

Received: 2007.07.20
Accepted: 2007.10.18
Published: 2007.11.05

Fibronektyna jako aktywny składnik macierzy pozakomórkowej

Fibronectin as an active component of the extracellular matrix

Dorota Krzyżanowska-Gołąb, Anna Lemańska-Perek, Iwona Kątnik-Prastowska

Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii Akademii Medycznej im Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Macierz pozakomórkowa (ECM) jest dynamiczną, elastyczną i wieloskładnikową, zwartą strukturą, która wypełnia przestrzeń między komórkami i gdzie dochodzi do magazynowania czynników wzrostu i cytokin. W organizmie, ECM podlega ciągłej przebudowie, zwłaszcza podczas rozwoju, gojenia ran i innych procesów naprawczych. Jednym ze składników macierzy jest fibronektyna (FN), glikoproteina wielodomenowa i wielofunkcyjna, która w macierzy pozakomórkowej może pełnić rolę nie tylko strukturalną, ale i regulującą oddziaływanie komórka-macierz. U podstaw molekularnych oddziaływań komórek z macierzą leży interakcja FN z integrzynami. Działając w parze z receptorem integrzynowym, FN rozpoczyna kaskadę zdarzeń, które w konsekwencji doprowadzają do przekazywania sygnałów ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki, regulując organizację cytoszkieletu. W artykule szczególny nacisk położono na omówienie procesu fibrylogenezy. Przedstawiono współczesny stan wiedzy o mechanizmach molekularnych przyłączania FN do komórki oraz o udziale sekwencji umiejscowionych w centralnej i N-końcowej części fibronektyny w inicjacji tego procesu.

Pasjonujące wydają się radykalne zmiany konformacji FN związane z tworzeniem fibryli. Do receptorów integrzynowych $\alpha_5\beta_1$ na komórce przyłącza się dimer fibronektynowy, o strukturze globularnej. Zmiana wzajemnego położenia kompleksów integryna-FN powoduje naprężenia w obrębie cząsteczek fibronektyny. Skutkuje to stopniową zmianą struktury ze zwartej globularnej w rozciągniętą fibrylną i odsłonięciem regionów zdolnych do tworzenia wiązań między cząsteczkami fibronektynowymi i innymi białkami macierzy. W następstwie powstają nakładające się włókna, w których zakotwiczone są komórki i cząsteczki niezbędne do przekazywania sygnałów w obrębie tkanki. Artykuł kończy się omówieniem procesów molekularnych tworzenia prowizorycznego włókna podczas gojenia zranień. Proponuje się zastosowanie w medycynie zmodyfikowanych preparatów fibronektynowych, które przyspieszą gojenie ran, szczególnie w miejscu niedokrwionym.

Słowa kluczowe:

fibronektyna • izoformy • macierz pozakomórkowa • fibrylogeneza

Summary

The extracellular matrix (ECM) is a highly dynamic, elastic, and multicomponent compact structure which fills the space between cells and provides a storage site for growth factors and cytokines. The ECM undergoes constant remodeling, most obviously during development, wound healing, and other repair processes. Fibronectin (FN), a multidomain and multifunctional glycoprotein, is one ECM components which plays not only a structural role, but also a functional one, regulating the cell-ECM interaction. This review focuses on fibrillogenesis. The current state of

knowledge about the molecular mechanisms which initiate FN binding to the cell surface through central and N-terminal FN sequences is described. It appears that exciting and drastic changes in the FN molecule's conformation are associated with fibril formation. Globular dimeric FN binds with an integrin receptor on the cell surface. FN-bound $\alpha_5\beta_1$ integrins actively translocate from focal adhesions to fibrillar adhesions and this movement causes stretching of the FN molecule. FN thus becomes extended and fibrillar and dynamic tension forces seem to unmask the cryptic self-association and other sites implicated in FN-matrix assembly. This provides for the formation of a fibrillar matrix network anchoring cells and molecules essential for signal transduction within the tissue. Finally, the molecular process of provisional matrix formation during wound healing is considered. There are some suggestions that modified FN preparations could be applied in medicine, particularly in patients after ischemic injury.

Key words: fibronectin • isoforms • extracellular matrix • fibrillogenesis

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11468.pdf

Word count: 3763

Tables: –

Figures: 2

References: 83

Adres autorki: prof. Iwona Kątnik-Prastowska, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii AM, ul. Bujwida 44a, 50-345 Wrocław; e-mail: iwona@immchem.am.wroc.pl

Wykaz skrótów: **FN** – fibronektyna; **ECM** – macierz pozakomórkowa; **FN-III** – motyw fibronektynowy typu III; **pFN** – fibronektyna osoczowa; **cFN** – fibronektyna komórkowa.

WSTĘP

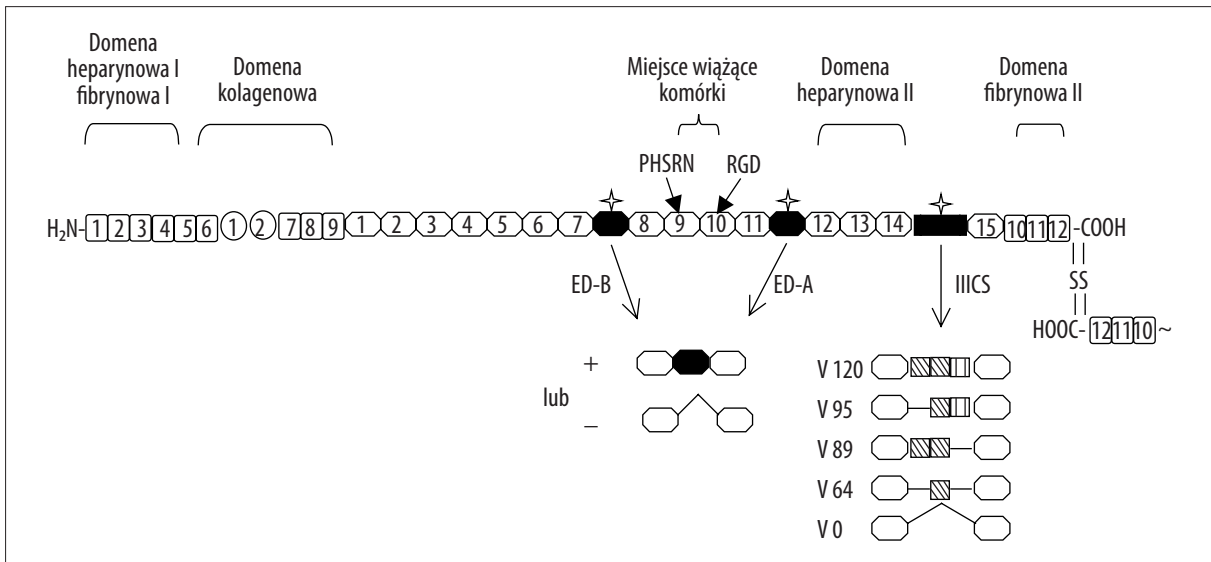
Pierwsze informacje o fibronektynie (FN), pojawiły się w 1948 roku za sprawą Morrisona i wsp. [52]. Podczas frakcjonowania osocza ludzkiego odkryli oni białko nierozpuszczalne w niskiej temperaturze, które nazwali globuliną nierozpuszczalną na zimno, w skrócie CIG (cold insoluble globulin). Kolejne wzmianki na temat FN pochodzą z wczesnych lat siedemdziesiątych ub.w., kiedy to różni badacze, zaobserwowali, iż powierzchnia prawidłowej komórki traci białko o dużej masie w wyniku transformacji nowotworowej. Hynes [29] nazwał odkryte przez siebie białko LETS (large external transformation sensitive), czyli duże, zewnętrzne białko wrażliwe na transformację. W tym samym okresie zespół pod kierunkiem Vaheriego nazwał FN powierzchniowym antygenem fibroblastów (surface fibroblast antigen), a zespół kierowany przez Hakomoriego – galaktoproteiną a [41]. Ostatecznie, w połowie lat siedemdziesiątych ub.w., w celu ujednoczenia nomenklatury Vaheri zaproponował nazwę **fibronektyna** [57]. Początkowe badania nad FN rozbudziły ogromne nadzieje. Spekulowano nawet, że FN może być głównym białkiem odpowiedzialnym za nowotworzenie. Wydawało się, że znaleziono nareszcie niezawodny marker transformacji nowotworowej. Wkrótce entuzjazm okazał się przedwczesny, fibronektyna nie spełniła pokładanych nadziei. Jednak wraz z rozwojem narzędzi badawczych oraz zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych okazało się, że FN jest glikoproteiną o mozaikowej budowie i składa się z wielu funkcjonalnych domen [30,56,57,66]. Rola jej polega na udziale w adhezji, proliferacji, rozplaszczaniu i migracji komórek [27,36,39,42]. FN uczestniczy w procesach embriogenezy oraz w tkankowych procesach naprawczych po zranieniach [20,48,67]. Jednym z zagadnień intensywnie

badanym w ostatnim dziesięcioleciu jest sposób funkcjonowania FN w macierzy pozakomórkowej, zmiany jej konformacji podczas tworzenia macierzy oraz oddziaływanie z innymi składnikami macierzy [19,28,68,71,76,80].

MACIERZ POZAKOMÓRKOWA

Macierz pozakomórkowa (**extracellular matrix** – ECM) zwana również zewnątrzkomórkową, to makromolekularna sieć otaczająca komórki w różnego typu tkankach. ECM ma złożony skład, obejmujący glikoproteiny kolagenowe i niekolagenowe, zanurzone w uwodnionym żelu polisacharydowym. Białka kolagenowe, główny budulec macierzy, dzielą się na dwie klasy: włóknkowe, do których należy najlepiej dotychczas poznany kolagen typu I oraz niewłóknkowe, takie jak kolageny błon podstawnych typu IV, VIII i X (basement membrane collagens), kolageny mikrofibrylarne typu VI, kolageny FACIT (fibryl-associated collagen with interrupted triple helix) typu IX, XII, XIV, XVI, XIX oraz multipleksyny (multiple triple-helix domain and interruptions) typu XV i XVIII. W grupie białek niekolagenowych ECM wyróżniamy elastynę, fibronektynę, lamininę, trombospondynę, tenascynę, matrylinę, nidogen, fibulinę, fibrylinę oraz glikoproteiny zasocjowane z mikrofibrylami [2]. Większość białek macierzy pozakomórkowej to białka mozaikowe mające w swojej budowie części złożone ze strukturalnie podobnych domen utworzonych z powtarzających się modułów. Moduły typowe dla składników ECM są obecne również w niektórych białkach nienależących do macierzy, np. FN-III w chitynazie A1 z *Bacillus circulans* WL-12 [75].

Macierz pozakomórkowa była tradycyjnie postrzegana jako statyczne rusztowanie utrzymujące właściwą strukturę tkan-



Ryc. 1. Struktura mozaikowa podjednostki FN; zaznaczono motywy typu: I-, II-, III- oraz miejsca alternatywnego składania. Liczbami oznaczono numery kolejnych motywów. RGD – sekwencja wiążąca integryny, PHSRN – synergistyczna sekwencja wiążąca integryny, ED-A, ED-B, IIICS – regiony powstające w wyniku alternatywnego molekularnego składania. Domeny ED-A i ED-B mogą być w całości włączone lub wyłączone z łańcucha polipeptydowego. Region IIICS (zmienny, V) może być włączony w całości i wówczas składa się ze 120 aminokwasów (V120), włączony częściowo na trzy sposoby: po dwa segmenty o łącznej długości 95 lub 89 aminokwasów (V95, V89), tylko jeden z segmentów, o długości 64 aminokwasów (V64) albo całkowicie wyłączony z łańcucha podjednostki FN (V0)

ki, stanowiące jednocześnie miejsce zakotwiczenia dla dojrzwających komórek. Najnowsze badania wskazują jednak, iż jest to struktura bardzo dynamiczna, składniki ECM są wysoce elastyczne, ulegają ciągłemu przemieszczaniu i odkształceniom. Fibrylarne i mikrofibrylarne składniki macierzy oddziałują wzajemnie ze sobą, z jednej strony utrzymując mocną, elastyczną i zwartą strukturę tkanki, z drugiej strony kontrolując funkcjonowanie komórek poprzez regulację oddziaływań komórka-macierz, modulację zewnątrzkomórkowych sygnałów oraz zapewnienie miejsc magazynowania czynników wzrostu i cytokin [71].

U podstaw molekularnych oddziaływań FN z komórkami leży interakcja z integrynami, integralnymi białkami błon komórkowych, biorącymi udział w procesach adhezji komórka-macierz lub komórka-komórka. Mechanizmy, dzięki którym fibrylarne białka ECM gromadzą się w pewnych miejscach i podlegają reorganizacji nie zostały dotychczas w pełni wyjaśnione, wiadomo jednak, że FN będąca składnikiem macierzy pozakomórkowej odgrywa główną rolę w takich procesach jak adhezja, migracja, angiogeneza czy procesy naprawcze [71]. Działając w parze z integryną, FN uczestniczy w przekazywaniu sygnału ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. Receptor integrynowy $\alpha_5\beta_1$ (nazywany również receptorem VLA-5) łączy FN z białkami cytoszkieletu taliną i winkuliną, które z kolei oddziałują z włóknami aktyny [19]. Interakcja FN z receptorem integrynowym leży u podstaw mechanizmów regulujących organizację cytoszkieletu i funkcjonowanie komórki [22].

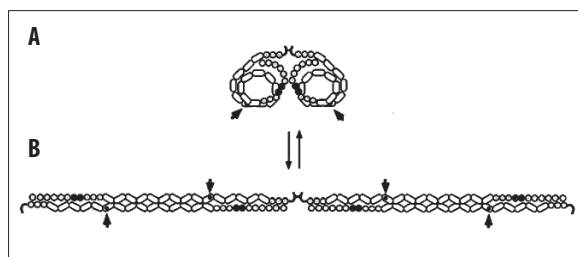
BUDOWA I FORMY MOLEKULARNE FIBRONEKTYNY

Podstawową jednostką strukturalną FN jest dimer składający się z dwóch podobnych, ale nie zawsze identycznych łańcuchów polipeptydowych o zbliżonych masach czą-

steczkowych około 250 kDa [28,66]. Każdy z łańcuchów FN zbudowany jest z powtarzających się motywów aminokwasowych oznaczonych jako typ I, II i III, rozmieszczonych nieregularnie i tworzących tzw. strukturę mozaikową białka (ryc. 1).

Typ I zbudowany jest z około 40 aminokwasów tworzących dwie leżące jedna nad drugą płaszczyzny przeciwrównoległej struktury β , jedną zbudowaną z dwóch nici, drugą z trzech [7]. Typ II składa się z około 40 aminokwasów tworzących dwie prawie prostopadłe względem siebie, dwuniciowe płaszczyzny przeciwrównoległej struktury β [60]. Oba typy zawierają po cztery konserwowane reszty cysteinowe tworzące mostki dwusiarczkowe usztywniające strukturę. Typ III utworzony jest z około 90 aminokwasów i składa się z dwóch położonych naprzeciw siebie płaszczyzn przeciwrównoległej struktury β , jednej trzy- a drugiej czteroniciowej [38]. Motywy wszystkich trzech typów występują również w cząsteczkach innych białek zwierzęcych, np. tenascyna, jedno z białek ECM, bogata jest w fibronektynowe moduły typu III [2,66]. Karboksylowe końce łańcuchów FN są połączone parą mostków dwusiarczkowych, a w obrębie każdego pojedynczego łańcucha występuje około 30 wewnątrzłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych, umiejscowionych w modułach typu I i II [66].

Powtarzające się moduły FN budują swoiste domeny. Domeny te są miejscami oddziaływań z różnego rodzaju innymi molekułami, takimi jak kolagen, heparyna, fibryna oraz z komórkami. FN jest białkiem podatnym na atak enzymów proteolitycznych (zwłaszcza proteaz serynowych), głównie w miejscach łączących poszczególne domeny. Powstałe w wyniku degradacji fragmenty FN w większości zachowują funkcjonalne właściwości domen, aczkolwiek mogą ujawniać aktywności, których nie wykazuje natywna FN [36,66].



Ryc. 2. Przebudowa strukturalna FN w zależności od środowiska. W roztworze FN jest białkiem globularnym (A), składającym się z liniowego szeregu niezależnie fałdujących globularnych motywów zwiniętych w stosunkowo zwartą strukturę. Po wbudowaniu w fibryle, cząsteczka FN jest rozciągnięta (B) i oddziałuje bocznie z sąsiadującymi cząsteczkami FN, prawdopodobnie ułożonymi przeciwrownolegle. Strzałka wskazuje miejsce wiążące integrinę (czarna kropka), które w wolnej cząsteczce FN jest częściowo niedostępne, a po rozwinięciu struktury staje się wyeksponowane. (Wg [28], za zgodą PNAS)

Fibronektyna w organizmach ssaków może występować w wielu postaciach molekularnych. Na jej heterogenność składa się obecność postaci powstałych w wyniku alternatywnego molekularnego składowania (alternative splicing) lub/ oraz posttranslacyjnej glikozylacji. Fibronektyna występuje w postaci rozpuszczalnej – osoczowej (pFN) i w dwóch postaciach nierozpuszczalnych: związanej z błoną komórkową oraz usieciowanej wielocząsteczkowej, obecnej w macierzy pozakomórkowej. Rozpuszczalna postać FN występuje nie tylko w osoczu, ale i innych płynach biologicznych: płynie owodniowym [21], mózgowo-rdzeniowym [64], ślinie [26]. Osoczowa FN jest wytwarzana w wątrobie przez hepatocyty. Postać nierozpuszczalna występuje na powierzchni różnego typu komórek oraz w macierzy pozakomórkowej, głównie w tkance łącznej. Ta postać jest wytwarzana przeważnie lokalnie w tkankach [42,57]. FN wytwarzana przez komórki inne niż hepatocyty nazywana jest komórkową (cFN). W prozowicznej macierzy występować może zarówno FN pochodząca z osocza, jak i wytwarzana miejscowo przez fibroblasty, limfocyty, makrofagi, komórki nabłonkowe, czy miocyty naczyń krwionośnych. Obie są produktem tego samego genu, a różnice strukturalne, które między nimi występują są wynikiem alternatywnego składowania na poziomie mRNA. Postacie osoczowa i tkankowa różnią się konformacją. Według Hynesa [28] pFN istnieje jako białko globularne, składające się z niezależnie fałdujących się domen o zwartej strukturze. W postaci nierozpuszczalnej cząsteczka FN ulega rozciągnięciu do postaci fibrylarnej, której włókienka asocjują, tworząc usieciowaną macierz (ryc. 2).

Hipoteza sformułowana przez Hynesa [28] znalazła potwierdzenie w pracach doświadczalnych. W fizjologicznych warunkach pH i siły jonowej FN utrzymywana jest w postaci zwiniętej dzięki swoistym oddziaływaniom pomiędzy poszczególnymi regionami w obrębie jednej cząsteczki. Zwiększenie siły jonowej i/lub pH powoduje rozwinięcie struktury FN [32]. Również podchloryn, wydzielany przez aktywowane neutrofile, może modyfikować strukturę FN i innych białek znajdujących się w ich bezpośrednim sąsiedztwie. Zaobserwowano, że reakcja łagodnego chlorowania pFN (1–2 mM HOCl/OCl⁻) prowadzi do rozfałdowania białka, zwiększa dostępność epitopów i powinowactwo w reakcji z przeciwciałami [54].

Alternatywne molekularne składowanie dotyczy trzech domen FN, zwanych ED-A, ED-B i IIICS (ryc. 1). Domeny ED-A i ED-B, o strukturze modułu typu III, występują w łańcuchu polipeptydowym, odpowiednio za modulem III₁₁ i III₇, i mogą być włączane lub wyłączane w całości. Domena IIICS, zwana też regionem zmiennym (V), a niekiedy nowotworowo-płodowym, składa się z segmentów, które mogą być w całości lub częściowo wbudowywane w domenę (ryc. 1). Różnice w ekspresji domen ED-A, ED-B i IIICS dają w sumie możliwość powstania 20 różnych izoform ludzkiej FN. Izoformy zawierające ED-A, wytwarzane przede wszystkim podczas embriogenezy i gojenia zranień, wpływają na adhezję komórek i ekspresję genów. Spowodowane jest to zdolnością swoistego oddziaływania ED-A z dwiema integrzynami, $\alpha_9\beta_1$ i $\alpha_4\beta_1$ [39]. FN zawierająca ED-B jest wytwarzana podczas embriogenezy, gojenia ran i w transformacji nowotworowej, jednak funkcja tej domeny nie została dotąd sprecyzowana. Badania krystalograficzne i NMR sugerują, że na styku modułów ED-B i III₈ tworzy się szczelina o kwasowym charakterze, niewystępująca na styku III₇ i III₈, która mogłaby być miejscem swoistego oddziaływania białko-białko [8]. Regiony ED-A i ED-B występują w różnym stopniu w cFN, natomiast w pFN są nieobecne [3]. Region IIICS wpływa na adhezję pewnych typów komórek, ponieważ zawiera miejsce wiązania integryny $\alpha_4\beta_1$. Wykazano też w tym regionie aktywność wiązania jonów dwuwartościowych, najprawdopodobniej o strukturze typu „palca cynkowego” [1]. W cząsteczce pFN jeden z łańcuchów dimeru zawsze ma ten region, drugi zaś jest jego pozbawiony [30].

Za heterogenność FN odpowiada również posttranslacyjna glikozylacja. FN zawiera około 5–9% węglowodanów przyłączonych wiązaniem N- lub O-glikozydowym, jednakże rozmiar oraz typ tej glikozylacji zmienia się w zależności od rodzaju tkanki i typu komórki [30]. Charakterystyczny profil glikozylacji znany jest dla pFN, cFN i embrionalnej FN [35]. FN ma siedem potencjalnych miejsc N-glikozylacji umiejscowionych na modułach typu II i III, w obrębie domeny wiążącej kolagen oraz domeny centralnej [49,72]. Większość N-glikanów pFN i komórkowej FN to dwuantenne oligosacharydy typu złożonego, występujące w kilku postaciach. W cząsteczce pFN dwa łańcuchy cukrowe ulegają fukozytacji, w FN komórkowej takich łańcuchów jest sześć [72]. Komórkowa FN zawiera tzw. fukozę rdzeniową przyłączoną wiązaniem α 1,6 glikozydowym, pFN natomiast przeważnie jest jej pozbawiona [17]. FN osoczowa zawiera więcej kwasu sjałowego przyłączonego do reszty galaktozy wiązaniem α 2,6 glikozydowym, podczas gdy komórkowa FN, usjałowana w mniejszym stopniu, zawiera kwas sjałowy przyłączony wiązaniem α 2,3 [17,34]. FN nowotworowo-płodowa, wytwarzana przez komórki embrionalne oraz zmienione nowotworowo, podlega O-glikozylacji przy jednej z reszt treoniny w regionie IIICS [45]. FN z płynu maziówkowego u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów różni się od pFN ładunkiem, masą cząsteczkową, zawartością węglowodanów (6,9%) oraz obecnością różnych izoform powstałych w wyniku alternatywnego składowania [9,59,82]. U chorych na reumatoidalne zapalenie stawów tkankowa FN łatwo ulega fragmentacji. Badania dowodzą, iż proteolityczne fragmenty FN mogą mieć znaczący udział w patologii reumatoidalnego zapalenia stawów [6, 23, 24]. Badania Przybysz i wsp. [62,63] wskazują, iż całkowita degradacja FN i słaba immunore-

aktywność niektórych domen z przeciwciałami monoklonalnymi oraz mała ekspresja kwasu sjałowego i fukozy na jej glikanach charakteryzuje wyłącznie wczesny etap choroby reumatoidalnego zapalenia stawów.

PRZYŁĄCZANIE SIĘ FIBRONEKTYNY DO KOMÓRKI

Fizjologiczne stężenie FN w osoczu ludzkim waha się w granicach 150–800 µg/ml i wynosi średnio 300 µg/ml [18]. Pomimo stałej obecności tak wysokich stężeń FN, proces tworzenia się fibryli fibronektyny nie zachodzi samorzutnie, lecz jest ściśle kontrolowany i regulowany przez komórki, na których powierzchni rozpoczyna się polimeryzacja. Izolowana z komórek, dojrzała macierz nie wykazuje zdolności przyłączania kolejnych cząsteczek fibronektyny [46].

Cząsteczki FN są swoiście wiązane do komórek poprzez obecne na ich powierzchni receptory integrynowe. Wymienia się co najmniej 12 rodzajów integryn, występujących na powierzchni różnych typów komórek, które mogą swoiście łączyć się z FN [61]. Większość z nich wykorzystuje centralnie położony region wiążący komórki, w którym w module III₁₀ występuje pętla aminokwasowa, zawierająca charakterystyczną dla białek oddziaływających z integrynami sekwencję RGD, a w module III₉ – synergistycznie działająca sekwencja PHSRN. Innym miejscem zdolnym do oddziaływania z integrynami jest region zmienny III_{CS}, z którym wiążą się takie integryny, jak np. $\alpha_4\beta_1$ i $\alpha_4\beta_7$ [56]. W inicjacji fibrylogenezy jedną z najistotniejszych jest integryna $\alpha_5\beta_1$. Aktywującą rolę może odgrywać jednocześnie, synergistycznie oddziaływanie integryny z receptorem aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (uPAR) [51] lub proteoglikanem, takim jak syndekan 4 [81].

Proces fibrylogenezy rozpoczyna się od przyłączenia wolnej osoczowej FN, poprzez sekwencję RGD, do receptora integrynowego [44,69,80]. Jednak wiele badań doświadczalnych wskazuje, że powstanie kompleksu FN-integryna musi być poprzedzone związaniem N-końcowej części FN z odpowiednim miejscem na powierzchni komórki [74]. Próby identyfikacji miejsca wiążącego N-końiec FN nie dały dotąd jednoznacznych wyników. Wykazano, że N-końcowy region FN wiąże się z powierzchnią komórki odwracalnie i do ograniczonej liczby miejsc wiążących [47]. W celu wyizolowania ewentualnego receptora błonowego, Zhang i Mosher [83] inkubowali komórki ze znakowanym 70 kDa N-końcowym fragmentem FN, następnie dodawali transglutaminazę osoczową jako czynnika sieciującego i ekstrahowali za pomocą 2% siarczanu dodecyłu sodu. Zaobserwowali cząstki, których ruchliwość w SDS-PAGE odpowiadała masie wyższej niż 3000 kDa, z czego wywnioskowali, że receptory N-końcowego regionu mają wyjątkowo dużą masę cząsteczkową, albo nie dają się przeprowadzić do roztworu za pomocą siarczanu dodecyłu sodu. Christopher i wsp. [12] zaobserwowali istnienie trzech morfologicznie różnych miejsc wiązania 70 kDa N-końcowych fragmentów FN, z czego dwa zlokalizowane były na powierzchni komórki, w ogniskach przylegania (focal adhesions) i w miejscach kontaktu z macierzą (matrix contacts, zwanych też miejscami przylegania włókienkowego – fibrillar adhesions), natomiast trzecie w macierzy pozakomórkowej, na powstają-

cych włóknach fibronektynowych. Bae i wsp. [3] wykazali, że w hodowli *in vitro* przyłączanie się egzogennej FN do komórek pozbawionych powierzchniowej FN i niesyntezyzujących jej samodzielnie zależy od obecności odpowiednich białek adhezyjnych (pFN lub lamininy 1, lecz nie witronektyny) w podłożu, na którym hodowane są komórki. Efekt taki nie jest zauważalny dla komórek syntetyzujących endogennie FN. Wyniki tych badań sugerują, że do integryny efektywnie przyłącza się jedynie świeżo wydzielona FN, w przeciwnym razie wiązanie wymaga jednoczesnego oddziaływania FN z odpowiednim podłożem (macierzą). Jako miejsce wiązania N-końcowego regionu FN rozważano też integrynę $\alpha_5\beta_1$ [19], co wydają się potwierdzać doświadczenia Kamiya i wsp. [33], w których przeciwciała skierowane przeciwko podjednostce β_1 blokują przyłączanie się 70 kDa N-końcowego fragmentu FN do powierzchni komórek. Tej hipotezie zaprzeczają jednak wyniki innych badań. Na przykład, zaobserwowano, że znakowane złotem 70 kDa N-końcowe fragmenty FN wiążą się na powierzchni komórki w zupełnie innym miejscu niż znakowane 160–180 kDa fragmenty centralne zawierające sekwencję RGD, a więc wiążące integrynę $\alpha_5\beta_1$ [58]. Zaobserwowano też, za pomocą przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie, że lokalizacja N-końcowych fragmentów FN jest inna niż podjednostki α_5 heterodimeru integryny [74]. Niezależnie od szczegółów mechanizmu wiązania FN do komórki, wiele wskazuje na to, że aby doszło do oddziaływania FN-integryna, region zawierający sekwencję RGD musi zostać najpierw wyeksponowany poprzez zaangażowanie N-końcowej części FN w wiązanie z odpowiednim miejscem [74]. Najnowsze badania przyniosły odkrycie jeszcze jednego sposobu inicjacji fibrylogenezy, niezależnej od motywu RGD. Okazało się, że w N-końcowej części FN, w module I₅ istnieje sekwencja NGR, która pod wpływem nieenzymatycznego przekształcenia asparaginy w izoasparaginy staje się sekwencją zdolną do swoistego oddziaływania z integryną $\alpha_5\beta_3$ (izo-DGR) i zapoczątkowania wzrostu fibryli [73]. Jest to zatem mechanizm regulowany posttranslacyjną modyfikacją aminokwasową.

TWORZENIE FIBRYLI FIBRONEKTYNOWYCH

Przyłączenie FN do integryny wywołuje zmianę konformacyjną receptora i jego przejście w stan aktywowany [27]. Aktywowane receptory integrynowe $\alpha_5\beta_1$ w kompleksie z FN zaczynają tworzyć skupiska. Proces ten zachodzi dzięki dimerycznej budowie cząsteczek FN [68]. Następnie kompleksy przemieszczają się po powierzchni komórki z ognisk przylegania (focal adhesions) w kierunku części centralnej, do miejsc tworzenia włókien (fibrillar adhesions) [53,55]. Przemieszczanie jest zależne od oddziaływania, pośredniczonego przez tensynę, cytosolowej części aktywowanych receptorów integrynowych z cytoszkieletem aktynowym [55]. Zmiana wzajemnego położenia kompleksów integryna-FN podczas przemieszczania powoduje naprężenia w obrębie cząsteczek fibronektyny. Skutkuje to zmianą struktury FN ze zwartej w rozciągniętej (ryc. 2). Technika fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii wykazała, że zmiana kształtu cząsteczki FN pod wpływem naprężeń, zachodząca podczas fibrylogenezy nie jest jednostopniowym przejściem z konformacji globularnej w fibrylarną, ale odbywa się w sposób wielostopniowy [5]. Rozciągnięcie cząsteczki FN ekspozuje

liczne rejony oddziaływań FN-FN. Najistotniejszy w procesie fibrylogenezy jest region N-końcowy, obejmujący moduły I₁₋₅ [68]. W obrębie podjednostki FN istnieją co najmniej trzy rejony zdolne do oddziaływania z N-końcowymi modułami, obejmujące motywy III₁₋₂ i III₇ w centralnej części łańcucha oraz III₁₂₋₁₄ w domenie heparynowej II [19,80]. Dodatkowo, moduły III₇, III₁₀ i III₁₅ mogą wiązać moduł III₁ [19], a III₂₋₃ może oddziaływać z III₁₂₋₁₄ [32]. Tego typu oddziaływania odgrywają rolę zarówno w tworzeniu fibryli, jak i w utrzymywaniu globularnej, nieaktywnej postaci wolnych cząsteczek FN w roztworze. Na przykład, motywy III₁₋₂ w cząsteczce wolnej FN występują w konformacji charakteryzującej się zdolnością do słabego oddziaływania z N-końcem, co pomaga w utrzymaniu globularnej struktury. Rozciągnięcie cząsteczki powoduje zmianę wzajemnego położenia tych dwóch motywów i utworzenie miejsca silnego oddziaływania z N-końcem, promującego fibrylogenezę [76]. Interakcje zachodzą pomiędzy sąsiadującymi cząsteczkami FN w kompleksach z integrynami, a także pomiędzy związanymi i wolnymi cząsteczkami FN, które przyłączają się do powstających struktur wprost z roztworu, z pominięciem wiązania się z integryną [70]. We wczesnych etapach powstawania, fibryle fibronektynowe są rozpuszczalne w deoksycholanie, później zaś, w sposób nieodwracalny, przechodzą w struktury nierozpuszczalne [46]. Nie jest do końca pewne, jakie zjawisko odpowiada za ten proces. Odkrycie w C-końcowym rejonie FN, w module I₁₂, aktywności izomeryzy dwusiarczkowej [37], nasuwa podejrzenie, że sąsiadujące ze sobą łańcuchy FN w fibrylach mogą ulegać sieciowaniu poprzez tworzenie międzycząsteczkowych mostków dwusiarczkowych, jednakże jak dotąd nie udało się tej hipotezy potwierdzić [44]. Inną możliwością jest tworzenie wysoce stabilnych, niekowalencyjnych oddziaływań białko-białko [10], co zostało potwierdzone dla modułu III₉, który po częściowym rozfałdowaniu ulegał polimeryzacji na zasadzie tworzenia międzycząsteczkowych struktur β typu amyloidowego (3D domain swapping) [40]. FN jest też substratem transglutaminazy tkankowej, biorącej udział w sieciowaniu fibryli fibronektynowych [78]. W miarę narastania fibryli fibronektynowych, powstałe struktury uwalniają się stopniowo od komórkowych receptorów integrynowych. Odbywa się to pod wpływem siły mechanicznej [79]. Dimery FN wbudowane w sieć fibrylną podlegają podczas tworzenia i funkcjonowania ECM znacznemu rozciąganiu. Dochodzi do rozfałdowywania struktur drugorzędowych w motywach typu III. Rozciągnięcie modułu III₁₀ powoduje zmianę konformacji pętli RGD i zmniejszenie jej dostępności dla receptora integrynowego, co ułatwia oderwanie się fibronektyny wbudowanej w fibrylę od komórki. W całym procesie fibrylogenezy mechanicznie wymuszone, stopniowe rozfałdowywanie cząsteczki FN bezpośrednio wpływa na jej funkcjonowanie.

Komunikacja komórek z macierzą jest niezbędna do ich funkcjonowania. Zahamowanie jej powoduje „anoikis” – apoptotyczną śmierć spowodowaną utratą prawidłowego oddziaływania integryna-ECM [15]. W cząsteczce FN znaleziono dwa miejsca o aktywności antyadhezyjnej, przeciwdziałającej wiązaniu się integryn z macierzą: w module III₁₄ oraz III₁₀ [16,50]. Działają one najprawdopodobniej przez swoisty receptor błonowy, którego aktywność blokuje aktywację integryn [50]. Miejsca te są ukryte we wnętrzu cząsteczki i ulegają wyeksponowaniu dopiero po związa-

niu FN z heparyną lub strawieniu przez metaloproteinazę macierzy typu 2 (MMP-2). To, czy stają się one aktywne również poprzez mechaniczne rozciągnięcie cząsteczki FN w fibryli nie zostało jak dotąd zbadane.

ODDZIAŁYWANIE FIBRONEKTyny ZE SKŁADNIKAMI MACIERZY

Białkiem najpowszechniej występującym w macierzy jest kolagen. Za pomocą immunofluorescencji wykazano, że w macierzy pozakomórkowej fibronektyna współwystępuje z kolagenem i jej nieobecność uniemożliwia tworzenie prawidłowych fibryli kolagenowych [77]. W cząsteczce fibronektyny wyróżnia się miejsce wiążące kolagen, obejmujące moduły I₆II₁₋₂I₇₋₉ [19]. Jednakże sposób oddziaływania między kolagenem a fibronektyną jest jak dotąd mało poznany. Paradoksalne wydaje się to, że wiązanie fibronektyny *in vitro* z natywnym kolagenem, w porównaniu do zdenaturowanego, jest słabe [31]. Innymi białkami macierzy, które wiążą się do fibronektyny, są tenascyna [13], fibulina [4], czy trombospondyna [65].

Powszechnie występującymi makrocząsteczkami w macierzy pozakomórkowej są też proteoglikany i glikozoaminoglikany. Najlepiej zbadane jest wiązanie fibronektyny do heparyny. Mechanizm oddziaływania FN z glikozaminoglikanami, na przykładzie reakcji z heparyną przystępnie opisał Ingham [30] na stronie internetowej „Fibronectin – molecular interactions”. Miejsce wiązania glikozoaminoglikanów w FN obejmuje moduły III₁₂₋₁₄ i nazywane jest miejscem wiążącym heparynę II. W cząsteczce FN wyróżniono też inne miejsce oddziałujące z heparyną swoiście, choć nieco słabiej niż wcześniej wspomniane, zwane miejscem wiążącym heparynę I i obejmujące moduły I₁₋₅. Uważa się, że w oddziaływaniu FN z glikozoaminoglikanami w ECM pośredniczą oba te miejsca, a także dwa inne, znacznie słabiej wiążące heparynę, położone w N-końcowej części domeny wiążącej komórki. W macierzy pozakomórkowej FN oddziałuje głównie z siarczanami heparanu i chondroityny i ich proteoglikanami. Wspomniane wcześniej oddziaływanie z występującym na powierzchni komórek wytwarzających macierz syndekanem 4 podczas etapu wiązania się z integryną również zachodzi poprzez łańcuch siarczanu heparanu. Badania Chena i wsp. [11] wskazują, że oddziaływanie FN z proteoglikanami bogatymi w siarczan heparanu może być jednym ze sposobów regulacji aktywności np. transformującego czynnika wzrostu β (TGF-β). Czynniki ten odkładany jest w ECM w postaci nieaktywnych kompleksów z białkiem wiążącym latentny TGF-β (LTBP1). LTBP1 ma w swojej strukturze miejsce wiążące heparynę. Wykazano, że łączy się ono za pośrednictwem proteoglikanów siarczanu heparanu z FN i w ten sposób zostaje wbudowane w macierz, gdzie jest magazynowane. FN jest głównym regulatorem odkładania LTBP1 w macierzy, a zatem i lokalnej aktywności TGF-β, wielofunkcyjnego czynnika kontrolującego proliferację, różnicowanie, transformację czy apoptozę komórek. Istnieją też doniesienia o oddziaływaniu niektórych proteoglikanów z FN poprzez ich rdzeń białkowy [25].

UDZIAŁ FN W PROCESACH NAPRAWCZYCH

Niewłaściwe gojenie się ran występuje u osób z deficytem czynnika krzepnięcia XIIIa. Czynniki ten kowalencyjnie sieciuje cząsteczki fibryny podnosząc jej stabil-

ność strukturalną, ponadto odpowiada za wiązanie FN do skrzepu fibrynowego. W początkowej fazie krzepnięcia uczestniczy głównie osoczowa FN z wbudowanym regionem V tylko w jednej z dwóch podjednostek dimeru [42]. Skrzep przywraca integralność naczyń krwionośnych a jednocześnie tworzy tymczasową macierz fibrynowo-fibronektynową [48]. Sposób oddziaływania FN z fibryną jest przedmiotem wielu badań. Dotychczas ustalono, że w pierwszej kolejności dochodzi do niekwalencyjnej interakcji domeny fibrynowej I (moduły I₁₋₅) ze swoistym miejscem w cząsteczce fibryny, następnie pod wpływem czynnika XIIIa wytwarza się kowalencyjne wiązanie, które wzmacnia kompleks. W końcu dochodzi do interakcji drugiej domeny wiążącej fibrynę, obejmującej moduły I₁₀₋₁₂, która oddziałuje z fibryną słabiej i mniej swoiście, ale prawdopodobnie pomaga cząsteczkom FN w skrzepie przybrać odpowiednią konformację, eksponującą jej miejsca wiążące [43]. Ułatwia to adhezję, rozprzestrzenianie fibroblastów i umożliwia migrację elementów komórkowych do miejsca zranienia. W dalszej fazie udział w tworzeniu prowizorycznej macierzy ma przede wszystkim komórkowa FN pochodząca z komórek zgromadzonych w miejscu zranienia. Magnusson i Mosher [42] sugerują, że to właściwości adhezyjne komórkowej FN decydują o jej znaczeniu w procesach naprawczych. Kolejnym etapem jest zastąpienie macierzy prowizorycznej macierzą właściwą zbudowaną głównie z kolagenu i niewielkich ilości FN. Badania *in vivo* nad rolą pFN w gojeniu zranień skóry wykazały, że czasowe wyłączenie wytwarzania osoczowej FN nie zatrzymuje procesów naprawczych, jednakże przebiegają one znacznie wolniej, a obszar zapalny jest znacząco większy niż w przypadku stałej obecności pFN [67]. Ghosh i wsp. [20] opracowali hydrożelowy opatrunek przyspieszający gojenie, w którym zastosowali połączenie funkcjonalnych domen FN z kwasem hialu-

ronowym. Zbadano również znaczenie FN *in vivo* w incydentach niedokrwiennych. Otrzymane wyniki wykazały, że pFN gromadzi się w znacznej ilości w miejscu niedokrwionym, wydatnie przyspiesza gojenie oraz ogranicza obszar dotknięty niedokrwieniem [67].

PODSUMOWANIE

Fibronektyna jest glikoproteina o unikatowej, mozaikowej budowie, której segmenty układają się w aktywne biologicznie domeny zdolne do reakcji z różnymi składnikami środowiska. Wyjątkowość tego białka polega na możliwości zmiany struktury przestrzennej w zależności od warunków środowiska i potrzeb organizmu. W krwi FN krąży w postaci białka globularnego, nieaktywnego pod względem biologicznym, ale gotowego do wzięcia udziału w ważnych dla organizmu procesach tkankowych. Tak się dzieje w przypadku naprawy zranień. Fibronektyna osoczowa wraz z fibryną w wieloetapowym procesie tworzy prowizoryczną siateczkę, która stanowi podstawę do odbudowania zniszczonej tkanki. Procesowi temu towarzyszy zmiana konformacji fibronektyny z globularnej w rozciągniętą – włókienną oraz odsłonięcie niektórych, ukrytych do tej pory miejsc aktywnych. Najnowsze wyniki prac wskazują, że rola FN nie kończy się na odtworzeniu tkanki. Jako składnik tkankowy bierze aktywny udział w komunikacji komórek z otoczeniem, przekształcając bodźce mechaniczne na sygnały biochemiczne. Badania nad fibronektyną wchodzi w nową fazę. Wydaje się, że kluczem do wyjaśnienia jej roli w procesach metabolicznych jest spojrzenie na nią jako na cząsteczkę niezwykle dynamiczną pod względem struktury i funkcji. Z medycznego punktu widzenia można zadać pytanie czy zmiany w ekspozycji domen i glikotopów mogą być wykładnikiem stanu organizmu?

PIŚMIENNICTWO

- [1] Askari J.A., Thornton D.J., Humphries J.D., Buckley P.A., Humphries M.J.: The alternatively spliced type III connecting segment of fibronectin is a zinc-binding module. *Matrix Biol.*, 2007; 26: 485–493
- [2] Aumailley M., Gayraud B.: Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.*, 1998; 76: 253–265
- [3] Bae E., Sakai T., Mosher D.F.: Assembly of exogenous fibronectin by fibronectin-null cells is dependent on the adhesive substrate. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 35749–35769
- [4] Balbona K., Tran H., Godyna S., Ingham K.C., Strickland D.K., Argraves W.S.: Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 20120–20125
- [5] Baneyx G., Baugh L., Vogel V.: Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 14464–14468
- [6] Barilla M.L., Carsons S.E.: Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2000; 29: 252–265
- [7] Baron M., Norman D., Willis A., Campbell I.D.: Structure of the fibronectin type I module. *Nature*, 1990; 345: 642–646
- [8] Bencharit S., Cui C.B., Siddiqui A., Howard-Williams E.L., Sondek J., Zuobi-Hasona K., Aukhil I.: Structural insights into fibronectin type III domain-mediated signaling. *J. Mol. Biol.*, 2007; 367: 303–309
- [9] Carsons S.: Enhanced expression of a peanut agglutinin reactive O linked oligosaccharide on fibronectins from the synovial fluid of patients with rheumatic disease: quantitation, domain localization, and functional significance. *J. Rheumatol.*, 2002; 29: 896–902
- [10] Chen H., Mosher D.F.: Formation of sodium dodecyl sulfate-stable fibronectin multimers. Failure to detect products of thiol-disulfide exchange in cyanogen bromide or limited acid digests of stabilized matrix fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 9084–9089
- [11] Chen Q., Sivakumar P., Barley C., Peters D.M., Gomes R.R., Farach-Carson M.C., Dallas S.L.: Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of TGF- β by modulating assembly of latent TGF- β binding protein-1 (LTBP1). *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 26418–26430
- [12] Christopher R.A., Kowalczyk A.P., McKeown-Longo P.J.: Localization of fibronectin matrix assembly sites on fibroblasts and endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 1997; 110: 569–581
- [13] Chung C.Y., Zardi L., Erickson H.P.: Binding of tenascin-C to soluble fibronectin and matrix fibrils. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 29012–29017
- [14] French-Constant C.: Alternative splicing of fibronectin – many different proteins but few different functions. *Exp. Cell Res.*, 1995; 221: 261–271
- [15] Frisch S.M., Screaton R.A.: Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001; 13: 555–562
- [16] Fukai F., Mashimo M., Akiyama K., Goto T., Tanuma S., Katayama T.: Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide. *Exp. Cell Res.*, 1998; 242: 92–99
- [17] Fukuda M., Levery S.B., Hakomori S.: Carbohydrate structure of hamster plasma fibronectin. Evidence for chemical diversity between cellular and plasma fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 1982; 257: 6856–6860
- [18] Garat C., Kheradmand F., Albertine K.H., Folkesson H.G., Matthay M.A.: Soluble and insoluble fibronectin increases alveolar epithelial wound healing *in vitro*. *Am. J. Physiol.*, 1996; 271: L844–L853

- [19] Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K.M.: Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2: 793–805
- [20] Ghosh K., Ren X.D., Shu X., Prestwich G., Clark R.: Fibronectin functional domain coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing. *Tissue Eng.*, 2006; 12: 601–613
- [21] Hirnle L., Kątnik-Prastowska I.: Amniotic fibronectin fragmentation and expression of its domains, sialyl and fucosyl glykotoques associated with pregnancy complicated by intrauterine infection. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007; 45: 208–214
- [22] Hocking D.C., Sottile J., Langenbach K.J.: Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin polymerization. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 10673–10682
- [23] Homandberg G.A.: Cartilage damage by matrix degradation products, fibronectin fragments. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2001; 391: S100–S107
- [24] Homandberg G.A.: Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments. *Front. Biosci.*, 1999; 4: D713–D730
- [25] Hopf M., Gohring W., Kohfeldt E., Yamada Y., Timpl R.: Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 259: 917–925
- [26] Huynh Q., Wang S., Tafolla E., Gansky S., Kapila S., Armitage G., Kapila Y.: Specific fibronectin fragments as markers of periodontal disease status. *J. Periodontol.*, 2002; 73: 1101–1110
- [27] Hynes R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002; 110: 573–687
- [28] Hynes R.O.: The dynamic dialogue between cells and matrices: Implications of fibronectin's elasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 2588–2590
- [29] Hynes R.O., Bye J.M.: Density and cell cycle dependence of cell surface proteins in hamster fibroblasts. *Cell*, 1974; 3: 113–120
- [30] Ingham K.: Fibronectin – molecular interactions. <http://home.comcast.net/~kennethingham/newsite/index.htm> (18.10.2007)
- [31] Ingham K.C., Landwehr R., Engel J.: Interaction of fibronectin with C1q and collagen. Effects of ionic strength and denaturation of the collagenous component. *Eur. J. Biochem.*, 1985; 148: 219–224
- [32] Johnson K.J., Sage H., Briscoe G., Erickson H.P.: The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 15473–15479
- [33] Kamiya S., Kato R., Wakabayashi M., Tohyama T., Enami I., Ueki M., Yajima H., Ishii T., Nakamura H., Katayama T., Takagi J., Fukai F.: Fibronectin peptides derived from two distinct regions stimulate adipocyte differentiation by preventing fibronectin matrix assembly. *Biochemistry*, 2002; 41: 3270–3277
- [34] Kötting E., Hell B., Müller C., Kainer F., Tauber R.: Development changes in the glycosylation and binding properties of human fibronectins. Characterization of the glycan structures and ligand binding of human fibronectins from adult plasma, cord blood and amniotic fluid. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 1989; 370: 1285–1294
- [35] Kriegsmann J., Berndt A., Hansen T., Borsi L., Zardi L., Bräuer R., Petrov P.K., Otto M., Kirkpatrick C.J., Gay S., Kosmehl H.: Expression of fibronectin splice variants and oncofetal glycosylated fibronectin in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol. Int.*, 2004; 24: 25–33
- [36] Labat-Robert J.: Cell-matrix interactions in aging: role of receptors and matricryptins. *Ageing Res. Rev.*, 2004; 3: 233–247
- [37] Langenbach K.J., Sottile J.: Identification of protein-disulfide isomerase activity in fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7032–7038
- [38] Leahy D.J., Aukhil I., Erickson H.P.: 2.0 Å crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell*, 1996; 84: 155–164
- [39] Liao Y.F., Gotwals P.J., Kotliansky V.E., Sheppard D., Van De Water L.: The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_5\beta_3$ providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 14467–14474
- [40] Litvinovich S.V., Brew S.A., Aota S., Akiyama S.K., Haudenschild C., Ingham K.C.: Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. *J. Mol. Biol.*, 1998; 280: 245–258
- [41] Longtin R.: Birthday of a breakthrough: Fibronectin research proves important, but not as originally expected. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004; 96: 6–8
- [42] Magnuson M.K., Mosher D.F.: Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18: 1363–1370
- [43] Makogonenko E., Ingham K.C., Medved L.: Interaction of the fibronectin COOH-terminal Fib-2 regions with fibrin: further characterization and localization of the Fib-2-binding sites. *Biochemistry*, 2007; 46: 5418–5426
- [44] Mao Y., Schwarzbauer J.E.: Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.*, 2005; 24: 389–399
- [45] Matsuura H., Greene T., Hakomori S.: An α -N-acetylgalactosaminylation at the threonine residue of a defined peptide sequence creates the oncofetal peptide epitope in human fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 10472–10476
- [46] McKeown-Longo P.J., Mosher D.F.: Binding of plasma fibronectin to cell layers of human skin fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 1983; 97: 466–472
- [47] McKeown-Longo P.J., Mosher D.F.: Interaction of the 70,000-mol-wt amino-terminal fragment of fibronectin with the matrix-assembly receptor of fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 1985; 100: 364–374
- [48] Midwood K.S., Williams L.V., Schwarzbauer J.E.: Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004; 36: 1031–1037
- [49] Millard C.J., Campbell I.D., Pickford A.R.: Gelatin binding to the 8F19F1 module pair of human fibronectin requires site-specific N-glycosylation. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 4529–4534
- [50] Miura S., Kamiya S., Saito Y., Wada S., Hayashi R., Taira J., Kodama H., Yajima H., Ueki M., Fukai F.: Antiadhesive sites present in the fibronectin type III-like repeats of human plasma fibronectin. *Biol. Pharm. Bull.*, 2007; 30: 891–897
- [51] Monaghan E., Gueorguiev V., Wilkins-Port C., McKeown-Longo P.J.: The receptor for urokinase-type plasminogen activator regulates fibronectin matrix assembly in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 1400–1407
- [52] Morrison P.R., Edsall J.T., Miller S.G.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, 1948; 70: 3103–3108
- [53] Ohashi T., Kiehart D.P., Erickson H.P.: Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants. *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 1221–1229
- [54] Olszowski S., Olszowska E., Kusior D., Piowarczyk M., Stelmaszewska T.: Hypochlorite action on plasma fibronectin promotes its extended conformation in complex with antibodies. *J. Protein Chem.*, 2003; 22: 449–456
- [55] Pankov R., Cukierman E., Katz B.-Z., Matsumoto K., Lin D.C., Lin S., Hahn C., Yamada K.M.: Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of $\alpha_5\beta_1$ integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.*, 2000; 148: 1075–1090
- [56] Pankov R., Yamada K.M.: Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 3861–3863
- [57] Pearlstein E., Gold L.I., Garcia-Pardo A.: Fibronectin: a review of its structure and biological activity. *Mol. Cell. Biochem.*, 1980; 29: 103–128
- [58] Peters D.M., Mosher D.F.: Localization of cell surface sites involved in fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.*, 1987; 104: 121–130
- [59] Peters J.H., Carsons S., Yoshida M., Ko F., McDougall S., Loreda G.A., Hahn T.J.: Electrophoretic characterization of species of fibronectin bearing sequences from the N-terminal heparin-binding domain in synovial fluid samples from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2003; 5: R329–R339
- [60] Pickford A.R., Potts J.R., Bright J.R., Phan I., Campbell I.D.: Solution structure of a type II module from fibronectin: implications for the structure and function of the gelatin-binding domain. *Structure*, 1997; 5: 359–370
- [61] Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., Smith J.W.: Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 21785–21788
- [62] Przybysz M., Borysewicz K., Szechiński J., Kątnik-Prastowska I.: Synovial fibronectin fragmentation and domain expression in relation to rheumatoid arthritis progression. *Rheumatology*, 2007; 46: 1071–1075
- [63] Przybysz M., Maszczak D., Borysewicz K., Szechiński J., Kątnik-Prastowska I.: Relative sialylation and fucosylation of synovial and plasma fibronectins in relation to the progression and activity of rheumatoid arthritis. *Glycoconj. J.*, 2007; Jul. 3; [Epub. ahead of print]

- [64] Riordan F., Bestwick K., Thomson A., Sills J., Hart C.: Plasma fibronectin levels in meningococcal disease. *Eur. J. Pediatr.*, 1997; 156: 451–453
- [65] Rodrigues R.G., Guo N., Zhou L., Sipes J.M., Williams S.B., Templeton N.S., Gralnick H.R., Roberts D.D.: Conformational regulation of the fibronectin binding and $\alpha_3\beta_1$ integrin-mediated adhesive activities of thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 27913–27922
- [66] Romberger D.J.: Fibronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997; 29: 939–943
- [67] Sakai T., Johnson K.J., Murozono M., Sakai K., Magnuson M.A., Wieloch T., Cronberg T., Isshiki A., Erickson H., Fassler R.: Plasma fibronectin support neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat. Med.*, 2001; 7: 324–330
- [68] Schwarzbauer J.E.: Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *J. Cell Biol.*, 1991; 113: 1463–1473
- [69] Schwarzbauer J.E., Sechler J.L.: Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999; 11: 622–627
- [70] Sechler J.L., Takada Y., Schwarzbauer J.E.: Altered rate of fibronectin matrix assembly by deletion of the first type III repeats. *J. Cell Biol.*, 1996; 134: 573–583
- [71] Sivakumar P., Czirok A., Rongish B.J., Divakara V.P., Wang Y.P., Dallas S.L.: New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 1350–1360
- [72] Tajiri M., Yoshida S., Wada Y.: Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. *Glycobiology*, 2005; 15: 1332–1340
- [73] Takahashi S., Leiss M., Moser M., Ohashi T., Kitao T., Heckmann D., Pfeifer A., Kessler H., Takagi J., Erickson H.P., Fassler R.: The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J. Cell Biol.*, 2007; 178: 176–178
- [74] Tomasini-Johansson B.R., Annis D.S., Mosher D.F.: The N-terminal of fibronectin binds to cell surface fibronectin assembly sites in the absence of intact fibronectin. *Matrix Biol.*, 2006; 25: 282–293
- [75] Toratani T., Kezuka Y., Nonaka T., Hiragi Y., Watanabe T.: Structure of full-length bacterial hitinase containing two fibronectin type III domains revealed by small angle X-ray scattering. *Biophys. Res. Commun.*, 2006; 348: 814–818
- [76] Vakonakis I., Staunton D., Rooney L.M., Campbell I.D.: Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis. *EMBO J.*, 2007; 26: 2575–2583
- [77] Velling T., Risteli J., Wennerberg K., Mosher D.F., Johansson S.: Polymerisation of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins $\alpha_{11}\beta_1$ and $\alpha_3\beta_1$. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 37377–37381
- [78] Verderio E., Nicholas B., Gross S., Griffin M.: Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. *Exp. Cell Res.*, 1998; 239: 119–138
- [79] Vogel V., Thomas W.E., Craig D.W., Krammer A., Baneyx G.: Structural insight into the mechanical regulation of molecular recognition sites. *Trends Biotechnol.*, 2001; 19: 416–423
- [80] Wierzbicka-Patynowski I., Schwarzbauer J.E.: The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 3269–3276
- [81] Woods A., Couchman J.R.: Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched widespread focal adhesion component. *Mol. Biol. Cell*, 1994; 5: 183–192
- [82] Yasuda T.: Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod. Rheumatol.*, 2006; 16: 197–205
- [83] Zhang Q., Mosher D.F.: Cross-linking of the NH₂-terminal region of fibronectin to molecules of large apparent molecular mass. Characterization of fibronectin assembly sites induced by the treatment of fibroblasts with lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 33284–33292