепарином (Hep)

фактори росту, які, в свою чергу, активують ангиогенез та ріст клітин під час туморогенезу [9]. Зокрема, під час туморогенезу відбуваються значні зміни в ECMs, що призводять до утворення фібротичної стромі зі збільшеною жорсткістю, надмірним осадженням компонентів ЕСМ та вивільненням протеолітичних ферментів, які при активації призводять до прискореного ремоделювання ЕСМ. Активність лізилоксидази (LOX) збільшується та сприяє перехресному зв'язуванню волокон колагену з компонентами ЕСМ, що призводить до збільшення жорсткості матриці [10, 11]. Різноманітні типи клітин в туморному стромі, такі як фібробласти, ендотеліальні клітини, імунні клітини, періцити, а також самі туморні клітини, беруть участь у формуванні дезрегульованих та розгублених ЕСМs, які сприяють та підтримують туморогенез [10].

1.2. Компоненти екстрацелюлярних матриць

1.2.1. Протеоглікани та гіалуронан

Протеоглікани входять до числа найважливіших структурних та функціональних біомакромолекул у тканинах. Вони складаються з ядерного білка, на який ковалентно приєднуються один чи кілька ланцюгів GAG одного або різних типів. GAG - це довгі від'ємно заряджені гетерополісахариди, що містять повторювані дисахаридні фрагменти, складені головним чином з N-ацетильованих гексозамінів (N-ацетил-D-галактозамін або N-ацетил-D-глюкозамін) і D-/L-гексуранової кислоти (D-глюкуронова кислота або L-ідуранова кислота). Існує шість типів глікозаміногліканів: галактозаміноглікани хондроїтин-сульфат (CS) і дерматан-сульфат (DS), та глюкозаміноглікани HS, Нер, кератан-сульфат (KS) і гіалуронан (HA). Загалом, кожен ланцюг GAG - це мозаїка дисахаридних фрагментів змінного числа та структури, комбінація якої

створює надзвичайно гетерогенний мотив, який може бути унікальним для кожного індивідуального ланцюга [12, 13].

Протеоглікани знаходяться в інтрацитоплазматичних відділах та на поверхні клітин, а також в обсяговому ЕСМs. Вони взаємодіють з численними факторами росту, цитокінами та хемокінами, рецепторами клітинної поверхні та молекулами ЕСМ. Зазвичай ця взаємодія відбувається або через білкове ядро або через їхні бічні ланцюги GAG, що беруть участь в кількох функціональних властивостях клітин, таких як сигналізація, проліферація, міграція, диференціація, апоптоз та адгезія [12, 14-17]. Завдяки їхній здатності взаємодіяти з іншими молекулами ЕСМ та клітинами, протеоглікани також важливі для організації ЕСМs, сприяючи формуванню каркасу ЕСМ та вбудовання клітин в нього. Протеоглікани та GAG грають важливу роль у нормальній фізіології та розвитку різних захворювань, оскільки їхній біосинтез відзначається помітними змінами під час перебудови ЕСМ у всіх патологіях [12, 14-17].

1.2.2. Колагени

Колаген є найрозповсюдженішим фібрилярним білком у міжклітинних матрицях всіх тварин. [18]. Відносно нещодавно було відкрито також трансмембранні колагени на поверхні різних типів клітин та того, що вони містять біоактивні пептиди, які вивільняються під час деградації і регулюють важливі клітинні функції. Обидві причини пояснюють високе зацікавлення в біології колагену [18]. Колаген становить до 30% від загальної кількості білків у людині і синтезується та виділяється в міжклітинні матриці в основному фібробластами. Через механічний вплив фібробласти організовують колагенові фібрили в листи та супер-фібрили, суттєво впливаючи на вирівнювання волокон колагену [1].

Суперсімейство колагенів складається з двадцяти восьми різних типів колагену, які формуються принаймні сорока шістьма різними поліпептидними ланцюгами (α -ланцюги) у хребетних. Колаген типу I найбільш розповсюджений із сімейства. Він формує ідеальні гетеротримерні потрійні спіралі, які самовільно формують фібрили. Колаген типу I є основним структурним елементом в тканинах, таких як дерма, кістка, сухожилля, тощо [19]. Колагени відрізняються один від одного за їхньою структурою та властивостями. Наприклад, деякі типи колагену мають дефекти у потрійній спіралі і не самоорганізуються, тоді як інші, такі як трансмембранні колагени, мають широкі дефекти і відіграють важливу роль у сигналізації та адгезії клітин [18].

Характерною особливістю колагенів є структурний мотив, в якому три α -ланцюги відображають поліпроліновий конформний тип гелікалу та сплітаються один з одним з відставанням одного залишку, утворюючи праворуч потрійний спіраль [20]. В кожному α -ланцюзі повторюється трипептид Gly-X-Y, де позиції X та Y часто зайняті проліном та 4-гідроксипроліном, відповідно. α -ланцюги спонтанно формують лівозакручені спіралі через високий вміст проліну, 4-гідроксипроліну та гліцину навіть без утворення водневих зв'язків всередині ланцюга. Водневі зв'язки відповідають за стабілізацію спіралі. Атом водню гліцину в кожному третьому залишку в α -ланцюгах дозволяє їм щільно упаковуватися в потрійний спіраль із цим залишком всередині спіралі, а кільця проліну та 4-гідроксипроліну спрямовані назовні [21]. Колагени також мають не колагенові (NC) домени (наприклад, NC1, NC2, NC3 і т. д.) на обох кінцях, які нумеруються від C-кінця [18]. Ці домени не формують потрійних спіралей, хоча перебувають у конформації α -спіралі.

Біосинтез та структура колагену помітно змінюються під час ремоделінгу міжклітинних матриць при кількох патологіях, включаючи

туморогенез [13, 21]. Зміцнення ЕСМ, викликане падінням розчинності та переплетенням колагену, порушує морфогенез тканини та сприяє злякисному прогресуванню. Збільшення переплетення колагену здійснюється за участю ферментів LOX та його аналогів і сприяє сигналізації через колагенові рецептори клітинної мембрани, такі як інтегрини та DDR, сприяючи прогресуванню пухлини [13].

Колагени можна класифікувати за їхньою загальною гомологією доменів та функціями на сім категорій. До них відносяться фібрилярні та мережеві колагени, FACITs (колагени, пов'язані з фібрилами з перериваними потрійними спіралями), MACITs (мембранозв'язані колагени з перериваними потрійними спіралями), анкерні фібрили, колагени, формуючі бусини та філаменти, а також MULTIPLEXIN (колагени з багатьма потрійними спіралями та дефектами), а також колагени, що виділяють ендостатин [20].

1.2.2.1. Фібрилярні колагени

Фібрилярні колагени включають колагени типів I, II, III, V, XI, XXIV та XXVII. Вони широко представлені в тканинах, надаючи їм тривалу міцність. Молекули колагену з потрійною спіраллю регулярно зсуваються, утворюючи фібрили з періодичністю 67 нм D-періодичних спіралей. Довжина фібрил варіює, а діаметр коливається від 12 нм до понад 500 нм, залежно від стадії розвитку [18]. Правильність формування фібрили також залежить від наявності та структури інших макромолекул в матриці, таких як декорин та біглікан [22]. Фібрилярні колагени мають довгий неперервний колагеновий домен Gly-X-Y, який містить приблизно 1000 залишків, за винятком колагенів типів XXIV та XXVII, в рамках N- і C-кінцевих пропептидів [18].

α -ланцюги утворюють гомо- та гетеротримерні гелікси з NC1-доменами (короткий C-телопептид із C-пропептидом), надаючи правильне вирівнювання та направлення для виведення на третій гелікс [23, 24]. Колаген інтенсивно модифікується на посттрансляційному рівні в ендоплазматичній сітці, проходячи гідроксиляцію, глікозилювання, утворення дисульфідних містків і т. д., перед формуванням потрійної спіралі [25]. α -ланцюги складаються в потрійні спіралі проколагену, яка розщеплюється в N-пропептиди ADAMTS та BMP-1, а в C-пропептиди білками, ідентичними BMP-1/tolloid proteinases та furin, утворюючи тропоколагенову троедину спіраллю [18, 26]. Тропоколагенові потрійні спіралі самостійно утворюються та пакуються, утворюючи мікрофібрили колагену. LOX окислює залишки лізину, що призводить до самостійного утворення гідроксилізил піридиноліну та лізил піридиноліну. Останні утворюють перехресні зв'язки у потрійній спіралі та в телопептидах. Ковалентні перехресні зв'язки стабілізують великі колагенові фібрили, забезпечуючи їхні належні механічні властивості [20].

Хоча один тип колагену зазвичай переважає у волокнах, інші типи колагену та макромолекули матриці також виявляються у контактах та декоруванні волокон колагену, надаючи їм конкретні структурні та функціональні властивості. Окрім функції основного растяжіння тканин, колагенові каркаси надають сигнали клітинам, впливаючи на різні клітинні функції, включаючи міграцію клітин, адгезію, ангиогенез, розвиток та регенерація тканин [1, 18].

1.2.2.2. Колагени, що утворюють мережі

Клас колагенів, що утворюють мережі, включає колагени типів IV, VIII та X. Колаген типу IV, який є прототиповим колагеном, що утворює мережі,

знаходиться в базальних мембранах та відіграє важливу роль у молекулярній фільтрації. З іншого боку, колаген типу VIII розташований у судинних підендотеліальних матрицях, а колаген типу X - в гіпертрофійній зоні хрящової пластини росту [18]. У них є багато дефектів у їхніх потрійних спіральних структурах, що робить їх гнучкими та здатними взаємодіяти один з одним, утворюючи обширні мережі. Фолдинг колагену типу IV починається на С-кінці і відбувається подальше поширення трійної спіралі до N-кінця [27]. Домен NC1 також відіграє важливу роль у асоціації двох тримерних молекул, що призводить до утворення гексамера, який стабілізується ковалентними перехресними зв'язками Met-Lis [28]. Завершенням є зв'язок N-до-N чотирьох молекул колагену, що призводить до утворення двовимірної мережі [18]. Колагени типів VIII та X утворюють багатогранні решітки, утримуючи домени NC1, які також важливі для ініціації супрамолекулярної асоціації [29, 30]. Крім того, вони можуть взаємодіяти з різними компонентами міжклітинної матриці, утворюючи багатомолекулярні комплекси [31].

1.2.2.3. Колагени, пов'язані з фібрилами

Колагени, пов'язані з фібрилами з перерваними трійними спіральними ланцюгами (FACITs) включають колагени типів IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII [20]. Це відносно короткі колагени з доменами NC, які переривають потрійні гелікальні домени, надаючи цим молекулам гнучкість. FACITs взаємодіють з фібрилярними колагенами на їхній поверхні, з'єднуючи колагенові волокна між собою та з іншими молекулами міжклітинної матриці. Наприклад, колаген типу IX ковалентно пов'язаний з поверхнею волокон колагену типу II з колагеновими доменами 1 і 2, які знаходяться між доменами NC1 та NC3 [32]. Домен NC4 виступає в матрицю хряща, а ланцюг CS пов'язаний у регіоні згину NC3 [33]. Колаген типу IX

важливий для цілісності хряща. Відсутність гена $\alpha 1(\text{IX})$ у мишей призводить до важких дефектів у розвитку хряща, а також до дегенеративних змін, які подібні до тих, які відбуваються при остеоартрозі [34]. Колаген типу XII асоціюється з колагенами типу I та II, тоді як колаген типу XIV координується з колагеном типу I не безпосередньо, а через зв'язування з DS-ланцюгами декорину, який асоціюється з волокнами колагену типу I [35].

1.2.2.4. Колагени, пов'язані з мембраною

Колагени, пов'язані з мембраною, з перерваними трійними спіральними ланцюгами (MACITs) - це білки типу II трансмембранного колагену, які мають довгий екстрацелюлярний С-кінцевий домен, складений з колагенових частин, перерваних доменами NC, та короткого цитоплазматичного N-кінцевого домена. До них відносяться колагени типів XIII, XVII, XXIII, XXV, які виділяються невеликим набором клітин, включаючи злоякісні клітини. Вони діють як рецептори на поверхні клітин, впливаючи на їхню адгезію, і після протеолітичного розщеплення вони відділяються від поверхні клітин та утворюють розчинні колагени. Наприклад, ектодомен колагену типу XVII може бути розщеплений ADAMs. Це ефект призводить до пришвидшення руху клітин [36].

1.2.2.5. Прикріплюючі волокна

Колаген типу VII - основна складова прикріплюючих волокон під *lamina densa* базальної мембрани, що з'єднує її зі стромою [18]. Цей тип колагену утворюється за допомогою гомотримеризації $\alpha 1(\text{VII})$ і має центральний колагеновий потрійний гелікальний домен, який переривається коротким доменом NC, обрамленим N- та С-кінцевими доменами NC. Два молекули колагену типу VII димеризуються і подальше збираються, щоб утворити Прикріплюючі волокна.

1.2.2.6. Колагени, що формують бусини та філати

Колагени типів VI, XXVI і XXVIII входять до групи колагенів, що утворюють бусини та філати. Колаген типу VI є найбільш вивченим представником цієї категорії. Він має широке поширення в тканинах, де взаємодіє з різними білками міжклітинної матриці, GA, протеогліканами, а також колагеном типу IV у базальних мембранах. Молекули колагену типу VI формують антипаралельні димери за допомогою вкороченого вирівнювання мономерів. Димери латерально асоціюються, утворюючи тетрамери, які стабілізуються за рахунок утворення дисульфідних зв'язків. Тетрамери з'єднуються на кінцях, утворюючи бусинні філати з бусинами діаметром 25 нм, розташованими на відстані 100 нм одна від одної [35].

1.2.2.7. MULTIPLEXIN

Колагени типів XV і XVIII відносяться до категорії MULTIPLEXINs/endostatin-producing колагенів. Обидва колагени типу XVIII і XV експресуються всюди в усіх васкулярних і епітеліальних базальних мембранах тканин людини. Колаген типу XV між собою з'єднує сусідні волокна колагену, створюючи різноманітні олігомерні комплекси, які сприяють адгезії базальних мембран до стромы підлягаючої тканини [18]. Колагени типів XVIII і XV мають центральний потрійний спіральний колагеновий домен, що чергується з кількома доменами NC, і несе ланцюги CS та HS, відповідно. Колаген XVIII - гомотример, складений з трьох $\alpha 1$ ланцюгів. Він містить десять вкорочених колагенових доменів, обрамлених одинадцятьма NC доменами на їхніх N- та C-кінцях [17]. Колаген XVIII може нести три ланцюги HS [17]. Якщо відбувається розщеплення частини домену NC1, вивільнюється ендостатин, який взаємодіє з численними рецепторами,

включаючи інтегрини $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ та $\alpha v\beta 5$, і VEGFR2. Ці взаємодії руйнують актиновий цитоскелет, спричиняють сигнальний шлях, який призводить до зниження каскаду VEGF і, одночасно, до стимуляції потужних ангіостатичних компонентів, таких як TSP, тим самим стримуючи ангіогенез [14, 17]

1.2.3. Еластин та еластин-асоційовані білки

Еластичні волокна - це великі структури міжклітинного матриксу, які забезпечують розвиток тканин, які піддаються періодичним розтягуючим силам. Такими тканинами є великі еластичні судини, легені, серце, еластичні зв'язки, шкіра, сечовий міхур, а також еластичні хрящі [37].

Еластинові волокна, які присутні в тканинах у вигляді великої мережі, складаються з двох відокремлених компонентів: еластину, що є основною складовою, та мікрофібрил. Еластин - це зшитий полімер мономерного секретованого прекурсора тропоеластину. Тропоеластин - це білок масою 60-70 кДа, який містить періодичні гідрофобні та багаті лізином домену Тропоеластин має тенденцію до самоасоціації, і мало відомо про форму та механізм утворення тропоеластину. Припускається, що молекули тропоеластину самостійно збираються голова-до-хвоста з доменом 10 на голові мономера тропоеластину, щоб поручити домени 19 та 25 на хвості наступного мономера. Лізинові залишки модифікуються LOX або LOX-подібними білками для утворення кросс-зв'язків, які стабілізують полімер та роблять його нерозчинним [37, 38]. Гідрофобні домени еластину відповідальні за еластичні властивості мережі [38].

Мікрофібрили локалізовані в периферії волокна в дорослих тканинах і мають більш складний склад, містячи кілька білків. Припускається, що мікрофібрили надають опору, допомагаючи вирівнюванню та кросс-зв'язуванню молекул еластину [37]. Основні складові мікрофібрил - це багаті

цистеїном глікопротеїни великої маси (близько 350 кДа), фібриліни (фібрилін-1, -2 та -3), які ймовірно виконують структурні ролі в утворенні мікрофібрил, тоді як інші пов'язані білки можуть виконувати регуляторні, а не структурні ролі [39]. Фібрилін містить кальцій-зв'язуючі домени типу EGF, які утворюють структуру, схожу на відерце [40]. Інтегрінові аргінін-гліцин-аспартатні (RGD) послідовності для зв'язування з інтегринами [41, 42], а також домени, які здатні зв'язувати гепарин, і які можуть зв'язувати гепарин-зв'язуючі клітини HSPG [43, 44]. Наявність таких структурних мотивів свідчить про те, що фібрилін може безпосередньо передавати сигнали клітинам, а також сборка фібрилін може вимагати керівництва від конкретних рецепторів клітинної поверхні.

Іншими компонентами мікрофібрил є глікопротеїни, асоційовані з мікрофібрилами (MAGP) (білки MAGP-1 та MAGP-2), які локалізовані в області кульчика мікрофібрил. Це глікопротеїни відносно невеликої маси (близько 20 кДа), які зв'язуються як з тропоеластином, так і з фібрилінами і можуть відігравати важливу роль як мостиковий білок між ними під час збирання еластинових волокон [37, 45]. Фібруліни беруть участь у формуванні еластинових волокон. До цієї родини входить сім видів. Вони мають розмір від 50 до 200 кДа і складаються з повторюваних кальцієзв'язуючих доменів типу EGF та домену фібруліну на С-кінці[46].

Еластин мікрофібрильний інтерфейсований білок 1 (EMILIN-1) - це інший глікопротеїн, який присутній на інтерфейсі між аморфним еластином та мікрофібрилами. EMILIN-1 може регулювати еластогенез, стабілізуючи молекулярні взаємодії між компонентами еластичного волокна. EMILIN-1 взаємодіє з інтегринами $\alpha4/\alpha9/\beta1$ і може з'єднувати клітини з еластичними волокнами, надаючи їм специфічні властивості адгезії [47, 48].

Еластичні волокна розкладаються різними еластолітичними ферментами, включаючи аспартатні протеази, цистеїнові протеази, серинові

протеази. Розкладання еластину звільняє пептидні фрагменти зі значущою біологічною активністю. Патобіологічне значення пептидних фрагментів еластину особливо важливе в органних системах з великою кількістю еластину. Наприклад, надмірне утворення еластину в стінках судин сприяє розвитку атеросклерозу. Пептид еластину Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (VGVAPG) є хемотактичним для обох моноцитів та фібробластів [49]. VGVAPG призводить до міграції гладенької м'язової тканини, що призводить до збільшення інтимального струменя судин та розвитку судинних захворювань, а також має наслідки для прогресування раку через кілька механізмів [49].

1.2.4. Фібронектин

FN широко виражений в екstrasелюлярних матрицях різних типів клітин і відіграє важливу роль у розвитку хребетних тварин [50]. FN складається з двох субодиниць, кожна з яких має приблизний розмір 250 кДа та з'єднана ковалентними зв'язками дисульфідів на їхніх С-терміналах. Ці субодиниці складаються з трьох різних типів модулів: I, II і III повторювань [51, 52]. Ці повторювання мають відмінні структури. Хоча конформації типів I і II утримуються парами інтрамодульних дисульфідних мостів, повторення типу III - це структура 7-веретенного β -бочкового типу, що не містить дисульфідних зв'язків [53] і, отже, може піддаватися конформаційним змінам. Хоча FN кодується одним геном, він існує у формі кількох варіантів [54].

Функційна форма FN в організмі - це його фібрилярний стан. Таким чином, молекули FN повинні бути зібрані в супермолекулярні волокна, діаметр яких коливається від 10 нм до мікрометрів, з довжинами десятків мікрометрів. Ці волокна утворюють взаємопов'язану мережу, яка охоплює великі відстані, наприклад, охоплює незрілі тканини і навіть весь ембріон

[55, 56]. Клітини індукувати полімеризацію FN [57]. Додатково, клітини можуть виробляти свій власний FN, який виділяється та полімеризується в волокна. Нарешті, клітини *in vitro* швидко збирають FN, який адсорбований на поверхні, і використовують його для прикріплення клітин до фібрил [58].

Цей багатодоменний білок містить домени зв'язування з фібрином, колагеном/желатином, гепарином і клітинами. Взаємодія FN з фібрином може брати участь у прикріпленні і/або міграції клітин в фібринових згустках, а також в очищенні фібрину з циркуляції при запальних умовах [44]. Крім того, FN взаємодіє з денатурованим колагеном (желатином) значно ефективніше, ніж з нативним колагеном, що свідчить про те, що розгорнуті регіони трійного спіралевидного колагену відповідальні за ці взаємодії *in vivo* [59]. FN зв'язується з клітинами переважно через інтегринові рецептори [60].

Різноманітні подразники призводять до синтезу або ремоделювання мережових волокон FN. Постійний біосинтез FN необхідне для підтримки наявності попередньо існуючої мережі FN [61, 62]. Матриця FN виробляється в періоди динамічної реконструкції тканин, формування або виправлення дефектів і є обов'язковою під час ембріонального розвитку [63, 64]. Проте матриця FN також активується навколо судин пухлин та, ймовірно, сприяє прогресії пухлин [65-68].

1.2.5. Ламініни

Ламініни - це великі гетеротримерні глікопротеїни крестоподібної форми, які утворюються разом із колагеном типу IV, нідогенами, агрином та перлеканом в базальних мембранах [69, 70]. Кожен гетеротример ламініну складається з одного α -, одного β - та одного ланцюга γ , кожен з яких кодується окремими генами [71]. У хребетних ідентифіковано п'ять α (LAMA1-5), три β (LAMB1-3) та три γ (LAMC1-3) ланцюги. Хоча теоретично

може існувати 51 $\alpha\beta\gamma$ тример, у живих організмів знайдено лише шістнадцять тримерів ламініну через обмеження потенційної взаємодії ланцюгів $\alpha\beta\gamma$, а також їхнього розподілу в тканинах [70, 71].

Назви ламінінів відображають склад їхніх ланцюгів. Так, найбільше вивчений ламінін-111 складається з $\alpha 1$, $\beta 1$ та $\gamma 1$ ланцюгів. Усі ланцюги мають спільні структурні мотиви, такі як великий глобулярний амінопрошарковий домен ламініну (LN-домен) (з винятком усічених ланцюгів $\alpha 3A$, $\alpha 4$ та $\gamma 2$, яким бракує LN-домена), велика рідкопетлева ділянка LE, яка містить один або два глобулярні домени, один в β або γ ланцюгу (L4 або LF, відповідно), або два в α ланцюгу (L4a та L4b). β та γ ланцюги закінчуються ділянкою звитого петлею ламініну (LCC-домен), яка бере участь у тримеризації, за винятком α -ланцюгів, які додатково містять п'ять LG-доменів (LG1-5) на С-кінці [70]. Молекули ламінінів взаємодіють між собою, а також з іншими компонентами ЕСМ та резидентними клітинами, беручи участь у формуванні базальних мембран та клітинному прикріпленні. Наприклад, ламініни зв'язуються між собою через LN-домени, сприяючи самозбиранню молекул ламініну в вищій порядок мереж або полімерів, які знаходяться в базальних мембранах [72]. Більшість молекул ЕСМ та рецепторів на поверхні клітин взаємодіють з LG-доменами в α -ланцюгу, в той час як агрин HSPG взаємодіє з центральною областю ділянки звитого петлею. Перлекан HSPG, фібулін-1 та сульфатиди взаємодіють з LG-доменами, беручи участь у формуванні базальної мембрани. LG-домени також взаємодіють з високою афінністю з рецепторами на поверхні клітин, такими як інтегрини, дистроглікан та синдекани [70]. Різноманітні інтегрини можуть зв'язуватися з ламінінами в основному до LG-доменів, хоча деякі інтегрини також взаємодіють з α LN-доменами. Крім того, С-кінцевий кінець ланцюгів $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ та $\gamma 2$ також бере участь в зв'язуванні з інтегринами [73, 74]. Альфа-дистроглікан має високу афінність до ланцюгів $\alpha 1$ та $\alpha 2$ ламініну, але проявляє меншу афінність до інших α -ланцюгів. Синдекани зв'язують ламініни до LG-доменів, тоді як

глікопротеїн крові. Лютеран зв'язується лише з ламінінами, які містять ланцюги $\alpha 5$ [69]. Взаємодія α -ланцюга з інтегрінами налаштовується за допомогою β - та γ -ланцюгів, оскільки точна комбінація $\alpha\beta\gamma$ впливає на афінність зв'язування рецепторів до ламінінів [70].

Ламініни відіграють ключову роль в ранньому ембріональному розвитку та органогенезі [69]. Розподіл ламінінових ізоформ є тканиноспецифічним, що свідчить про участь конкретних ламінінів у функціях тканин [75]. Вони впливають на диференціацію, адгезію та міграцію клітин і є важливими для підтримки та виживання тканин. Наприклад, ламініни активуються в ушкодженому епітелії, надаючи субстрат клітинам епітелію для адгезії та міграції з метою закриття ушкодженої області та відновлення цілісності епітелію. Вони також впливають на ангіогенез, оскільки є важливими компонентами ендотеліальних базальних мембран [70, 75].

1.2.6. Матрицелюлярні білки

Білки матрицелюлярного типу визначаються як неструктурні екстрацелюлярні модулятори клітинних функцій, сприяючи взаємодії між клітинами і клітин з ЕСМ, а також сприяючи транзиторному клітинному адгезивному режиму, необхідному для клітинної міграції [76, 77, 78]. Незважаючи на структурну варіабельність, білки матрицелюлярного типу містять спільні структурні мотиви ЕСМ і виконують подібні функції [79]. Білки матрицелюлярного типу виявляють помірний рівень експресії в дорослих тканинах. Найбільше вони представлені в молодиз тканинах та в патологічних станах [77, 80].

Експресія білків матрицелюлярного типу регулюється на кількох рівнях різними механізмами: від транскрипційного (альтернативний сплайсинг

їхнього мРНК) до посттрансляційного рівня (включаючи глікозилювання, фосфорилування), а також від епігенетичного (за допомогою мікроРНК та модифікацій ДНК) до внутрішньоклітинних механізмів регуляції часу (за участі генів циркадного годинника) [81]. Крім того, сила клітинної контракції, тертя або розтягування механічних сил сприяють експресії певних білків матрикулярного типу (таких як TSP-1, SPARC та TN-C). Інші (наприклад, остеопонтин, OPN) зникають, що вказує на роль певних членів цієї родини білків в фібротичних умовах [82].

Білки матрикулярного типу [78] взаємодіють з різними клітинними рецепторами завдяки різним структурним мотивам, що дозволяє їм активувати різні сигнальні шляхи. Багато з цих білків можуть зв'язуватися з різними інтегринами, такими як TSP-1, TSP-2, COMP/TSP-5, OPN, TN-C, TN-X, TN-W, CCN1-CCN3, періостин, SPARC та фібулін-5 [78]. Крім того, деякі інтегрини, наприклад, $\alpha\upsilon\beta 3$, можуть бути рецепторами для різних білків матрикулярного типу [78].

Деякі білки матрикулярного типу, такі як TSP-1, TSP-2, TN-C, CCN1, CCN2 та R-spondin, також взаємодіють з гепарансульфатами на поверхні клітин [83]. Крім інтегринів та гепарансульфатів, інші рецептори для білків матрикулярного типу включають рецептори-саважі, такі як LRP-6, CD36 та стабілін-1 [84].

Зв'язування білків матрикулярного типу з неспецифічними рецепторами вважається обмежуючим механізмом доступності та дії цих білків, а також їхніх ефекторів, наприклад, металопротеїназ (MMP). Крім того, існують інші рецептори для білків матрикулярного типу, такі як кальцієвий канал габапентину ($\alpha 2\delta$ -1) для TSP та TLR4 для TN-C, що свідчить про участь цих білків у імунних відповідях [82]. OPN та TSP-4 конкурують за зв'язування з CD44 [85].

На позаклітинному рівні матрицелюлярні білки взаємодіють з клітинами через клітинні рецептори або зв'язуються з факторами росту, такими як VEGF, FGF-2 та латентний TGF- β , що модулює їхню активність та сигналізацію рецепторів факторів росту, таких як EGFR/ErbB2, VEGFR-1 та TGFRI [86].

На внутрішньоклітинному рівні матрицелюлярні білки можуть бути специфічно локалізовані у внутрішньоклітинних компартиментах. Наприклад, таких як ендоплазматичний ретикулум (ER), де TSP-4 взаємодіє з ATF6 α [87]. OPN розташовано на внутрішній поверхні клітинної мембрани. Він утворює комплекси CD44-ezrin/radixin/moesin та регулюючи функції цитоскелета [88]. Деякі матрицелюлярні білки, такі як SPARC і CCN5, локалізовані в ядерних компартиментах, а їхні ролі ще невідомі [78].

Матрицелюлярні білки можуть викликати протуморогенні взаємодії в туморному мікросередовищі [89], наприклад, індукцію епітеліально-мезенхімної трансформації (EMT). Приклади включають періостаїн, який сприяє інвазивності клітин 293T через індукцію EMT [90], або TN-C, який модулює транскрипційну активність β -катеніну та сприяє EMT у колоректальних пухлинах [91]. Деякі матрицелюлярні білки також можуть підвищувати експресію та активність протеаз (наприклад, MMP-2, MMP-12) в пухлинах, збільшуючи метастатичний потенціал, але також можуть бути розщеплені MMP, що генерує білкові фрагменти з властивостями, що сприяють тумору [92].

1.3. Протеази позаклітинної матриці

Протеази становлять більше 2% від загальної кількості генів у геномі людини, підкреслює їхній внесок у фізіологічні клітинні функції як гострих селективних ножиць, що регулюють долю, локалізацію та активність

різноманітних білків, модулюють білок-білкові взаємодії та утворюють нові біоактивні молекули [93].

Протеази (також називають протеїназами, пептидазами та протеолітичними ферментами) представляють велику родину ферментів, які каталізують розщеплення білків на пептиди чи амінокислоти за допомогою гідролізу пептидних зв'язків на їхніх кінцевих частинах (екзопептидази) чи всередині пептидного ланцюга (ендопептидази) [94]. Згідно з базою даних MEROPS, людський деградом містить принаймні 569 протеаз, розподілених внутрішньоклітинно, на поверхні клітини та позаклітинно, і включає п'ять родин протеаз: Металопротеази, Серинові протеази, Цистеїнові протеази, Аспартатні протеази та Треонінові протеази. Ця класифікація базується на хімічному фрагменті, який бере участь у гідролізі [95].

1.3.1 Матрикс-металопротеази

Металопротеаза метцинін, найбільша група протеаз. Вона одержала свою назву за наявністю консервованого мотиву, що зв'язує цинк (HEXXHXXGXXH) на активному сайті. Її каталітична функція та структурна цілісність залежать від іону цинку під час ферментативної реакції [96]. MMP, ADAM і ADAMTS є представниками цієї родини метцинінів.

MMP поділяються на шість груп, враховуючи їхню специфічність до підстрату, схожість послідовності та організацію доменів [97]. Вони є багатодоменими ферментами, але мають спільні структурні риси, такі як амінотермінальний сигнальний пептид для секреції та активація ферменту розщепленням пропептидів. Протеоліз, ініційований MMP, координується на рівні мРНК, перетворенням проферменту та присутністю інгібіторів [49]. Ці металопротеази відіграють ключову роль у багатьох біологічних процесах, включаючи рак [11, 49].

Також до родини металопротеаз, що залежать від цинку, належать ADAMs, поділені на прив'язані до мембран ADAMs і виділені ADAMTS. У більшості вони мають спільні риси, такі як дизінтегрин, цистеїновий багатство та домени EGF. Їхні дії включають вивільнення факторів росту та цитокінів в ECM і модифікацію взаємодій між клітинами та матрицею [98].

1.3.2 Система плазміноген/плазмін

Система активації плазміногену/плазміну грає ключову роль в різноманітних нормальних і патологічних процесах, забезпечуючи регуляцію розкладання фібрину, оборот матриці та міграцію клітин [99]. Цей протеолітичний ензиматичний каскад включає в себе урокіназу плазміногену (uPA) та тканинний плазміноген-активатор (tPA), які є сериновими протеазами і відіграють роль основних посередників активації плазміногену.

Фібринолітичні протеази мають функційно автономні регіони, такі як крінгл, подібні до фактора росту та домени пальців, які взаємодіють з молекулами ECM та забезпечують активацію плазміну [100]. Урокіназа та tPA діють як посередники активації, сприяючи утворенню плазміну. Зв'язування їх до фібрину та клітинних поверхонь підвищує їхню активність. Також діє система інгібіторів, яка включає PAIs, α 2-антиплазмін і α 2-макроглобулін, які контролюють активність протеаз та плазміну [101].

Система активації плазміногену/плазміну взаємодіє з іншими протеолітичними мережами, такими як MMP, система згортання і система комплементу. Ця взаємодія важлива для різних фізіологічних і патологічних

процесів, включаючи прогресію раку. Активація плазміну призводить до протеолітичного каскаду з розкладанням молекул ЕСМ, вивільненням факторів росту і цитокінів, а також активацією ММР [102]. Крім протеолітичної активності, прив'язка до рецепторів uPA і tPA впливає на внутрішню сигналізацію, регулюючи ріст, адгезію та міграцію клітин [102].

1.3.3 Протеази катепсини

Катепсини - це велика сім'я протеаз трьох різних механістичних класів: Катепсини D і E (аспартатні протеази), Катепсини A і G (серинові протеази), та Катепсини B, C, F, H, L, K, O, S, V, X і W (цистеїнові протеази) [95].

Основні та найбільш вивчені представники сім'ї катепсинів - це цистеїнові катепсини з консервованим активним сайтом, що формується цистеїном та гістидином . Більшість цистеїнових катепсинів виявляють ендопептидазну та екзопептидазну активність, створюючи потенційно різні варіанти підстратів. Катепсин В володіє обома ензиматичними функціями. Катепсини також мають унікальний профіль експресії залежно від типу клітин та тканин. Катепсини B, H, L, C, X, F, O і V експресуються в тканинах людини універсально [103]. Вони синтезуються у вигляді неактивних попередників, і для їхньої активації потрібні специфічні умови в лізосомах та ендосомах, такі як редукуюче та слабокисле середовище [104].

Ендогенні інгібітори, такі як цистатини, тісно контролюють активність катепсинів, захищаючи від випадкового вивільнення у різних клітинних

місцях. Їх активацію можна регулювати взаємодіями з GAG і/або PG, а також за дією інших протеаз [16].

Протеолітична специфічність та функції цистеїнових катепсинів залежать від їхньої локалізації на клітинних мембранах, секретованих та внутрішньоклітинних структурах. Вони беруть участь у процесах, таких як ремоделювання кісток, синтез гормонів, представлення антигенів в імунній системі. У кислому позаклітинному мікросередовищі у ракових пухлинах цистеїнові катепсини взаємодіють у протеолітичних шляхах, сприяючи прогресії раку. Можливі екстрацелюлярні ролі цистеїнових катепсинів включають розщеплення білків ЕСМ, таких як ламінін, колаген типу IV, білки адгезії клітин, матрикулярні білки та активацію протоензимів, наприклад, прото-uPA [105].

1.4. Рецептори екстрацелюлярної матриці

Окрім описаних вище поверхневих глікопротеїнів PG, таких як синдекани та гліпікани, інші рецептори ЕСМ включають дві основні сім'ї рецепторів - інтегрини та DDRs, а також рецептор на HA CD44.

1.4.1. Інтегрини

Інтегрини відіграють важливу роль у клітинній адгезії та з'єднують актиновий цитоскелет з ЕСМ. Інтегрини не лише виконують якорну роль для клітин, але є медіатори входу сенсорних сигналів через механотрансдукцію та взаємодію з сигнальними шляхами. Ці трансмембранні рецептори, що взаємодіють з ЕСМ, складаються з гетеродимерних підодиниць, утворюючи різноманітні димери. Більшість

інтегринів взаємодіють з білками, містять RGD, такими як FN, фібриноген та вітронектин. Інтегрини передають інформацію від ECM до клітини, взаємодіючи з іншими молекулами, такими як тирозинкінази FAK та Src [60]. Активація інтегринів може відбуватися внутрішньоклітинним шляхом, впливаючи на їхній афінність до лігандів ECM та викликаючи клітинні міграцію та адгезійні процеси. Зв'язування інтегринів з колагенами відбувається за участю конкретних підодиниць і викликає конформаційні зміни, впливаючи на сигналінг через клітинну мембрану. Точні механізми розрізнення інтегринами фібрилярних та нефібрилярних колагенів ще потребують досліджень.

1.4.2. Рецептори домену дискоїдину

Існують дві форми DDR: DDR1 переважно розташований в епітеліальних клітинах, тоді як DDR2 зустрічається у мезенхімальних клітинах. Ці рецептори тирозинових кіназ активуються взаємодією з колагенами [106]. Обидва DDR мають подібну структуру, включаючи домени дискоїдинової гомології, трансмембранний домен та тирозиновий кіназний домен. DDR беруть участь у різних процесах, таких як органогенез, ремоделювання ECM, рак та атеросклероз [107].

Сайт зв'язування з колагенами розташований у домені DS, і взаємодія потребує природної конформації колагену, що містить потрійну спіраль. DDR1 зв'язується з колагенами I і IV, DDR2 - з колагенами I, II і X, не з колагеном IV. Тирозинове фосфорилування цитоплазматичного домену DDR веде до створення сайтів зв'язування адапторних білків, таких як ShcA, Nck2 [106].

Взаємодія між інтегринами та DDR може бути як стимулюючою, так і інгібіуючою в залежності від клітинного контексту. Наприклад, в клітинах підшлункової залози колаген I може одночасно активувати бета1-інтегрин та

DDR1, сприяючи EMT [107]. Активація DDR1 може викликати інгібування фосфорилування STAT1/3, сприяючи при цьому зменшенню міграції клітин [108]. Рівень експресії DDR є підвищеним у різних типах раку. DDR1 є маркером туморогенезу [109].

1.4.3. CD44

CD44 - глікопротеїн, що діє як поверхневий рецептор для гіалуронану та інших лігандів, таких як OPN, FN, колаген, фактори росту, MMP та інші [110]. Молекули CD44 мають велику гетерогенність через альтернативний сплайсинг та глікозиляції. З структурної точки зору, CD44 містить ектодомен з варіабельними вставками екзонів, трансмембранний домен та цитоплазматичний домен [111].

Цитоплазматичний домен CD44 взаємодіє з різними внутрішньоклітинними білками, регулюючи клітинні функції [112]. У контексті ракових клітин, структурно-функціональні зміни в CD44 пов'язані з мікросередовищем пухлини, що сприяє туморогенезу [113]. Роль CD44 у сигнальних шляхах та як маркер ракових стовбурових клітин свідчать про його ключову участь у туморогенезі та можливість використання як мішені в лікуванні раку [114].

1.5 In vitro симулювання ЕСМ

1.5.1 Шлях до винаходу *Matrigel*®

Лабораторія розвитку біології та аномалій (LDBA) була створена у 1972 році в Національному інституті дентальних досліджень, NIH, як відгалуження Лабораторії біохімії, де було проведено багато робіт,

пов'язаних із визначенням колагену Карлом Пієцем та його колегами. LDBA також цікавилася роллю компонентів позаклітинного матриксу в розвитку та захворюваннях. У межах цього інтересу Барбара Сміт (на даний момент працює в Бостонському університеті) проводила дослідження імплантацію хонросаркоми криси, наданого Річардом Свармом (Roche), який зібрав кілька таких пухлин і підтримував їх для дослідження. Працюючи у співпраці з Річардом Свармом, Тедом Міллером (винахідником генетично різних колагенів) та Альбертом Дорфманом (Університет Чикаго), Барбара Сміт встановила, що колаген в цій пухлині є типовим колагеном хряща типу II [115]. Це було початковим досвідом LDBA у використанні пухлин як модельних систем для вивчення позаклітинного матриксу.

1.5.2. Пухлина EHS

Розлін Оркін, у 1975 році працюючи в Школі медицини Гарварда, провела дослідження іншої пухлини ксентотрансплантованої в мишу, спочатку ідентифікованої як погано диференційований хондрозаркома [116]. Ця пухлина, вивчена ультраструктурними та амінокислотними аналізами, виявилася відмінною від хряща та схожою на базальну мембрану за протеомом [116]. Внаслідок цього вони назвали її пухлиною EHS на честь J. Енгельбрет-Хольма та Річарда Сварма [116].

Порівняльний аналіз генетичної експресії вказав, що пухлина EHS, ймовірно, походить від парієтального ендодерму [117].

Пухлина EHS стала об'єктом вивчення через її швидкий ріст у мишах та доброякісний характер. Вона надавала велику кількість компонентів базальної мембрани і виявилася важливим джерелом для дослідження структури та функцій базальної мембрани [118].

Памела Герон Робей, яка працювала в групі Леонарда Девідсона та Бетесді, активно долучилася до досліджень структури базальної мембрани та

її компонентів, зокрема ламініну. Вона вивчила великий та унікальний глікопротеїн, який Леонард Девідсон та інші нарекли ламініном [119]. Гордон Лорі продовжив дослідження цієї пухлини, визначаючи місця в колагені IV, ламініні та перлекані, де вони зв'язувалися між собою [120]. Ленс Ліотта ідентифікував фермент, який пізніше став відомий як металопротеаза-2 (ММР-2), розщеплюючи колаген базальної мембрани [121]. Деррік Грант вказав на те, що колаген IV, ламінін та перлекан утворюють визначений супрамолекулярний комплекс [122].

1.5.3 *Matrigel*®

Хінда Кляйнман приєдналася до LDBA у 1975 році для дослідження молекулярних взаємодій клітин з компонентами позаклітинного матриксу. Вивчалася активність прикріплення ламініну, що виявило, що він сприяє прикріпленню епітеліальних, ендотеліальних та пухлинних клітин, а фібробласти не прикріплювались [123]. У 1983 році Кляйнман почала працювати з екстрактами пухлини EHS, використовуючи 20% NaCl та 2 М сечовини для екстрагування матриксу. Після центрифугування в'язкий супернатант діалізували проти PBS при низькій температурі. Утворений розчин, який підігрівали до 37 °С, утворював міцний прозорий гель [124]. Цей матеріал пізніше отримав назву Matrigel.

Matrigel випробувався на здатність підтримувати ріст клітин. Меланоцити забарвлювались, ендотеліальні клітини формували трубкоподібні структури [124,125]. У 1984 році LDBA була відвідана командою під керівництвом Елізабет Хей (Медична школа Гарварда). Її експерименти стали початком інтересу вчених до Matrigel, що призвело до комерціалізації через технологічний трансфер NIX.

Matrigel сприяє диференціації багатьох типів клітин, а також росту диференційованих клітин із тканинних експлантатів [126]. Він зберігається у замороженому стані, зазвичай у середовищі 10–15 мг/мл, розморожується протягом ночі при 4 °C і застується при температурі 24–37 °C протягом 30 хвилин. Гель розчиняється при охолодженні. Клітини, як правило, висіваються на верхній частині застиглому матеріалу, але їх можна також змішувати з матрицею перед застиганням. Багато клітинних ліній, а також первинних клітин, не проліферують, але диференціюються під впливом цієї матриці. Як морфологія, так і гени, що виражаються клітинами на Matrigel, відображають більш диференційований фенотип. Епітеліальні клітини, такі як сертолієві клітини, стають більш стовпчастими на верхній частині гелю і утворюють великі залозоподібні структури із просвітниками, коли їх змішують всередині матриці [126]. При будь-яких з умов культури ці клітини є більш диференційованими, ніж при культурі на пластикових підложках, та зберігають асоційовані з ними герм-клітини.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Атомно-силова мікроскопія

Атомно-силова мікроскопія – метод, що використовується для відтворення вигляду поверхні (чи великої молекули) з точністю до окремого атома, шляхом механічного дослідження контурів поверхні за допомогою спеціальної скануючої голки, мікроскопічний рух якої вгору та вниз при пересуванні над поверхнею фіксується спеціальним п'єзоелектричним сенсором.

Було приготовано 0.0233 М (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) 0.05 М NaOH у метанолі у співвідношенні n:150, де n - кількість зразків, що готуються.

Зразки слюди були поміщені у ванну для приготування AFM-міса з робочим розчином при перемішуванні на 45 хвилин. Зразки слюди, було промито у метанолі та висушено. 20 мкл глутарового альдегіду було нанесено на зразки слюди за допомогою самплера. За 1 хвилину зразки було промито метанолом. [127]

За допомогою самплера було нанесено на поверхню модифікованої слюди 20 мкл ЕСМ. За допомогою мазкової техніки краплину було розподілено ЕСМ по всій поверхні модифікованої слюди. [127]

Аналіз зразків здійснюється на атомно-силовому мікроскопі NanoScope IIIa Dimension 3000tm (Bruker Corp.) у Інституті фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова НАН України. Результатами є знімок поверхні модифікованої слюди з ЕСМ у форматі .gwy та .jpg.

2.2. Імуноферментний аналіз

Стандартні, досліджувані та контрольні (нульові) у лунки на попередньо покритій плашці і зафіксовано їх положення. Розчин додано на дно кожної лунки, не доторкаючись до бічних стінок. Додайте 100 мкл розведених стандартів у стандартні лунки. 100 мкл стандартного розчину аналітичного антитіла було додано у контрольні (нульові) лунки. 100 мкл належно розведеного зразка у лунки для зразків було додано. Зразки інкубувалися протягом 1 години [128]

Рідина була прибрана з лунок. Було додано 100 мкл робочого розчину реагента А в кожен отвір. Пластина була накрита кришкою та інкубувалася протягом 1 години при 37°C. Видаліть кришку та викиньте розчин. Плашка була промита 3 рази 1X промивним буфером. Повне видалення рідини на кожному етапі є важливим для гарної продуктивності. Після останнього промивання будь-який залишок промивного буфера було видалено, відсмоктавши або виливши. 100 мкл робочого розчину реагента В було додано в кожну лунку. Плашку було закрито та інкубувалося протягом 30 хвилин при 37°C.

Кришку було знято, розчин викинуто і плашка промита 5 разів 1X промивним буфером. 90 мкл ТМБ субстрату було додано в кожну лунку. Інкубувалося при 37°C протягом 10-20 хвилин, уникаючи впливу світла.

50 мкл стоп-розчину було додано в кожну лунку. Важливо, щоб стоп-розчин швидко і рівномірно змішувався по всій плашці, щоб повністю деактивувати фермент. Переконайтеся, що на дні пластини немає відбитків пальців або води, а рідина в отворах вільна від бульбашок. Виміряйте оптичну щільність при 450 нм негайно.

Для обчислень, середні значення оптичної щільності при 450 нм було обчислено для кожного стандарту посилання та кожного зразка, а потім відніміть середнє значення оптичної щільності контрольного (нульового) отвору.

(Відносна оптична щільність) = (Оптична щільність кожного отвору) - (Оптична щільність нульового отвору)

Стандартна крива може бути побудована як відносна оптична щільність кожного розчину стандарту посилання (X) проти відповідної концентрації кожного розчину стандарту (Y). Концентрацію зразків можна інтерполювати зі стандартної кривої. [128]

2.3 Покриття плашки coating

Пробірка із розчином ЕСМ була розморожена протягом ночі в холодильнику за температури від 2 °С до 6 °С. Всі розхідні матеріали включаючи плашку та наконечники були покладені в холодильник за температури від 2 °С до 6 °С мінімум на 1 годину. Інтенсивно перемішано розчин ЕСМ піпетуванням 20-30 разів, не допускаючи піноутворення. Необхідний об'єм робочого розчину розраховується виходячи із кількості лунок, що використовуються: Рекомендований об'єм розчину ЕСМ (мкл/см² площі плашки)

- для тонкого шару 50 мкл
- для товстого шару 150-200 мкл

Розчин ЕСМ у охолоджену середовищі DMEM/F12 було приготовано у співвідношенні 1:40. Планшет інкубувався при 37°C/5%CO₂ щонайменше 2 години. Доки триває інкубація середовище та клітини для

подальшого посіву було підготовано. Після інкубації аспіруйте із лунок надлишок рідини. Одразу після аспірації приступіть до посіву клітин, неможна допускати висихання розчину ЕСМ[129].

2.4 Розморозка первинних гепатоцитів або HepG2

Підготовлено 16 мл ізотонічного Percoll (тобто 90% Percoll та 10% 10× концентрованого PBS) у 50-мільні пробірку для центрифуги та додайте 25 мл розморожувального середовища. Це середовище було розігріто до 37 °С та трималося в водяній бані, поки клітини розморожуються. Флакони було поміщено у водяну баню при +37°C. Обережно до повного розтанування кристалів льоду клітини інкубувалися. У шафі з ламінарним потоком флакон було відкрито і клітини були поміщені в пробірку для центрифуги з сумішшю попередньо розігрітого розморожувального середовища та ізотонічного Percoll. Розчин було розведено до об'єму 50 мл розморожувального середовища при 37 °С. Кришку закрито і пробірку повертали повільно 2-3 рази для ресуспензії клітин. Центрифуговано при 168 × g та кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Надлишок надлишку вилито та клітини розсуспендовано в 20 мл розморожувального середовища при 37 °С. Для гепатоцитів людини суспензію клітин центрифуговано при 100 × g та кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Надлишок викинуто та ресуспендовано в посівному середовищі для кріопозбережених гепатоцитів при 37 °С (тобто близько 3 мл на 10 мільйонів клітин) [129].

2.5 Подвійне покриття плашки overlay/sandwich-cultured для первинних гепатоцитів або HepG2

Клітинна суспензія була розведена до концентрації 1×10^6 клітин/мл з посівним середовищем при 4 °C. Одразу після аспірації надлишкової рідини зі щойно покритої ЕСМ плашки внеслась необхідна кількість клітинної суспензії. Планшет був перенесений до інкубатора 37°C/5%CO₂ і обережно перемішаний в горизонтальній площині обертальними рухами, щоб клітини рівномірно розподілилися на дні кожної лунки. Планшет із клітинами інкубувався протягом 24 годин. Розчин ЕСМ із DMEM/F12 у співвідношенні був приготовлений у співвідношенні 1:40 для повторного покриття. Плашка струсилась, щоб ресуспендувати неприклеєні клітини. Після того як аспірація була виконана, розчин ЕСМ із DMEM/F12 для повторного покриття давався максимально швидко. Планшет був переміщений до інкубатора 37°C/5%CO₂. Через 24 години культуральне середовище замінилось. Наші sandwich-cultured клітини були готові до подальшої роботи. Людські sandwich-cultured гепатоцити зазвичай зберігаються мінімум 6 днів. Жовчні каналці утворюються через 5 днів посіву. [129]

2.6 Фарбування та аналіз клітин

Спочатку був приготовлений розчин барвника. Для цього барвник життєздатності центрифугувався протягом 15 секунд у мікроцентрифузі для збору всіх речовин на дні флакона. 25 мкл DMSO додали у флакон. Вміст флакона добре вортексували для розчинення і коротко центрифугували ще раз, щоб зібрати всю рідину на дні флакона.

Залишений розчин барвника життєздатності зберігали при температурі -15 до -25 °C. [130] Після розморожування флакони коротко вортексувались. Флакони захищаються від впливу світла протягом всієї процедури.

5 мкл Ядерного Барвника розводились в 5 мл 1x PBS для клітинного культивування і вортексувались. 25 мкл Барвника мертвих клітин додавались до суміші і вортексувались. 3 мкл Барвника живих клітин додавались до суміші і вортексувались. 50 мкл суміші барвників піпетуються в кожену ячейку плашки.

Одразу після додавання суміш барвників та середовища в ячейках коротко премішувались за допомогою піпеток для рівномірного розподілу суміші в ячейках. Для адгезивних клітин обережно піпетувалась суміш барвників в ячейки, щоб забезпечити, що клітини залишаються прикріпленими до плашки. Планшет інкубувався протягом 30 хвилин при +37 °C. [130]

Плашка аналізується щодо кількості клітин та їх живучості за допомогою флуоресцентного мікроскопу з відповідними фільтрами екстинкції та емісії (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1. Параметри довжин хвиль для візуалізації клітин

	Емісія, нм	Екстинкція, нм	Колір під час візуалізації
Ядра клітин	486	361	синій
Мертві клітини	617	535	червоний
Живі клітини	515	490	зелений

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Порівняння складу та властивостей модельних об'єктів

В якості модельного об'єкта був обраний біополімер на основі екстарацельюлярного матриксу із саркоми м'яких тканин людини, так як в ньому знаходиться велика кількість структурних білків по відношенню до клітинних структур і у легкості доступу до післяопераційного матеріалу.

Коротко, матеріал було отримано шляхом розпушування полімерної системи децелюларизованого структурного білка саркоми людини. Після цього білкова суміш була гомогенізована та відбувся обмін розчинника на фізіологічний. Отриманий полімер має властивість бути рідким при $+4^{\circ}\text{C}$ та гелеподібним при $+37^{\circ}\text{C}$. Діаліз відбувався у клітинному середовищі ДМЕМ для насичення суспензії необхідними солями та вітамінами для росту клітин. Процедура виділення є інтелектуальною власністю Preci та не може підлягати публічному розголошенню.

ЕСМ є високорозгалуженою полімерною мережею, з відносною нечіткою визначеністю точного стану. Як рідка фаза, вона може підтримувати дифузію сполук та високий рівень динаміки структури. Незважаючи на це, вона виявляє ригідність та в'язкопружність, подібні до твердого стану. Ленне та Триведі описали це як "заблокований" стан. Під час розвитку організму мережа може перетворюватися від твердо організованої структури до рідинного неупорядкованого стану. Ця динаміка є ключем до підтримки морфогенезу.

Колаген як основний складовий ЕСМ утворює полімерну мережу зі своєї потрійної спіральної структури. Ця потрійна спіральна мережа має тимчасову стабільність в області +32-40 градусів Цельсія при фізіологічному рН, плавлячись після певної температурної точки. Відновлення колагену в кислому середовищі та подальша нейтралізація призводить до соль-гельної суміші, яка має критичну точку гелеутворення приблизно +35 градусів. Крім того, фібронектин, еластин, ламінін, які часто містять полісахаридні фрагменти, сприяють ригідності утвореної мережі. Протягом значного періоду часу колаген, екстракт базальної мембрани та різні природні, напівсинтетичні та синтетичні гідрогелі служили моделлю для зовнішньоклітинної матриці. Гідрогелі, які є кінетично ув'язненим коллоїдним станом полімерів, описують як кінетичну, так і термодинамічну природу упорядкування ЕСМ.

Концентрація білку визначалась за допомогою ВСА тестів і складала 14.2 мг/мл

Як контроль використовувався полімер розроблений компанією Corning під назвою Matrigel, екстракт EHS саркоми, полімеризація якого відбувається за рахунок утворення Ламінінової мережі.



Рис. 3.1 - Гідрогель білкової природи за температури +37

Для подальшої роботи із даним розчином був проведений імуноферментний аналіз для визначення основних компонентів результати наведені в таблиці 3.1 у порівнянні із Matrigel

Таблиця 3.1 Склад модельних біополімерів

	Matrigel [131]	ЕСМ з саркоми
Колаген 1		43.02 +/- 1.59
Колаген 2		0.15+/- 0.009
Колаген 3		5.4 +/- 0.59
Колаген 4	30%	0
Колаген 5		0.029+/-0.003
Колаген 6		1.51 +/- 0.028
Ламінін	60%	5.49 +/- 0.01
Ентакін	8%	-
Фібронектин		28.93 +/- 0.19
Еластин		22.42 +/- 1.21
Тенасцин		0.028 +/- 0.01
Гіпарінсульфат	2-3%	-

Білкове співвідношення ЕСМ екстрагованого нами більш ідентичне до людського організму аніж Matrigel. Виходячи з базового розуміння наповнення матриксних білків в базальному та структурного ЕСМ можемо помітити наступні особливості отриманої полімерної суміші:

1. Високий вміст колагену I, фібронектину та еластину каже про високу ефективність екстракції структурного ЕСМ
2. З іншої сторони, високий вміст ламініну свідчить про наявність базального компоненту

3. Відсутність колагену IV свідчить про сильну диференціацію базальної мембрани.

Загалом отриманий полімер є гібридом базального та структурного ЕСМ, а отже може призвести до несподіваних клітинних ефектів.

Важливим моментом є те що при виробництві Matrigel та аналогічних біополімерів завжди використовуються травні ферменти такі як пепсин. У нашому випадку нам вдалось оминати цей крок. Як результат цього під час полімеризації ЕСМ нашого виробництва в нас відбувається рефолдінг колагену, що підтверджується даними атомно-силової мікроскопії (Рис. 3.2).

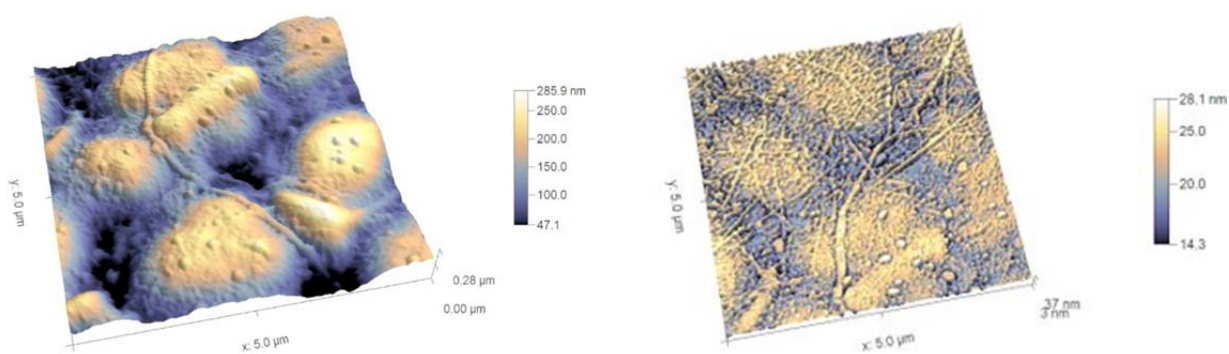


Рис. 3.2 – Атомно-силова мікроскопія заполімеризованого ЕСМ людського походження

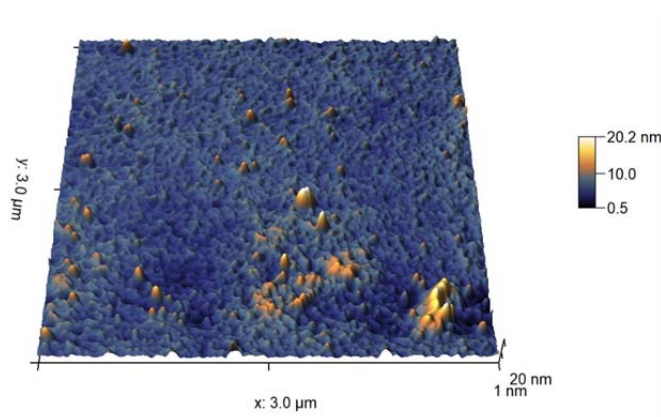


Рис. 3.3 – Атомно-силова мікроскопія заполімеризованого Matrigel

Як видно із на рисунку 3.2 спостерігається велика кількість фібрилярних структур, характерних для колагенів I, II, III, V, XI, XXIV типів [18] у той час як у Matrigel вони відсутні (Рис. 3.3). При більш детальному вивченні знімків (Рис. 3.4) можна помітити характерні для колагену D-періоди [132]

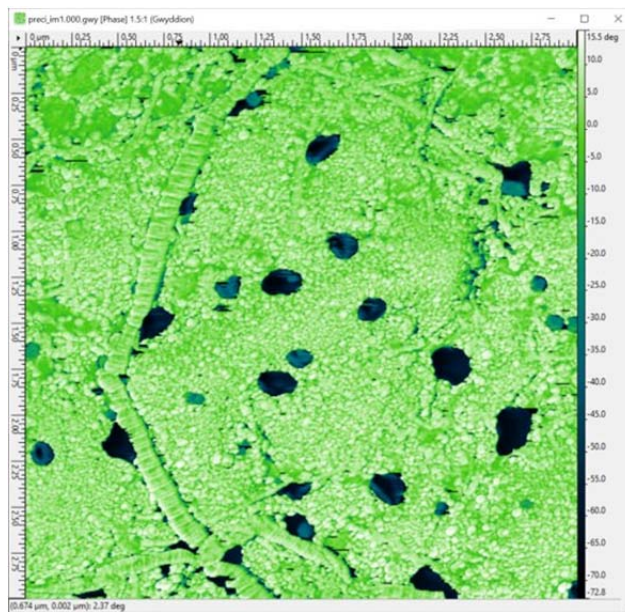


Рис. 3.4 -D період контрастований на фоні інших білкових колоїдів

3.2 Вплив ЕСМ на морфологію клітин та експресію генів

Зв'язок між морфологією клітин та їхньою експресією генів виявляється ключовим в регулюванні клітинної функції та поведінки. Морфологічні зміни клітин, такі як зміни форми, розміру, адгезійної здатності та цитоскелета, можуть впливати на активність різних генів та їхню експресію. Кореляція між зміною морфології клітин та експресії генів на різних матеріалах, включаючи екстрацелюлярний матрикс, була показана у багатьох дослідженнях. [133-136]

Біологічно активний склад матриксу може стимулювати диференціацію, а відносна жорсткість чистого матриксу (з більшими гелеутворюючими властивостями) може бути додатково необхідною для фізичної підтримки формування цитоскелету.

В рамках власного дослідження для оцінки зміни морфології клітин під впливом різних умов для адгезії було обрано іморталізовану лінію клітин НерG2. Для порівняння клітин були використані три різні субстрати: Corning Matrigel, екстрацелюлярний матрикс людської саркоми та пластик. Візуалізація була проведена після десяти днів культивування. Виявлено, що клітини, розміщені на пластиковій поверхні та Matrigel, проявляли схожу, округлу морфологію. У той час як клітини, культивовані на екстрацелюлярному матриксі, відрізнялися за відростками та стрічкоподібною формою. (Рис. 3.5)

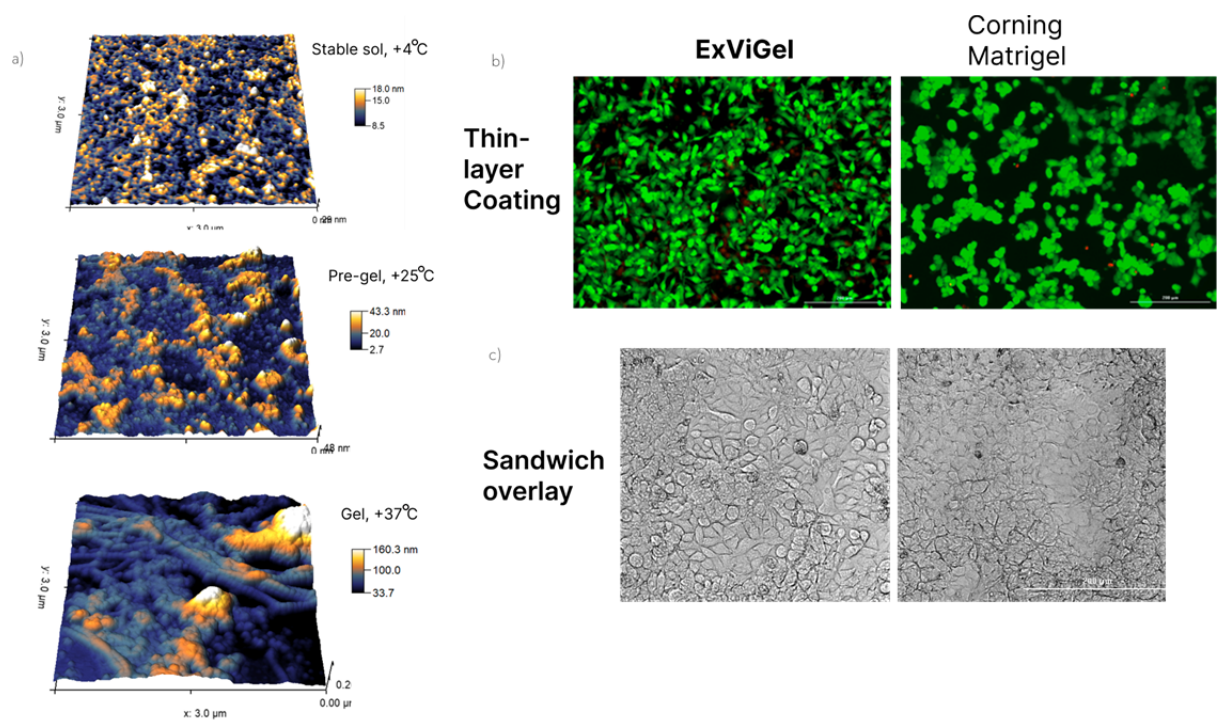


Рис. 3.5. А) Ілюстрації процесу рефолдингу Колагенових волокон у людському ЕСМ, В) Забарвлено кальцеїном зображення клітин НерG2

вирощених в людському ЕСМ та в Matrigel. С) Відмінність клітин HepG2 вирощених у сендвіч-культурі ЕСМ.

Причиною відмінностей у морфології клітин вірогідно є різниця у складі субстрату. На субстраті, що містить більше колагену і фібронектину, клітини формують філоподії і перебудовують цитоскелет. Взаємодія і з'єднання колаген-фібронектин підвищує адгезію клітин, оскільки у фібронектину є колагензв'язуючий домен, а в деяких типах колагену є сайт зв'язування з фібронектином.

Оскільки екстрацелюлярний матрикс найточніше імітує мікрооточення клітин в умовах *in vivo*, клітини, культивовані на екстрацелюлярному реорганізують актинові філаменти, щоб утворювати зв'язки з сусідніми клітинами і «поширюватись». Тут якраз фібронектин відіграє роль у регуляції цього процесу. Ця взаємодія клітин вимагає полімеризації актинових філаментів, що ініціює утворення мембранних виступів у сторону інших клітин.

Клітини розпізнають і реагують на стан свого мікрооточення різними шляхами, деякі з яких включають активне вироблення енергії, що дозволяє розпізнавати механічні характеристики середовища так само точно, як клітини розпізнають концентрацію хімічних агоністів. HEP-G2 - адгезивні клітини тому вони зв'язуються з позаклітинним матриксом (ЕСМ) за допомогою інтегринів та інших рецепторів, локалізованих на їх плазматичній мембрані. Інтегрини складаються з гетеродимерних білків форми α і форми β , а комбінація підтипів, таких як $\alpha1\beta1$, визначає тип ЕСМ-білків, з якими вони взаємодіють (наприклад, колаген або ламінін у випадку $\alpha1\beta1$). Відомо, що експансія клітин *in vitro* ґрунтується на взаємодії між клітинами та ЕСМ, яка відбувається між молекулами адгезії клітинної поверхні, такими як інтегрини, та їхніми аналогами в ЕСМ. Ця взаємодія дозволяє клітинам прикріплюватися, поширюватися, проліферувати, мігрувати та

диференціюватися на субстраті. Залучення різних компонентів ЕСМ призводить до вироблення чітких внутрішньоклітинних сигналів і клітинних відповідей, деякі з яких залежать від фізичних властивостей субстрату. [133]

Біологічно активний склад матриксу може стимулювати диференціацію, а відносна жорсткість чистого матриксу (з більшими гелеутворюючими властивостями) може бути додатково необхідною для фізичної підтримки формування трубочок.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження ми дійшли наступних важливих висновків, які мають значний вплив на розробку нових біополімерних матеріалів на основі екстрацелюлярного матриксу (ЕСМ) та їх застосування в біомедичних науках:

1. У процесі дослідження вперше було розроблено біополімерний матеріал на основі ЕСМ, який отримано шляхом децелюляризації саркоми м'яких тканин людини без використання травних ферментів. Це дозволило зберегти природну структуру білків, таких як колаген, фібронектин та еластин, що є критичним для забезпечення адекватної імітації природного ЕСМ. Отриманий матеріал показав високу ефективність екстракції структурного ЕСМ, що робить його перспективним для подальшого використання у тканинній інженерії та біомедичних дослідженнях.

2. Дослідження фізико-хімічних властивостей біополімеру продемонструвало, що він має здатність переходити з рідкого стану при $+4^{\circ}\text{C}$ у гелеподібний стан при $+37^{\circ}\text{C}$. Це підтверджує можливість використання біополімеру як термочутливого гідрогелю. Аналіз хімічного складу показав високу концентрацію колагену, фібронектину та еластину, що забезпечує жорсткість та в'язкопружність матриці, подібні до природного ЕСМ. Така структура сприяє підтримці морфогенезу та може бути використана для створення різних біоматеріалів.

3. Вплив біополімерного матеріалу на морфологію клітин був досліджений з використанням клітинної лінії НерG2. Клітини, культивовані на ЕСМ, продемонстрували значні морфологічні зміни, включаючи формування філоподій та перебудову цитоскелета, що не спостерігалось на комерційних аналогах, таких як Matrigel. Це свідчить про те, що розроблений

біополімер краще імітує природне мікрооточення клітин, сприяючи їхній адгезії та диференціації.

4. Дослідження генетичної експресії клітин показало, що під впливом біополімерного матеріалу відбувається значна зміна активності генів, пов'язаних з адгезією, цитоскелетом та міжклітинними взаємодіями. Зокрема, підвищена експресія генів, що кодують колаген-зв'язуючі та фібронектин-зв'язуючі білки, вказує на специфічну взаємодію клітин з компонентами ЕСМ. Це відкриває нові можливості для розуміння молекулярних механізмів, які визначають поведінку клітин у штучно створеному мікрооточенні.

5. Порівняльний аналіз показав, що розроблений біополімерний матеріал має унікальні властивості, які не спостерігалися у комерційних матеріалах, таких як Matrigel. Високий вміст структурних білків та збереження їх природної структури забезпечують кращу імітацію природного ЕСМ, що підтверджується як морфологічними змінами клітин, так і їхньою генетичною експресією. Це підкреслює ефективність та унікальність розробленого матеріалу, роблячи його перспективним для подальшого використання в біомедичних дослідженнях та клінічних застосуваннях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, *Journal of cell science*, 123 (2010) 4195-4200.
2. K.C. Clause, T.H. Barker, Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair, *Current opinion in biotechnology*, 24 (2013) 830-833.
3. A.D. Theocharis, C. Gialeli, V.C. Hascall, N.K. Karamanos, Extracellular matrix: a functional scaffold, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling.*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 3-20.
4. V.S. LeBleu, B. Macdonald, R. Kalluri, Structure and function of basement membranes, *Experimental biology and medicine*, 232 (2007) 1121-1129.
5. W. Halfter, P. Oertle, C.A. Monnier, L. Camenzind, M. Reyes-Lua, H. Hu, J. Candiello, A. Labilloy, M. Balasubramani, P.B. Henrich, M. Plodinec, New concepts in basement membrane biology, *The FEBS journal*, (2015).
6. D.T. Behrens, D. Villone, M. Koch, G. Brunner, L. Sorokin, H. Robenek, L. Bruckner-Tuderman, P. Bruckner, U. Hansen, The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens, *The Journal of biological chemistry*, 287 (2012) 18700-18709.
7. C.A. Kirkpatrick, S.B. Selleck, Heparan sulfate proteoglycans at a glance, *Journal of cell science*, 120 (2007) 1829-1832.
8. T. Rozario, D.W. DeSimone, The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view, *Developmental biology*, 341 (2010) 126-140.
9. I. Vlodavsky, R.V. Iozzo, R.D. Sanderson, Heparanase: multiple functions in inflammation, diabetes and atherosclerosis, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 32 (2013) 220-222.
10. P. Lu, V.M. Weaver, Z. Werb, The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression, *The Journal of cell biology*, 196 (2012) 395-406.

11. C. Bonnans, J. Chou, Z. Werb, Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15 (2014) 786-801.
12. A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting, *The FEBS journal*, 277 (2010) 3904-3923.
13. N. Afratis, C. Gialeli, D. Nikitovic, T. Tsegenidis, E. Karousou, A.D. Theocharis, M.S. Pavao, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment, *The FEBS journal*, 279 (2012) 1177-1197.
14. R.V. Iozzo, R.D. Sanderson, Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis, *J Cell Mol Med*, 15 (2011) 1013-1031.
15. R.V. Iozzo, L. Schaefer, Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, (2015).
16. A.D. Theocharis, C. Gialeli, P. Bouris, E. Giannopoulou, S.S. Skandalis, A.J. Aletras, R.V. Iozzo, N.K. Karamanos, Cell-matrix interactions: focus on proteoglycan-proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer, *The FEBS journal*, 281 (2014) 5023-5042.
17. A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, T. Neill, H.A. Mulhaupt, M. Hubo, H. Frey, S. Gopal, A. Gomes, N. Afratis, H.C. Lim, J.R. Couchman, J. Filmus, D.S. Ralph, L. Schaefer, R.V. Iozzo, N.K. Karamanos, Insights ACCEPTED MANUSCRIPT ACCEPTED MANUSCRIPT 47 into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine, *Biochimica et biophysica acta*, 1855 (2015) 276-300.
18. K.E. Kadler, C. Baldock, J. Bella, R.P. Boot-Handford, Collagens at a glance, *Journal of cell science*, 120 (2007) 1955-1958.

19. J. Heino, The collagen family members as cell adhesion proteins, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 29 (2007) 1001-1010.
20. M.D. Shoulders, R.T. Raines, Collagen structure and stability, *Annual review of biochemistry*, 78 (2009) 929-958.
21. L.S. Payne, P.H. Huang, The pathobiology of collagens in glioma, *Molecular cancer research : MCR*, 11 (2013) 1129-1140.
22. A. Corsi, T. Xu, X.D. Chen, A. Boyde, J. Liang, M. Mankani, B. Sommer, R.V. Iozzo, I. Eichstetter, P.G. Robey, P. Bianco, M.F. Young, Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17 (2002) 1180-1189.
23. S.D. Chessler, G.A. Wallis, P.H. Byers, Mutations in the carboxyl-terminal propeptide of the pro alpha 1(I) chain of type I collagen result in defective chain association and produce lethal osteogenesis imperfecta, *The Journal of biological chemistry*, 268 (1993) 18218-18225.
24. J.M. Pace, C.D. Kuslich, M.C. Willing, P.H. Byers, Disruption of one intra-chain disulphide bond in the carboxyl-terminal propeptide of the proalpha1(I) chain of type I procollagen permits slow assembly and secretion of overmodified, but stable procollagen trimers and results in mild osteogenesis imperfecta, *Journal of medical genetics*, 38 (2001) 443-449.
25. J. Myllyharju, K.I. Kivirikko, Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms, *Trends in genetics : TIG*, 20 (2004) 33-43.
26. A. Colige, F. Ruggiero, I. Vandenberghe, J. Dubail, F. Kesteloot, J. Van Beeumen, A. Beschin, L. Brys, C.M. Lapiere, B. Nusgens, Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase

cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 34397-34408.

27. S.P. Boudko, H.P. Bachinger, Trimerization domains in collagens: chain selection, folding initiation, and triple-helix stabilization, in: *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling.*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 506-520.

28. M.E. Than, S. Henrich, R. Huber, A. Ries, K. Mann, K. Kuhn, R. Timpl, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, W. Bode, The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002) 6607-6612.

29. O. Bogin, M. Kvansakul, E. Rom, J. Singer, A. Yayon, E. Hohenester, Insight into Schmid metaphyseal chondrodysplasia from the crystal structure of the collagen X NC1 domain trimer, *Structure*, 10 (2002) 165-173.

30. M. Kvansakul, O. Bogin, E. Hohenester, A. Yayon, Crystal structure of the collagen alpha1(VIII) NC1 trimer, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 22 (2003) 145- 152.

31. J.D. San Antonio, J. Des Parkin, J. Savige, J.P.R.O. Orgel, O. Jacenko, Collagen interactomes: mapping functional domains and mutations on fibrillar and network-forming collagens, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 575-591.

32. J.J. Wu, P.E. Woods, D.R. Eyre, Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding, *The Journal of biological chemistry*, 267 (1992) 23007-23014.

33. S. Huber, M. van der Rest, P. Bruckner, E. Rodriguez, K.H. Winterhalter, L. Vaughan, Identification of the type IX collagen polypeptide

chains. The alpha 2(IX) polypeptide carries the chondroitin sulfate chain(s), *The Journal of biological chemistry*, 261 (1986) 5965-5968.

34. R. Fassler, P.N. Schnegelsberg, J. Dausman, T. Shinya, Y. Muragaki, M.T. McCarthy, B.R. Olsen, R. Jaenisch, Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (1994) 5070- 5074.

35. K. Von der Mark, *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism in: S.P.R.a.J.P.B. Markus J. Seibel (Ed.) Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism Academic Press, New York, 2006, pp. 3-40.*

36. C.W. Franzke, K. Tasanen, H. Schacke, Z. Zhou, K. Tryggvason, C. Mauch, P. Zigrino, S. Sunnarborg, D.C. Lee, F. Fahrenholz, L. Bruckner-Tuderman, Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs, *The EMBO journal*, 21 (2002) 5026-5035.

37. J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, New insights into elastic fiber assembly, *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 81 (2007) 229-240.

38. L.D. Muiznieks, A.S. Weiss, F.W. Keeley, Structural disorder and dynamics of elastin, *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 88 (2010) 239-250.

39. G. Sengle, L.Y. Sakai, The fibrillin microfibril scaffold: A niche for growth factors and mechanosensation?, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 47 (2015) 3-12.

40. A.K. Downing, V. Knott, J.M. Werner, C.M. Cardy, I.D. Campbell, P.A. Handford, Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders, *Cell*, 85 (1996) 597-605.

41. H. Sakamoto, T. Broekelmann, D.A. Cheresch, F. Ramirez, J. Rosenbloom, R.P. Mecham, Cell-type specific recognition of RGD- and non-

RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 4916-4922.

42. D.V. Bax, S.E. Bernard, A. Lomas, A. Morgan, J. Humphries, C.A. Shuttleworth, M.J. Humphries, C.M. Kielty, Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 34605-34616.

43. K. Tiedemann, B. Batge, P.K. Muller, D.P. Reinhardt, Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 36035-36042.

44. T.M. Ritty, T.J. Broekelmann, C.C. Werneck, R.P. Mecham, Fibrillin-1 and -2 contain heparinbinding sites important for matrix deposition and that support cell attachment, *The Biochemical journal*, 375 (2003) 425-432.

45. R.P. Mecham, M.A. Gibson, The microfibril-associated glycoproteins (MAGPs) and the microfibrillar niche, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 47 (2015) 13-33.

46. C.L. Papke, H. Yanagisawa, Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 37 (2014) 142-149.

47. C. Danussi, A. Petrucco, B. Wassermann, E. Pivetta, T.M. Modica, L. Del Bel Belluz, A. Colombatti, P. Spessotto, EMILIN1-alpha4/alpha9 integrin interaction inhibits dermal fibroblast and keratinocyte proliferation, *The Journal of cell biology*, 195 (2011) 131-145.

48. C. Danussi, L. Del Bel Belluz, E. Pivetta, T.M. Modica, A. Muro, B. Wassermann, R. Doliana, P. Sabatelli, A. Colombatti, P. Spessotto, EMILIN1/alpha9beta1 integrin interaction is crucial in lymphatic valve formation and maintenance, *Molecular and cellular biology*, 33 (2013) 4381-4394.

49. J.M. Wells, A. Gaggar, J.E. Blalock, MMP generated matrikines, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 44-46C (2015) 122-129.

50. E.L. George, E.N. Georges-Labouesse, R.S. Patel-King, H. Rayburn, R.O. Hynes, Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin, *Development*, 119 (1993) 1079-1091.
51. R.O. Hynes, Fibronectins, *Scientific American*, 254 (1986) 42-51.
52. T. Sasaki, Collagen-binding proteins, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling.*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 592–602.
53. A.L. Main, T.S. Harvey, M. Baron, J. Boyd, I.D. Campbell, The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions, *Cell*, 71 (1992) 671- 678.
54. R. Pankov, K.M. Yamada, Fibronectin at a glance, *Journal of cell science*, 115 (2002) 3861-3863.
55. L.A. Davidson, R. Keller, D.W. DeSimone, Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*, *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 231 (2004) 888-895.
56. M. Larsen, C. Wei, K.M. Yamada, Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis, *Journal of cell science*, 119 (2006) 3376-3384.
57. F.A. Moretti, A.K. Chauhan, A. Iaconcig, F. Porro, F.E. Baralle, A.F. Muro, A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived, *The Journal of biological chemistry*, 282 (2007) 28057-28062.
58. Z. Avnur, B. Geiger, The removal of extracellular fibronectin from areas of cell-substrate contact, *Cell*, 25 (1981) 121-132.
59. E. Leikina, M.V. Merts, N. Kuznetsova, S. Leikin, Type I collagen is thermally unstable at body temperature, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002) 1314-1318.
60. R.O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell*, 110 (2002) 673-687

61. J. Sottile, D.C. Hocking, Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions, *Molecular biology of the cell*, 13 (2002) 3546- 3559.
62. I. Wierzbicka-Patynowski, Y. Mao, J.E. Schwarzbauer, Continuous requirement for pp60-Src and phospho-paxillin during fibronectin matrix assembly by transformed cells, *Journal of cellular physiology*, 210 (2007) 750-756.
63. E.N. Georges-Labouesse, E.L. George, H. Rayburn, R.O. Hynes, Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin, *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 207 (1996) 145-156.
64. S. Astrof, R.O. Hynes, Fibronectins in vascular morphogenesis, *Angiogenesis*, 12 (2009) 165-175.
65. F. Oyama, S. Hirohashi, Y. Shimosato, K. Titani, K. Sekiguchi, Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors, *The Journal of biological chemistry*, 264 (1989) 10331-10334.
66. H. Inufusa, M. Nakamura, T. Adachi, Y. Nakatani, K. Shindo, M. Yasutomi, H. Matsuura, Localization of oncofetal and normal fibronectin in colorectal cancer. Correlation with histologic grade, liver metastasis, and prognosis, *Cancer*, 75 (1995) 2802-2808.
67. A.M. Wan, E.M. Chandler, M. Madhavan, D.W. Infanger, C.K. Ober, D. Gourdon, G.G. Malliaras, C. Fischbach, Fibronectin conformation regulates the proangiogenic capability of tumor-associated adipogenic stromal cells, *Biochimica et biophysica acta*, 1830 (2013) 4314-4320.
68. E.M. Chandler, B.R. Seo, J.P. Califano, R.C. Andresen Eguiluz, J.S. Lee, C.J. Yoon, D.T. Tims, J.X. Wang, L. Cheng, S. Mohanan, M.R. Buckley, I. Cohen, A.Y. Nikitin, R.M. Williams, D. Gourdon, C.A. Reinhart-King, C. Fischbach, Implanted adipose progenitor cells as physicochemical regulators of breast cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 9786-9791.

69. M. Durbeej, Laminins, *Cell and tissue research*, 339 (2010) 259-268.
70. V. Iorio, L.D. Troughton, K.J. Hamill, Laminins: Roles and Utility in Wound Repair, *Advances in wound care*, 4 (2015) 250-263.
71. M. Aumailley, L. Bruckner-Tuderman, W.G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J.C. Jones, H.K. Kleinman, M.P. Marinkovich, G.R. Martin, U. Mayer, G. Meneguzzi, J.H. Miner, K. Miyazaki, M. Patarroyo, M. Paulsson, V. Quaranta, J.R. Sanes, T. Sasaki, K. Sekiguchi, L.M. Sorokin, J.F. Talts, K. Tryggvason, J. Uitto, I. Virtanen, K. von der Mark, U.M. Wewer, Y. Yamada, P.D. Yurchenco, A simplified laminin nomenclature, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 24 (2005) 326-332.
72. J.H. Miner, P.D. Yurchenco, Laminin functions in tissue morphogenesis, *Annual review of cell and developmental biology*, 20 (2004) 255-284.
73. H. Ido, S. Ito, Y. Taniguchi, M. Hayashi, R. Sato-Nishiuchi, N. Sanzen, Y. Hayashi, S. Futaki, K. Sekiguchi, Laminin isoforms containing the gamma3 chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the gamma1 and gamma2 chains, *The Journal of biological chemistry*, 283 (2008) 28149-28157.
74. Y. Taniguchi, H. Ido, N. Sanzen, M. Hayashi, R. Sato-Nishiuchi, S. Futaki, K. Sekiguchi, The Cterminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins, *The Journal of biological chemistry*, 284 (2009) 7820-7831.
75. R. Hallmann, N. Horn, M. Selg, O. Wendler, F. Pausch, L.M. Sorokin, Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature, *Physiological reviews*, 85 (2005) 979-1000.
76. J.E. Murphy-Ullrich, The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?, *The Journal of clinical investigation*, 107 (2001) 785-790.

77. P. Bornstein, E.H. Sage, Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function, *Current opinion in cell biology*, 14 (2002) 608-616.
78. J.E. Murphy-Ullrich, E.H. Sage, Revisiting the matricellular concept, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 37 (2014) 1-14.
79. C.M. Giachelli, S. Steitz, Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 19 (2000) 615-622.
80. T.R. Kyriakides, P. Bornstein, Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response, *Thrombosis and haemostasis*, 90 (2003) 986-992.
81. O. Stenina-Adognravi, Invoking the power of thrombospondins: regulation of thrombospondins expression, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 37 (2014) 69-82.
82. R. Chiquet-Ehrismann, G. Orend, M. Chiquet, R.P. Tucker, K.S. Midwood, Tenascins in stem cell niches, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 37 (2014) 112-12
83. S.S. Nunes, M.A. Outeiro-Bernstein, L. Juliano, F. Vardiero, H.B. Nader, A. Woods, C. Legrand, V. Morandi, Syndecan-4 contributes to endothelial tubulogenesis through interactions with two motifs inside the pro-angiogenic N-terminal domain of thrombospondin-1, *Journal of cellular physiology*, 214 (2008) 828-837.
84. B. Ohkawara, A. Glinka, C. Niehrs, Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis, *Developmental cell*, 20 (2011) 303-314.
85. L.A. Shevde, S. Das, D.W. Clark, R.S. Samant, Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis, *Current molecular medicine*, 10 (2010) 71-81.

86. M. Nozaki, E. Sakurai, B.J. Raisler, J.Z. Baffi, J. Witta, Y. Ogura, R.A. Brekken, E.H. Sage, B.K. Ambati, J. Ambati, Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A, *The Journal of clinical investigation*, 116 (2006) 422-429.
87. J.M. Lynch, M. Maillet, D. Vanhoutte, A. Schloemer, M.A. Sargent, N.S. Blair, K.A. Lynch, T. Okada, B.J. Aronow, H. Osinska, R. Prywes, J.N. Lorenz, K. Mori, J. Lawler, J. Robbins, J.D. Molkenin, A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response, *Cell*, 149 (2012) 1257-1268.
88. R. Zohar, N. Suzuki, K. Suzuki, P. Arora, M. Glogauer, C.A. McCulloch, J. Sodek, Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration, *Journal of cellular physiology*, 184 (2000) 118-130.
89. G.S. Wong, A.K. Rustgi, Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis, *British journal of cancer*, 108 (2013) 755-761. ACCEPTED MANUSCRIPT ACCEPTED MANUSCRIPT 61
90. W. Yan, R. Shao, Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation, *The Journal of biological chemistry*, 281 (2006) 19700-19708.
91. K. Beiter, E. Hiendlmeyer, T. Brabletz, F. Hlubek, A. Haynl, C. Knoll, T. Kirchner, A. Jung, betaCatenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors, *Oncogene*, 24 (2005) 8200-8204.
92. A. Chlenski, S.L. Cohn, Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression, *Seminars in cell & developmental biology*, 21 (2010) 55-65.

93. X.S. Puente, L.M. Sanchez, C.M. Overall, C. Lopez-Otin, Human and mouse proteases: a comparative genomic approach, *Nature reviews. Genetics*, 4 (2003) 544-558.
94. H. Nagase, *Metalloproteases*, *Current protocols in protein science / editorial board*, John E. Coligan ... [et al.], Chapter 21 (2001) Unit 21 24.
95. N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res*, 38 (2010) D227-233.
96. E.E. Sterchi, Special issue: metzincin metalloproteinases, *Mol Aspects Med*, 29 (2008) 255-257.
97. R. Visse, H. Nagase, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circ Res*, 92 (2003) 827-839.
98. H. van Goor, W.B. Melenhorst, A.J. Turner, S.T. Holgate, Adamalysins in biology and disease, *J Pathol*, 219 (2009) 277-286.
99. R.H. Law, D. Abu-Ssaydeh, J.C. Whisstock, New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system, *Current opinion in structural biology*, 23 (2013) 836-841.
100. L. Patthy, Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules, *Cell*, 41 (1985) 657-663.
101. S. Ye, E.J. Goldsmith, Serpins and other covalent protease inhibitors, *Current opinion in structural biology*, 11 (2001) 740-745.
102. H. Kwaan, B. McMahon, The Role of Plasminogen-Plasmin System in Cancer, in: H.C. Kwaan, D. Green (Eds.) *Coagulation in Cancer*, Springer US, 2009, pp. 43-66.
103. V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, D. Turk, Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers, *Biochimica et biophysica acta*, 1824 (2012) 68-88.

104. O. Vasiljeva, T. Reinheckel, C. Peters, D. Turk, V. Turk, B. Turk, Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets, *Current pharmaceutical design*, 13 (2007) 387-403.
105. M.M. Mohamed, B.F. Sloane, Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer, *Nature reviews. Cancer*, 6 (2006) 764-775.
106. W. Vogel, G.D. Gish, F. Alves, T. Pawson, The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen, *Molecular cell*, 1 (1997) 13-23.
107. Y. Shintani, Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M.J. Wheelock, K.R. Johnson, Collagen mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1, *The Journal of cell biology*, 180 (2008) 1277-1289
108. C.Z. Wang, H.W. Su, Y.C. Hsu, M.R. Shen, M.J. Tang, A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration, *Molecular biology of the cell*, 17 (2006) 2839-2852.
109. S.H. Yang, H.A. Baek, H.J. Lee, H.S. Park, K.Y. Jang, M.J. Kang, D.G. Lee, Y.C. Lee, W.S. Moon, M.J. Chung, Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas, *Oncology reports*, 24 (2010) 311-319.
110. E. Puré, CD44: a Sensor of tissue damage critical for restoring homeostasis, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling.*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 484–498.
111. S. Misra, P. Heldin, V.C. Hascall, N.K. Karamanos, S.S. Skandalis, R.R. Markwald, S. Ghatak, Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy, *FEBS J*, 278 (2011) 1429-1443.
112. I. Kozlova, A. Ruusala, O. Voytyuk, S.S. Skandalis, P. Heldin, IQGAP1 regulates hyaluronanmediated fibroblast motility and proliferation, *Cellular signalling*, 24 (2012) 1856-1862.

113. D. Naor, S. Nedvetzki, I. Golan, L. Melnik, Y. Faitelson, CD44 in cancer, *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 39 (2002) 527-579.
114. B. Greve, R. Kelsch, K. Spaniol, H.T. Eich, M. Gotte, Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81 (2012) 284-293.
115. Smith BD, Martin GR, Miller EJ, Dorfman A, Swarm R. Nature of the collagen synthesized by a transplanted chondrosarcoma. *Arch Biochem Biophys*. 1975 Jan;166(1):181-6.
116. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med*. 1977 Jan 1;145(1):204-20.
117. Futaki S, Hayashi Y, Yamashita M, Yagi K, Bono H, Hayashizaki Y, Okazaki Y, Sekiguchi K. Molecular basis of constitutive production of basement membrane components. Gene expression profiles of Engelbreth-Holm-Swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):50691-701.
118. Kefalides NA, Alper R, Clark CC. Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int Rev Cytol*. 1979;61:167-228. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61998-1.
119. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*. 1979 Oct 10;254(19):9933-7.
120. Laurie GW, Bing JT, Kleinman HK, Hassell JR, Aumailley M, Martin GR, Feldmann RJ. Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J Mol Biol*. 1986 May 5;189(1):205-16.
121. Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 May;76(5):2268-72.

122. Grant DS, Leblond CP, Kleinman HK, Inoue S, Hassell JR. The incubation of laminin, collagen IV, and heparan sulfate proteoglycan at 35 degrees C yields basement membrane-like structures. *J Cell Biol.* 1989 Apr;108(4):1567-74.
123. Terranova VP, Aumailley M, Sultan LH, Martin GR, Kleinman HK. Regulation of cell attachment and cell number by fibronectin and laminin. *J Cell Physiol.* 1986 Jun;127(3):473-9.
124. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 1986 Jan 28;25(2):312-8.
125. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1589-98.
126. Hadley MA, Byers SW, Suárez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol.* 1985 Oct;101(4):1511-22.
127. Andreas Ebner, Peter Hinterdorfer, Hermann J. Gruber, Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers, *Ultramicroscopy*, Volume 107, Issues 10–11, 2007, Pages 922-927,
128. Human Collagen Type IV (COL4) ELISA Kit. ABBEXA . Instructions for Use Version: 2.0.0, 15 Sep 2021
129. Keemink J, Oorts M, Annaert P. Primary Hepatocytes in Sandwich Culture. *Methods Mol Biol.* 2015;1250:175-88.
130. Cell Viability Imaging Kit. Sigma Aldrich Instructions for Use Version: 06, December 2020
131. Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater.* 2020 Jul;5(7):539-551.

132. Stylianou A. Assessing Collagen D-Band Periodicity with Atomic Force Microscopy. *Materials (Basel)*. 2022 Feb 21;15(4):1608.
133. Le TP, Zhao X, Erhardt S, Gu J, Wang H, Findley TO, Wang J. An Optimized O9-1/Hydrogel System for Studying Mechanical Signals in Neural Crest Cells. *J Vis Exp*. 2021 Aug 13;(174):10.3791/62693.
134. Hight AR, Zhang VJ, Heinemann GK, Roberts CT. Use of Matrigel in culture affects cell phenotype and gene expression in the first trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo. *Placenta*. 2012 Jul;33(7):586-8.
135. Zhang, Y., Tseng, S.C.G. & Zhu, YT. Suppression of TGF- β 1 signaling by Matrigel via FAK signaling in cultured human trabecular meshwork cells. *Sci Rep* 11, 7319 (2021).
136. Jin S, Yao H, Weber JL, Melkounian ZK, Ye K. A synthetic, xeno-free peptide surface for expansion and directed differentiation of human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e50880.
137. 202 Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(1):136-40.
138. 203 Bradham DM, Passaniti A, Horton WE Jr. Mesenchymal cell chondrogenesis is stimulated by basement membrane matrix and inhibited by age-associated factors. *Matrix Biol*. 1995 Jul;14(7):561-71.
139. 204 Hoffman MP, Kibbey MC, Letterio JJ, Kleinman HK. Role of laminin-1 and TGF-beta 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). *J Cell Sci*. 1996 Aug;109 (Pt 8):2013-21
140. 205 Yang J, Nagavarapu U, Relloma K, Sjaastad MD, Moss WC, Passaniti A, Herron GS. Telomerized human microvasculature is functional in vivo. *Nat Biotechnol*. 2001 Mar;19(3):219-24.

