

УДК 576.52;577.352

# Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков КОЖИ

А. Л. Риппа<sup>1\*</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>1,2</sup>, А. В. Васильев<sup>1</sup>, В. В. Терских<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: rippa86@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.05.2013

**РЕФЕРАТ** Интегрины играют важнейшую роль в регуляции адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. В связи с многообразием выполняемых функций интегрины необходимы для становления и поддержания целостности гистотипической структуры тканей. Накопилось немало данных, свидетельствующих об участии интегринов в морфогенезе эпидермиса кожи и ее придатков. Создание мышей с тканеспецифическим нокаутом генов интегринов и определение генетической основы ряда кожных заболеваний у человека позволили понять значение интегринов в биологии, физиологии и морфогенезе эпидермиса и волосяного фолликула. Обсуждаются данные о роли различных классов интегриновых рецепторов в биологии эпидермальных клеток, развитии эпидермиса и волосяных фолликулов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** базальная мембрана, волосяной фолликул, дифференцировка, интегрины, кератиноциты, миграция, морфогенез, пролиферация, стволовые клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БМ – базальная мембрана; ВКМ – внеклеточный матрикс; ВФ – волосяной фолликул; СК – стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ILK (integrin-linked kinase) – интегрин-связанная киназа.

## ВВЕДЕНИЕ

Интегрины – важнейший класс поверхностных рецепторов, которые связываются с молекулами внеклеточного матрикса (ВКМ) и участвуют таким образом во взаимодействии клеток с окружающей средой, преобразуя сигналы микроокружения во внутриклеточные сигналы и запуская множество регуляторных каскадов. В конечном итоге это может приводить к самым разным вариантам клеточного ответа. Сигналы, поступающие от интегриновых рецепторов, регулируют адгезию, миграцию, рост, дифференцировку и гибель клеток. Нарушение функционирования системы интегринов у многоклеточных животных приводит к развитию различных патологий.

Интегрины – это нековалентно связанные гетеродимерные трансмембранные рецепторы, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, которые образуют функциональный рецептор. В настоящее время известно 18  $\alpha$ - и 8  $\beta$ -субъединиц интегринов позвоночных. Эти 26 субъединиц при взаимодействии образуют по меньшей мере 24 комбинации  $\alpha\beta$ -рецепторов (рис. 1). В зависимости от типа  $\beta$ -субъединиц интегрины подразделяются на три класса. Интегрины  $\beta 1$ , образующие наиболее распространенную группу, связываются

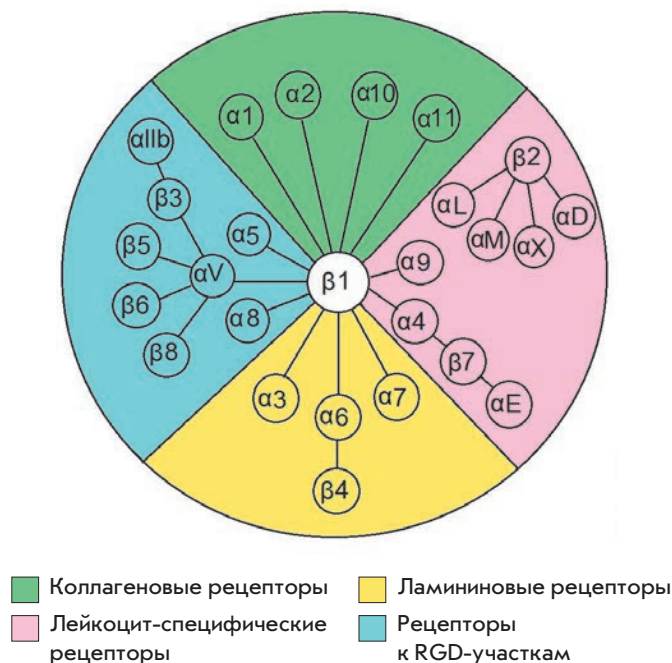
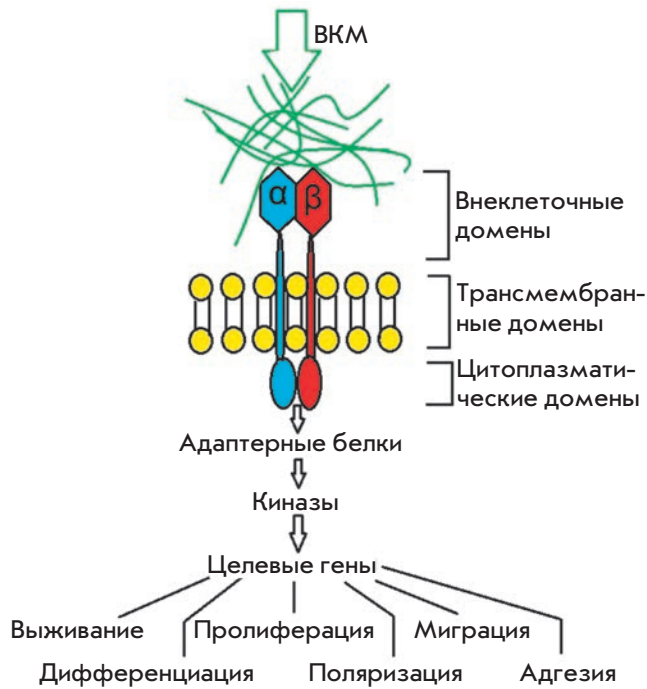


Рис. 1. Схематическое представление семейства гетеродимерных интегриновых рецепторов [1, 2]

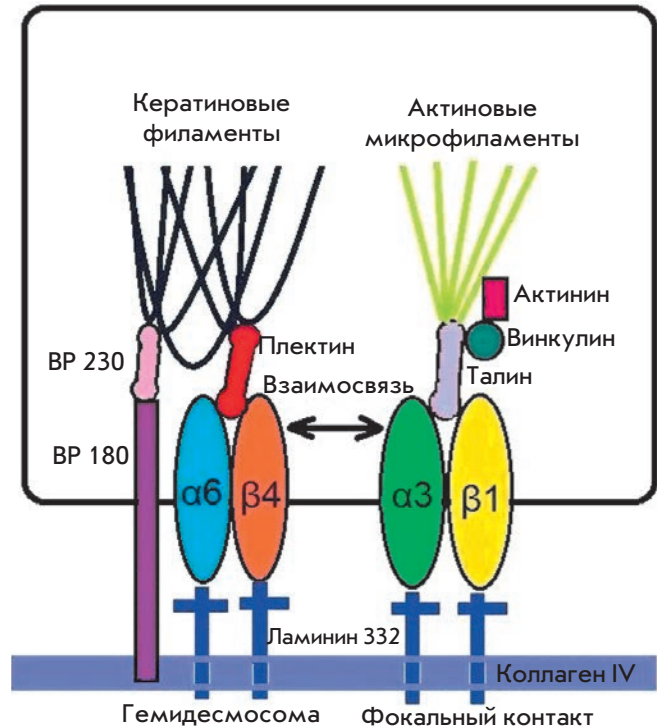


**Рис. 2.** Принцип действия сигналов внеклеточной среды на внутриклеточные процессы через интегриновые рецепторы

главным образом с белками ВКМ. Интегрины  $\beta 2$  экспрессируются только в лейкоцитах, часть из них связывается с поверхностными белками других клеток. Некоторые интегрины  $\beta 3$  экспрессируются в тромбоцитах и мегакариocyтах и играют важнейшую роль в процессах адгезии тромбоцитов и свертывания крови. Остальные  $\beta 3$ -интегрины экспрессируются в эндотелиальных клетках, фибробластах и клетках некоторых опухолей. Рецепторы, включающие субъединицы  $\beta 4$ – $\beta 8$ , немногочисленны и обладают крайне разнообразной структурой, поэтому они не относятся ни к одному из перечисленных классов [1, 2].

Активация интегрина на плазматической мембране со стороны цитоплазмы координирует сборку полимеров цитоскелета, сигнальных комплексов и может индуцировать экспрессию определенных генов. С внеклеточной стороны интегрины контактируют или с макромолекулами ВКМ и базальной мембраны (БМ), или с соответствующими рецепторами соседних клеток, создавая, таким образом, микроокружение клетки. Это взаимодействие управляет внутриклеточными процессами и во многом определяет структуру ткани (рис. 2) [3, 4].

Интегрины обеспечивают адгезию эпителиальных клеток к ВКМ, образуя гемидесмосомы и фокальные контакты.



**Рис. 3.** Интегриновые рецепторы во взаимодействии матрикс–клетка

Гемидесмосомы – структуры, имеющие форму «бляшек», или «кнопок», располагаются с внутренней стороны плазматической мембраны эпителиальных клеток. Они образованы молекулами интегрина  $\alpha 6 \beta 4$ , который посредством линкерных белков плакинов прикрепляется к кератиновым филаментам и прочно закрепляет эпидермис на базальной мембране, связываясь с ее компонентами (главным образом с ламинином 332) (рис. 3).

Фокальные контакты представляют собой более сложные структуры, которые образуются в результате группировки интегринов и через адаптерные белки (талины, винкулин,  $\alpha$ -актинин) связываются с актиновым цитоскелетом. Состав и морфология контактов весьма динамичны. Они могут содержать до сотни различных белков, выполняющих адаптерные, сигнальные и другие функции. Фокальные контакты играют роль своеобразных «узлов связи», регулируя поток сигнальных белков и управляя биохимическими сигналами и клеточными реакциями на внешние стимулы (рис. 3).

Интегриновые рецепторы несомненно играют ключевую роль в становлении и поддержании целостности гистотипической структуры тканей. Накопилось немало данных, свидетельствующих о роли интегринов в морфогенезе эпидермиса кожи и ее придатков,

прежде всего волосяного фолликула (ВФ). Наличие волосяного покрова является одной из характерных черт представителей класса млекопитающих. Волосяной покров выполняет различные функции, включая терморегуляционную, защитную, сенсорную и социальную. ВФ развивается и функционирует при тесном взаимодействии клеток эпидермиса и дермы. Эпидермальный компонент ВФ составляют матрикс волоса, наружное корневое влагалище, внутреннее корневое влагалище и стержень волоса. В состав дермального компонента входят дермальная папилла и соединительно-тканый чехлик. Самая внешняя оболочка ВФ – наружное корневое влагалище – переходит снаружи в базальный слой эпидермиса, а изнутри прилегает к внутреннему корневому влагалищу, которое, в свою очередь, окружает стержень волоса. Наружное корневое влагалище имеет утолщение, называемое зоной bulge (англ. bulge – утолщение в верхней трети ВФ), в котором локализуются стволовые клетки (СК). Основание ВФ, или луковица, состоит из специализированных кератиноцитов матрикса волоса и мезенхимных клеток дермальной папиллы. Стержень волоса состоит из терминально дифференцированных кератиноци-

тов (трихоцитов), он представляет собой производное ВФ. С ВФ ассоциированы также сальные железы, кровеносные сосуды, нервные окончания и мышца, поднимающая волос, которая прикрепляется к bulge (рис. 4). В постнатальный период жизни верхняя часть ВФ (включая bulge и сальную железу) и дермальная папилла сохраняются, а остальная часть ВФ подвергается циклическим изменениям, которые подразделяются на стадии роста (анаген), регрессии (катаген) и покоя (телоген). У мышей стадия анагена начинается с закладки ВФ на 14.5 сут эмбрионального развития и продолжается в течение 2 недель после рождения. Затем наступает стадия катагена, длина которой составляет 1 неделю, после чего ВФ вступает в стадию телогена, имеющую такую же продолжительность [5].

Продолжительность анагена ВФ скальпа человека варьирует от 2 до 7 лет, фаза телогена длится около 3 мес., после чего стержень волоса сбрасывается. Каждый ВФ на протяжении жизни в среднем продуцирует 20–30 стержней волос. В норме 95% ВФ скальпа пребывают в фазе анагена и 5% в фазе телогена [6].

В данном обзоре обсуждается роль интегринов, играющих ключевую роль в биологии кожи, а также интегрин-связанной киназы (ILK) как посредника передачи внутриклеточной сигнализации интегринов, функция которой до конца не известна.

### ИНТЕГРИНЫ ЭПИДЕРМИСА

В эпидермисе наиболее распространены интегрины  $\alpha 3 \beta 1$  (преимущественно рецептор ламинина 332),  $\alpha 6 \beta 4$  (компонент гемидесмосом, рецептор ламинина 332) и  $\alpha 2 \beta 1$  (рецептор коллагена и ламинина) [7]. Интегрин  $\alpha \nu \beta 5$  (рецептор витронектина) также является основным эпидермальным интегрином, но он экспрессируется слабее, чем другие интегрины [8]. Кроме того, базальные кератиноциты эпидермиса экспрессируют интегрины  $\alpha 5 \beta 1$  (рецептор фибронектина) и  $\alpha 9 \beta 1$  (рецептор тенасцина С) [9, 10]. Группа  $\beta 1$ -интегринов приурочена, в основном, к базальной поверхности кератиноцитов [7, 8, 11] и участвует в формировании фокальных контактов. Интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  обнаруживается как на базальной, так и на латеральной поверхности базальных кератиноцитов, где он может участвовать в межклеточных контактах [12]. В норме в эпидермисе экспрессия интегринов ограничена базальным слоем и наружным корневым влагалищем ВФ, за исключением интегрин  $\alpha \nu \beta 8$ , обнаруженного в супрабазальных слоях кожи век у мышей [13]. При заживлении ран и при таких патологических состояниях, как псориаз и опухолевая трансформация, интегрины экспрессируются супрабазальными кератиноцитами [14]. Эктопическая экспрессия интегринов  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  и  $\beta 1$  в супрабазальных

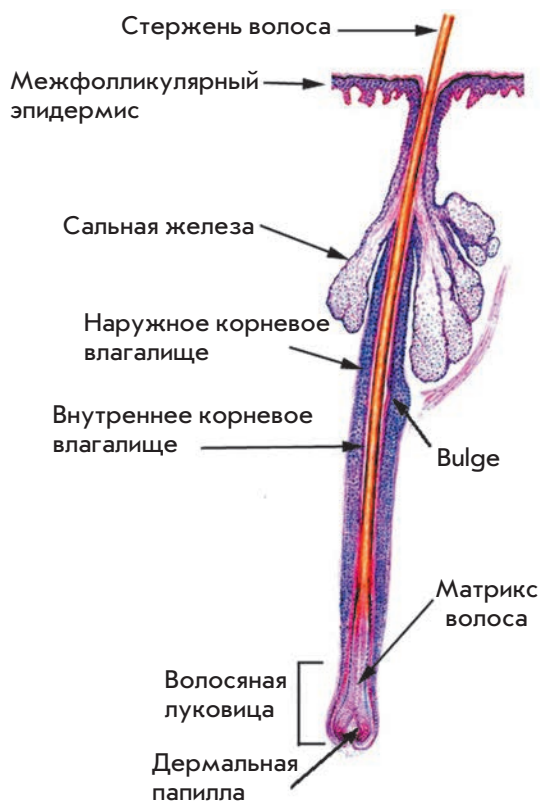


Рис. 4. Строение волосяного фолликула [36]

слоях кожи трансгенных мышей приводит к гиперпролиферации, нарушению дифференцировки и псориазоподобному фенотипу [15].

Создание мышей с тканеспецифическим нокаутом генов интегринов и определение генетических основ ряда кожных заболеваний у человека позволили понять роль интегринов в физиологии и морфогенезе эпидермиса. Предполагается, что интегрины участвуют не только в закреплении кератиноцитов на базальной мембране, но и в регуляции миграции, пролиферации и дифференцировки эпидермальных клеток [6, 14, 16, 17].

### ИНТЕГРИН $\alpha 6 \beta 4$

В первых экспериментах по выяснению роли интегринов в адгезии, миграции и инициации терминальной дифференцировки кератиноцитов использовали интегрин-специфичные антитела, нарушающие адгезию культивируемых кератиноцитов человека к различным компонентам ВКМ [6, 16]. Получение мышей с нокаутом генов индивидуальных интегринов или их субъединиц позволило установить их роль в адгезии кератиноцитов к БМ. Например, мыши с делецией субъединицы  $\alpha 6$  или  $\beta 4$  умирают вскоре после рождения, у них возникают многочисленные волдыри на коже (блистеринг) и стратифицированном плоском эпителии, обусловленные отсутствием гемидесмосом [18–20]. У человека мутации в генах субъединиц  $\alpha 6$  или  $\beta 4$  приводят к развитию буллезного эпидермолиза с атрезией желудка – аутосомного заболевания, при котором на коже возникают пузыри и наблюдается поражение желудочно-кишечного тракта, требующее оперативного вмешательства сразу после рождения [21].

Интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  связывается с ламинином 332 в составе ВКМ и с кератиновыми филаментами внутри клетки. Это позволяет координировать клеточный ответ в зависимости от состояния молекул ламинина, а следовательно, регулировать адгезию, миграцию и пролиферацию кератиноцитов. Возможно, это осуществляется через NF- $\kappa$ B или MAPK-зависимый путь, иницируемый активацией  $\beta 4$ -интегрина, а также через активацию малой GTP-азы Rac1. Кроме того, интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  необходим для поддержания целостности гемидесмосом. Показано, что фосфорилирование Ser1424 в эндодомене интегрина  $\beta 4$  приводит к дезинтеграции гемидесмосом на заднем крае мигрирующей клетки [22]. Интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  связывается с коллагеном типа XVII и плектином. С помощью этой связи, а также посредством сворачивания своего цитоплазматического домена интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  может вовлекаться в сборку гемидесмосом [12]. Недавно было показано, что инактивация экспрессии субъединицы  $\alpha 6$  вызывает значительное снижение

экспрессии субъединиц  $\alpha 3$  и  $\alpha 2$  на поверхности кератиноцитов человека. Интересно, что такие клетки теряют способность к быстрой направленной миграции по ламинину и коллагену типа I. Предполагается, что интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  может быть центральным регулятором экспрессии других основных интегринов эпидермиса [23]. В то же время в кератиноцитах, полученных от больных с мутацией в гене  $\beta 4$ , экспрессия субъединиц  $\alpha 3$  и  $\alpha 6$  остается на нормальном уровне [24].

Данные о роли интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  в миграции клеток противоречивы. Возможно, это связано с частичной взаимозаменяемостью двух рецепторов интегринов  $\alpha 3 \beta 1$  и  $\alpha 6 \beta 4$ , которые связываются с ламинином 332. Согласно устоявшимся представлениям интегрин  $\alpha 3 \beta 1$ , связываясь с ламинином 332, обеспечивает точную адгезию, подвижность и сборку ламинина, а интегрин  $\alpha 6 \beta 4$ , связываясь с ламинином 332, способствует стабильной адгезии клеток путем сборки гемидесмосом (рис. 3).

Однако, согласно некоторым данным, гаптотактическая миграция по ламинину 332 опосредуется совместным действием обоих интегриновых рецепторов, причем интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  оказывает трансдоминирующий ингибиторный эффект на  $\alpha 3 \beta 1$ , т.е. при связывании рецептора  $\alpha 6 \beta 4$  функция  $\alpha 3 \beta 1$  может супрессироваться. Однако применение антител к  $\alpha 6 \beta 4$  не влияло на хемотаксис [25]. В дальнейшем предположили, что ингибирование связи  $\alpha 6 \beta 4$  с лигандом ведет к активации дополнительного хемотаксического пути, который зависит от интегрин  $\alpha 3 \beta 1$ , но при этом клетки мигрируют по отдельности [26]. Клетки без интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  не реагируют на добавление фактора роста эпидермиса (EGF) либо из-за отсутствия взаимодействия рецептора EGF (EGFR) с  $\beta 4$ , либо вследствие супрессии активности интегрин  $\alpha 3 \beta 1$ . При экспрессии и связывании интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  наблюдалась устойчивая активация Rac1 при воздействии EGF, что приводило к супрессии и перераспределению интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  из базальных фокальных контактов в область межклеточных соединений. Это способствовало миграции кератиноцитов в виде единого пласта. Предполагается, что интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  координирует хемотаксис при заживлении ран. В местах ранения изменяется кинетика связывания интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  с белками ВКМ или интенсивность синтеза его компонентов. При движении клеток интегрин  $\alpha 6 \beta 4$  связывается с секретлируемым ламинином 332. Это усиливает активность Rac1 и приводит к супрессии хемотаксиса, зависящего от  $\alpha 3 \beta 1$ , что, возможно, необходимо для поддержания связи между лидирующими клетками и пластом эпителиальных клеток в целом [26].



## ИНТЕГРИНЫ $\beta 1$

Помимо интегрин  $\alpha 6\beta 4$ , связь с базальной мембраной в коже обеспечивают интегрины, в состав которых входит субъединица  $\beta 1$ .

В отличие от нокаута генов субъединиц  $\alpha 6$  или  $\beta 4$ , полный нокаут генов интегринов  $\beta 1$  приводит к ранней внутриутробной гибели, что делает невозможным определение его роли в коже [27, 28].

В попытке оценить роль интегринов  $\beta 1$  в биологии эпидермиса были получены кератиноциты из  $\beta 1$ -null-ЭСК мыши. Линия  $\beta 1$ -null-ЭСК получена с помощью трансфекции вектора, инактивирующего ген интегрин  $\beta 1$  [29].  $\beta 1$ -null-ЭСК *in vitro* экспрессировали простые кератины, но при индукции не способны были дифференцироваться в кератиноциты и экспрессировать специфичные для эпидермиса кератины 14 и 10, а также инволюкрин.

Интересно, что в тератомах, формирующихся после подкожной трансплантации  $\beta 1$ -null-ЭСК сингенным мышам, наблюдали экспрессию интегрин  $\alpha 6\beta 4$ , кератинов 14 и 1 и инволюкрин, что свидетельствовало о дифференцировке клеток в кератиноциты.

$\beta 1$ -null-кератиноциты обнаруживались также в эпидермисе химерных мышей (дикий тип/ $\beta 1$ -null), у которых формировалась нормальная кожа. Сборка белков ВКМ была значительно нарушена (волокон белков БМ было меньше, они были тоньше и короче) в культурах  $\beta 1$ -null-ЭСК, но оставалась нормальной в тератомах и коже химерных мышей [30]. Поскольку в образование БМ вносят вклад и кератиноциты, и дермальные фибробласты [31], предположили, что неспособность  $\beta 1$ -null-ЭСК *in vitro* дифференцироваться в кератиноциты может быть не столько следствием отсутствия субъединиц  $\beta 1$ , сколько неспособностью к сборке белков БМ. Наблюдаемая *in vivo* дифференцировка в кератиноциты могла происходить за счет сборки БМ клетками дикого типа из окружающей ткани [30].

Однако впоследствии экспериментально показали, что существует по крайней мере еще одно возможное объяснение наблюдаемых явлений. Так, ни контакт с БМ, ни присутствие нормальных эпидермальных кератиноцитов не восстанавливают способность  $\beta 1$ -null-ЭСК дифференцироваться в кератиноциты [32]. В исследовании, выполненном с применением деэпителизированной «мертвой» дермы с сохранившейся БМ,  $\beta 1$ -null-ЭСК не обладали способностью дифференцироваться в кератиноциты. Сокультивирование с нормальными эпидермальными кератиноцитами также было неэффективным. Однако заселение дермы нормальными дермальными фибробластами приводило к образованию большого количества эпидермальных цист из ЭСК дикого типа и небольших групп клеток, положительных по кератину 14, дифферен-

цированных из  $\beta 1$ -null-ЭСК. Кондиционированная фибробластами среда стимулировала дифференцировку кератин 14-положительных клеток в эмбрионидных тельцах дикого типа и  $\beta 1$ -null. Показано, что фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор роста фибробластов 10 (FGF10), выделяемые фибробластами, и трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) стимулируют дифференцировку ЭСК в эпидермальном направлении. При этом эффект факторов роста был более выраженным в культуре клеток с нокаутом  $\beta 1$  [32]. По-видимому, это можно объяснить тем, что концентрации факторов роста в ростовой среде не были лимитирующими для ЭСК дикого типа. Отсутствие интегринов  $\beta 1$  снижает, предположительно, чувствительность ЭСК к растворимым факторам, индуцирующим дифференцировку кератиноцитов. Поэтому для стимуляции дифференцировки  $\beta 1$ -null-ЭСК необходимы высокие концентрации индукторов. Эти результаты подтверждают известный синергизм между интегринными и факторами роста и указывают на его присутствие на самых ранних этапах развития, в том числе в ходе развития кожи. Следует также указать, что ЭСК мышей с нокаутом гена интегрин  $\beta 1$  не могли расти в присутствии фидерных клеток, тогда как для ЭСК дикого типа необходим фидер из непролиферирующих фибробластов. В связи с этим возникает вопрос о роли фидерных клеток в обеспечении способности ЭСК дифференцироваться в кератиноциты.

Разработка технологии получения мышей с тканеспецифическим нокаутом генов позволила избежать трудностей с изучением мутаций, приводящих к внутриутробной гибели эмбрионов. Чтобы изучить последствия эпидермис-специфичной делеции интегринов  $\beta 1$ , мышей с фланкированными LoxP-сайтами аллелями гена субъединицы  $\beta 1$  скрещивали с мышами, экспрессирующими Cre-рекомбиназу под контролем промоторов генов кератин 14 или 5, которые активируются в базальном слое эмбрионального эпидермиса [33, 34]. У потомства этих мышей наблюдали эпидермальный блистеринг, но менее выраженный, чем при нокауте субъединиц  $\alpha 6$  или  $\beta 4$ .

В тонкой и хрупкой коже мышей с эпидермис-специфическим нокаутом субъединиц  $\beta 1$  (Cre-рекомбиназа под контролем промотора кератин 14) отмечено почти полное отсутствие БМ, нестабильность гемидесмосом, резкое снижение пролиферативного потенциала эпидермиса, неспособность развивающихся ВФ инвагинировать в дерму. Мышата обычно умирали через несколько часов после рождения, вероятно, из-за отсутствия эпидермального барьера и дегидратации. Тем не менее программа терминальной дифференцировки кератиноцитов у животных не изменялась [33], что противоречило выводам, сделанным

в работах с использованием трансфекции мутантных субъединиц  $\beta 1$  в культуре и исследований суспензионных культур кератиноцитов [35, 37]. Полученные результаты указывают на решающую роль интегринов, содержащих субъединицу  $\beta 1$ , в поддержании пролиферативного потенциала развивающегося эпидермиса [33]. Интересной представляется неспособность развивающихся ВФ инвагинировать в дерму. Молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса инвагинации растущего ВФ и ремоделирования им ВКМ, изучены недостаточно. Очевидно, что не последнюю роль в нем играют интегрины, в частности, содержащие субъединицу  $\beta 1$ .

Получены мыши с нокаутом генов субъединиц  $\beta 1$  в коже эмбрионов (ген Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 5). Эти мыши оставались жизнеспособными в течение 4–6 недель [34], и к этому времени полностью утрачивали ВФ. У мутантных мышей развивались аномалии ВФ и прогрессирующая потеря волос из-за снижения пролиферации клеток матрикса волоса. В итоге деформированные ВФ замещались инфильтратом макрофагов, эпидермис кожи спины утолщался, базальный слой эпидермиса был дезорганизованным, клетки имели аномальную морфологию, наблюдались нарушения в формировании БМ, снижалось количество гемидесмосом, развивался блистеринг. В отличие от предыдущего исследования, наблюдалось увеличение числа слоев дифференцированных кератиноцитов в эпидермисе. Целостность БМ, окружающей ВФ, не нарушалась, возможно, из-за меньшего механического напряжения, чем в межфолликулярном эпидермисе или меньшей зависимости структуры БМ вокруг ВФ от интегринов  $\beta 1$ . В конечном итоге развивался дермальный фиброз [34]. Наблюдалось также снижение пролиферативного потенциала кератиноцитов, но, как справедливо замечают, это может быть вызвано не непосредственным отсутствием субъединицы  $\beta 1$ , а, например, сопутствующим снижением экспрессии интегрин  $\alpha 6\beta 4$ .

Полученные в обоих исследованиях результаты изучения последствий делеции интегринов  $\beta 1$  в эмбриональном эпидермисе указывают на важную роль интегринов  $\beta 1$  в формировании ВФ, организации БМ, пролиферации и дифференцировке кератиноцитов. Известно, что при удалении интегринов  $\beta 1$  ВФ дегенерируют и не способны к циклическим изменениям, поэтому предполагается, что интегрины  $\beta 1$  участвуют в поддержании компартмента СК или активации СК при инициации стадии анагена [34]. Однако результаты эпидермис-специфического нокаута генов интегринов  $\beta 1$  различались в зависимости от того, какой тканеспецифический ген (K5 или K14) использовали для активации Cre-рекомбиназы.

Некоторые мыши с тканеспецифическим нокаутом интегринов  $\beta 1$  в эпидермисе жили достаточно долго. Это позволяло провести эксперименты по заживлению ран, которые подтвердили, что  $\beta 1$  необходим для миграции кератиноцитов [38].

Индуктируемая в эмбриогенезе эпидермис-специфическая делеция гена интегрин  $\beta 1$  [33, 34] не позволяла полностью оценить ее влияние на программы пролиферации, дифференцировки, развития и поддержания ВФ из-за развивающегося фиброза, воспалительного процесса или смерти животных. Чтобы отличить первичные последствия нокаута субъединицы  $\beta 1$  от вторичных, сравнили последствия нокаута гена интегрин  $\beta 1$  в эпидермисе на 14.5 сут эмбриогенеза мыши (с помощью Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 5 – K5Cre $\beta 1$ null) и индуцированной делеции во взрослом эпидермисе (с помощью 4-гидрокситамоксифена и CreER-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 14 – K14CreER) [39]. В первом случае (K5Cre $\beta 1$ null) наблюдали увеличение количества слоев дифференцированных клеток, дегенерацию ВФ, сальных желез, снижение пролиферации, отделение эпидермиса от подлежащей дермы. У этих животных обнаружили аномальное накопление коллагена типа IV и ламинина 332 в дерме. Удаление субъединицы  $\beta 1$  интегрин в эмбриональном эпидермисе (K5Cre $\beta 1$ null) вызывало нарушение терминальной дифференцировки, приводило к увеличению слоев клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для дифференцированных кератиноцитов (кератин 10, корнифин, лорикрин и трансклутаминаза 1). Это противоречит данным, которые свидетельствуют в пользу сохранения программы дифференцировки эпидермальных клеток у мышей с тканеспецифическим нокаутом интегрин  $\beta 1$  [33]. Сохранившиеся ВФ все еще экспрессировали маркеры СК на высоком уровне. Во втором случае нокаут  $\beta 1$  в эпидермисе взрослых животных (K14CreER) привел к незначительным изменениям в эпидермисе. Основной аномалией было увеличение количества меланоцитов. Также наблюдалось нарушение дифференцировки межфолликулярного эпидермиса, уменьшение размеров сальных желез. ВФ сохранялись, но наружные корневые влагалища ВФ были увеличены, луковицы некоторых ВФ были тонкими и продолговатыми, в некоторых областях межфолликулярного эпидермиса обнаружено значительное количество пролиферирующих клеток. На 30-й день после обработки гидрокситамоксифеном сохранялась высокая экспрессия маркеров СК в зоне bulge.

Фенотипические изменения, наблюдаемые при удалении интегринов  $\beta 1$  в зрелом эпидермисе, были гораздо менее выраженными, чем при делеции

во время внутриутробного развития. В обоих случаях отсутствовали очевидные изменения в компартменте СК ВФ [39].

Поскольку описанные модели животных с различными дефектами экспрессии субъединиц  $\beta 1$  не учитывали вклад конкретных  $\alpha$ -субъединиц интегрина в регуляцию, изучили, как влияет отсутствие интегрин  $\alpha 3\beta 1$  на зрелую кожу и развитие ВФ [40].

Интегрин  $\alpha 3\beta 1$  обильно экспрессируется в коже, *in vivo* он локализован между гемидесмосомами и связывает БМ с актиновым цитоскелетом. Инактивация  $\alpha 3$ -субъединицы интегрин приводит к смерти мышат вскоре после рождения, у животных наблюдались дефекты развития почек и легких [41]. У новорожденных  $\alpha 3$ -null-мышей на подушечках стоп появлялись пузыри, при этом структура гемидесмосом оставалась нормальной. Анализ экспрессии ламинина 332 выявил области дезорганизации зоны БМ. Программа дифференцировки и стратификации эпидермиса не изменялась [42]. Позднее установили, что ни интегрин  $\alpha 3\beta 1$ , ни  $\alpha 6\beta 4$  не существенны для морфогенеза и гомеостаза эпидермиса в ходе развития кожи, если эпидермис остается прикрепленным к дерме. Мышиные эмбрионы, у которых отсутствовали данные интегрин, имели нормальную программу пролиферации и частоту апоптоза в местах сохранения целостности БМ до момента образования пузырей [43]. Важным был контакт между эпидермисом и дермой, который непродолжительное время обеспечивался неизвестным компенсаторным механизмом. По мере развития блистеринга в ходе эмбриогенеза интенсивность апоптоза возрастала. К сожалению, морфогенез ВФ при удалении интегрин  $\alpha 3\beta 1$  или  $\alpha 6\beta 4$  не обсуждается [43].

Для дальнейшего изучения последствий удаления интегрин  $\alpha 3\beta 1$  кожу новорожденных животных с нокаутом этого интегрин пересадили бестимусным мышам. В зрелых трансплантатах наблюдались нарушение организации БМ в межфолликулярном эпидермисе и возникновение серьезных аномалий морфологии ВФ после первого цикла развития: задержка роста ВФ, дезорганизация F-актина в ВФ, фрагментация ВФ, отклонения в накоплении пигмента и образование кластеров ВФ. Пристальное изучение этих трансплантатов позволило сделать вывод о том, что интегрин  $\alpha 3\beta 1$  не является обязательным для дифференцировки зрелого межфолликулярного эпидермиса, но необходим для регуляции различных процессов морфогенеза и поддержания ВФ. При деляции интегрин  $\alpha 3\beta 1$  зрелая кожа может полностью развиваться и формировать ВФ и сальные железы, поэтому, по всей видимости, интегрин  $\alpha 3\beta 1$  не является необходимым для поддержания эпидермальных СК. Однако после первого цикла в ВФ возникают

значительные нарушения, снижается пролиферация и апоптоз, что свидетельствует о продолжительном пребывании ВФ в фазе покоя, а образующиеся кластеры могут отражать безуспешные попытки ВФ вступить в следующую фазу роста. Эти данные показывают, что интегрин  $\alpha 3\beta 1$  играет важную роль в специфической регуляции морфологии ВФ в течение фазы катагена цикла ВФ [40].

Учитывая данные о роли интегрин  $\beta 1$  в формировании и поддержании ВФ, пролиферации и дифференцировке кератиноцитов, структуризации БМ, а также о возможном участии в поддержании или активации популяции СК, можно предполагать, что у мышей в результате активации интегринных рецепторов  $\beta 1$ , как минимум, меняется экспрессия ключевых генов, вовлеченных в развитие и формирование ВФ. Фенотипические проявления, наблюдаемые при инактивации этих генов, сходны с фенотипом, обусловленным нокаутом генов интегрин  $\beta 1$ .

Обнаружено, что некоторые факторы транскрипции, такие, как *hairless*, комплекс  $\beta$ -катенин-LEF-1-TCF-1 или *Sonic hedgehog*, вовлечены в пролиферацию кератиноцитов матрикса волоса и зачатков ВФ [44, 45]. Фенотип мутаций, ведущих к инактивации этих белков, частично перекрывается с фенотипом  $\beta 1$ -null-ВФ. У мышей с мутацией *hairless* приблизительно на 15-й день после рождения происходит преждевременный апоптоз кератиноцитов матрикса волосяной луковицы наряду с увеличением скорости пролиферации, наблюдается неправильное расположение внутреннего корневого влагалища и атрофия наружного корневого влагалища. Наружное корневое влагалище и волосяная луковица распадаются на отдельные кластеры клеток [44]. У мышей с инактивацией гена *LEF-1* отсутствуют вибриссы и ВФ, как и у мышей с эпидермис-специфичным нокаутом гена интегрин  $\beta 1$  [46]. Трансплантаты кожи мышей *Shh*<sup>-/-</sup>, пересаженные животным с иммунодефицитом, не могут правильно дифференцироваться и формируют гиперпролиферативные фолликулоподобные структуры, которые не способны продуцировать зрелые стержни волос [47, 48]. Интересно понять, могут ли кератиноцит-специфичные мутации, приводящие к усиленной активности этих белков, восстанавливать фенотип  $\beta 1$ -null-ВФ, по крайней мере частично.

#### ИНТЕГРИН-СВЯЗАННАЯ КИНАЗА

Связывание с лигандом индуцирует кластеризацию интегрин, в результате которой формируются комплексы, состоящие из множества молекул. Аффинность интегрин и лигандов регулируется внутриклеточными сигналами, что приводит к активации интегрин. Ключевыми регуляторами активации являются талины и киндлины, которые свя-



зывают цитоплазматические домены интегринов  $\beta 1$  и  $\beta 2$  [49]. Внутриклеточный путь передачи сигнала от интегринов после их связывания с белками ВКМ остается изученным не до конца. Интегрины не обладают ферментативной активностью, у них отсутствуют сайты связывания с актином. Предполагается, что сигналы передаются через множество киназ и белков-посредников.

Наиболее вероятно, что связывание интегринов с актиновым цитоскелетом опосредуется талином,  $\alpha$ -актинином и винкулином. Талин необходим для передачи усилия на субстрат, формирования адгезионных контактов, связывания интегринов с цитоскелетом и последующего распластывания клеток [50]. Талин может связывать интегрины с актином разными способами: прямо и через винкулин, который, в свою очередь, связывается с  $\alpha$ -актинином и актином. Удаление  $\alpha$ -актина также ингибирует формирование адгезионных контактов, но его роль в передаче силы на субстрат не изучена [51]. Нокаут гена винкулина, в отличие от генов талина и  $\alpha$ -актина, не имеет драматических последствий. По-видимому, винкулин важен для прочности контактов, но не критичен для их формирования [52].

Контакты, опосредованные интегринными, очень сложные структуры, в которых могут участвовать более 150 различных молекул [53, 54]. В состав этих комплексов входят интегральные мембранные белки (интегрины, синдеканы); белки, связывающиеся с актином (талины, винкулин,  $\alpha$ -актинин); сигнальные и адаптерные белки (тирозинкиназа Src, киназа фокальной адгезии FAK, паксиллин и ILK) [55–60]. Фокальные контакты также содержат активную p21-киназу (PAK), GTP-азы семейства Rho, регулирующие полимеризацию актина, сокращение миозина 2, динамику и организацию микротрубочек [61], кальций-зависимую протеазу кальпаин 2 [62] и тирозинфосфатазу SHP-2 [63], которые, вероятно, временно связываются с адаптерными белками и регулируют миграцию.

Протеинкиназа ILK, еще один компонент фокальных контактов [59], первоначально была определена как белок, связывающий интегрины  $\beta 1$  [64]. ILK необходима для выживания, миграции и адгезии клеток. Опосредуя взаимодействие с разнообразными белками, включая интегрины  $\beta 1$  и  $\beta 3$ , PINCH, паксиллин и парвин, она служит посредником между интегринными и актиновым цитоскелетом [59, 65].

Киназная активность ILK и фосфорилирование некоторых белков, включая протеинкиназу B (PKB/Akt) и киназу  $\beta 3$  гликогенсинтазы (GSK  $\beta 3$ ), описаны в некоторых работах [71, 73].

GSK  $\beta 3$  обнаружена в зоне bulge органов культивированных зрелых ВФ человека, где она локализовалась

с маркерами bulge – цитокератинами 15, 19 и CD200. Ингибирование активности гликогенсинтазы в этой области способствовало увеличению пролиферации клеток наружного корневого влагалища, что предполагает возможное участие GSK  $\beta 3$  в поддержании компартмента СК ВФ [66]. Развитие и циклические изменения в постнатальном организме ВФ существенно зависят от инактивации GSK  $\beta 3$  [67, 68]. Активная нефосфорилированная GSK  $\beta 3$  может фосфорилировать и связывать  $\beta$ -катенин с белком APC, что приводит к деградации  $\beta$ -катенина. Фосфорилирование GSK  $\beta 3$  инактивирует киназу и приводит к стабилизации и транслокации  $\beta$ -катенина в ядро, где он взаимодействует с ДНК-связывающими белками семейства Lef1/Tcf, которые активируют транскрипцию таких генов-мишеней, как гены циклина D, гомеобоксодержащих факторов транскрипции, *c-myc*, *Lef1* и кератинов волос [69, 70]. ILK, фосфорилируя GSK  $\beta 3$  [71, 72] или ингибируя комплекс деградации  $\beta$ -катенина [73], может модулировать стабильность  $\beta$ -катенина и, следовательно, играть важную роль в морфогенезе ВФ.

Тем не менее функции ILK окончательно не установлены, так как результаты, полученные как *in vitro*, так и *in vivo*, указывают скорее на адапторную, чем на киназную активность ILK [74–80]. Предполагается, что ILK содержит псевдокиназный сайт, неспособный к фосфорилированию [81]. Так, степень фосфорилирования GSK  $\beta 3$  и PKB/Akt в фибробластах, в которых отсутствовала ILK, была такой же, как в контроле. По-видимому, ILK не участвует в фосфорилировании этих киназ [74].

В пользу этой гипотезы свидетельствуют и другие данные, согласно которым ILK не регулирует фосфорилирование GSK  $\beta 3$ , стабильность и активность  $\beta$ -катенина в ВФ, дифференцировку клеток матрикса во внутреннее корневое влагалище и стержень волоса. Кератиноцит-специфический нокаут гена *ILK* (*K5-Cre*) у мышей (ген *Cre*-рекомбиназы под промотором гена кератина 5) приводил к нарушению адгезии кератиноцитов, целостности БМ, блистерингу, эктопической пролиферации кератиноцитов в супрабазальных слоях, аномальной дифференцировке кератиноцитов, гиперплазии эпидермиса, дефектам в формировании ВФ и алопеции. Нарушение формирования ВФ связано со скоплением пролиферирующих клеток в наружном корневом влагалище; дифференцировка клеток матрикса ВФ и поддержание СК при этом не изменялись. Мыши с нокаутом гена *ILK* жили длительное время [80].

В отличие от нокаута генов  $\beta 1$ -интегринов, при котором снижается пролиферация эпидермальных кератиноцитов и клеток матрикса ВФ [33, 34], при нокауте *ILK* (*K5-Cre*) число пролиферирующих клеток



матрикса ВФ уменьшалось незначительно. Напротив, существенное увеличение числа пролиферирующих клеток зарегистрировано в наружном корневом влагалитце. Поскольку клетки наружного корневого влагалитца происходят из CD34<sup>+</sup>-популяции стволовых клеток bulge [82], проверили, влияет ли отсутствие ILK на эту популяцию клеток. Оказалось, что ВФ содержат CD34<sup>+</sup>-клетки, которые дают начало транзиторным клеткам. Так как пролиферирующие клетки накапливались в наружном корневом влагалитце, а не в матриксе волоса, был сделан вывод, что ILK необходима транзиторным клеткам для миграции в матрикс или образования зачатка волоса во время анагена.

Интересно, что в культуре кератиноцитов отсутствие ILK влияло на формирование фокальных контактов и препятствовало устойчивой направленной миграции. Клетки также проявляли слабую адгезию, опосредованную интегринами, поэтому не могли фиксировать ламеллоподии, что приводило к изменениям миграции [80].

Изучали также последствия удаления ILK, индуцированного экспрессией кДНК Cre-рекомбиназы под промотором гена кератина 14 (K14-Cre). В отличие от тканеспецифического нокаута с использованием K5-Cre [80], в данном варианте инактивации гена *ILK* мыши в среднем доживали до 4-го дня постнатального развития. Следует отметить, что и при нокауте гена интегрин  $\beta 1$ , когда экспрессия Cre-рекомбиназы контролировалась промотором гена кератина 14, животные умирали вскоре после рождения, а при использовании промотора гена кератина 5 доживали до 6 недель [33, 34]. Эти отличия можно объяснить, если учесть, что кератин 14 начинает экспрессироваться на 11.5 сут эмбрионального развития [83], а кератин 5 – примерно на 15-е [80], когда эпидермис уже стратифицирован и начался морфогенез ВФ. Подобные фенотипические отличия могут отражать проявление активности генов кератинов или различий в интенсивности и/или времени экспрессии Cre-трансгена и инактивации гена *ILK* во время эмбриогенеза.

Итак, при удалении ILK с использованием системы K14-Cre морфогенез ВФ был ослаблен. Так как пролиферация ВФ снижалась, сокращалось их число, и морфогенез до конца не завершался. Отсутствие ILK вызывало аномалии в гемидесмосомах и множественный микроблистеринг, дезорганизацию кератиноцитов супрабазальных слоев и актинового цитоскелета, нарушения адгезии, поляризации и миграции.

ILK считается мишенью  $\beta 1$ -интегринов. Отсутствие ILK и  $\beta 1$ -интегринов в коже приводит к возникновению ряда сходных нарушений, включая аномальное формирование и функционирование ВФ,

снижение пролиферативной активности фолликулярных кератиноцитов, развитие блистеринга.

Кератиноциты, в которых отсутствовала ILK, в культуре имели дефекты адгезии и пролиферации. Снижение скорости пролиферации напоминало нарушения, наблюдаемые в ВФ, но не в межфолликулярном эпидермисе. Известно, что нормальная пролиферация первичных кератиноцитов в культуре зависит от активации  $\alpha 3 \beta 1$ -интегринов [84]. Учитывая, что первичные культивируемые кератиноциты состоят из транзиторных и коммитированных прогениторных клеток, снижение пролиферации лишенных ILK кератиноцитов может быть следствием нарушения внутриклеточной сигнализации  $\beta 1$ -интегринов в этой популяции клеток. Не исключено также нарушение пролиферации СК, но эту гипотезу предстоит еще проверить.

При инактивации гена *ILK* наблюдали нарушение не только адгезии и пролиферации, но также поляризации и миграции культивируемых кератиноцитов мыши [85]. Ключевым событием поляризации является активация Rac1 в лидирующем крае клетки, вызывающая образование и стабилизацию ламеллоподий с помощью интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  [86]. Инфицирование аденовирусом, несущим конститутивно активный *Rac1*, приводит к восстановлению дефектов поляризации в кератиноцитах с дефицитом ILK. Таким образом, ILK является важнейшим компонентом сигнального пути, который связывает стимуляцию интегринов с рекрутированием Rac1 к плазматической мембране, с активацией распластывания и направленной миграции кератиноцитов [85]. Стабилизация ламеллоподий также может нарушаться, если нормальные клетки трансфицировать мутантным геном *Rac1*. При этом одного Rac1 недостаточно для стабилизации ламеллоподий, поскольку в кератиноцитах с дефицитом интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  конститутивная экспрессия *Rac1* не восстанавливала характер миграции [86].

Последствия инактивации ILK в СК ВФ изучали с помощью тканеспецифического нокаута с использованием системы K15-Cre, специфичной для СК ВФ [87].

При индуцируемой инактивации ILK в СК ВФ волосяные фолликулы были способны вступать в анаген. Стволовые клетки bulge, в которых отсутствовала ILK, успешно мигрировали из bulge и дифференцировались в клетки наружного корневого влагалитца и матрикса ВФ, вступивших в фазу роста. Следовательно, отсутствие ILK в СК ВФ не влияет на их миграцию, способность производить популяцию транзиторных клеток и обеспечивать регенерацию ВФ. В то же время поведение в культуре кератиноцитов, выделенных из bulge опытных мышей (K15-Cre), отличалось от поведения контрольных. Эффективность

адгезии к покрытому ВКМ пластику была низкой. Эти результаты совпали с данными, полученными на кератиноцитах, выделенных из эпидермиса новорожденных мышей, в которых ILK удалена с помощью K14-Cre [85]. Отсутствие ILK в СК ВФ в основном выражалось в снижении способности клеток bulge дифференцироваться в клетки межфолликулярного эпидермиса при заживлении ран. Закрывание ран на спине опытных животных происходило позже, чем в контроле. Те немногочисленные кератиноциты bulge, которые участвовали в регенерации эпидермиса, обладали невысоким пролиферативным потенциалом. Следовательно, ILK необходима для миграции потомства стволовых клеток bulge в регенерирующий эпидермис и пролиферации клеток в ходе эпителизации раневой поверхности. Учитывая дефекты адгезии и миграции кератиноцитов новорожденных мышей с эпидермис-специфической делецией *ILK* [80, 85], а также данные по инактивации ILK в СК bulge [87], можно предположить, что ILK опосредует взаимодействие клеток с ВКМ и вносит вклад в закрепление кератиноцитов на базальной мембране.

Молекулярные пути, модулируемые ILK, изучены недостаточно. Заполнить пробелы в понимании роли ILK в эпидермисе попытались, определяя экспрессию генов методом микроэррей-анализа [88]. С этой целью сравнили экспрессию генов в нормальном эпидермисе мыши на 3-й день после рождения и в эпидермисе с инактивированным геном *ILK*, применив тканеспецифический нокаут (K14-Cre). Выявлено снижение экспрессии 27% транскриптов, которые кодируют специфичные для волоса кератин и белки, ассоциированные с ними, например кератин 31, кератин-связанный белок 3-3 и другие, что согласуется с нарушениями, наблюдаемыми в ВФ. Также уровни экспрессии десмоглеина 4, важного для структурной целостности десмосом кутикулы и кортекса ВФ, и трихогиалина, компонента внутреннего корневого влагалища, были соответственно в 18 и 28 раз меньше нормы. Значительное снижение экспрессии этих генов согласуется с представлениями о важности экспрессии ILK после стадий 4–5 формирования фолликула.

ILK также играет важную положительную модулирующую роль в дифференцировке кератиноцитов и формировании эпидермального барьера. Этим объясняется наблюдаемое у мышей с инактивацией ILK в эпидермисе снижение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты и факторы, необходимые для сшивки белков и биосинтеза липидов, таких, как транслугтаминаза 3, субстрат транслугтаминаз Prr9 и др.

В отсутствие ILK в эпидермисе возрастает экспрессия генов, вовлеченных в сигнальные пути Wnt

и Shh, которые при нормальном морфогенезе кожи активны на ранних стадиях развития ВФ, в то время как на поздних стадиях их активность снижается. Остановка развития ВФ на стадиях 2–4 в постнатальном эпидермисе в отсутствие ILK может свидетельствовать о повышении экспрессии генов сигнальных путей Wnt и Shh.

Анализ транскриптома постнатального эпидермиса с нокаутом гена *ILK* выявляет важную роль данной киназы в развитии ВФ, созревании кератиноцитов и формировании барьерной функции, а также в пигментации и регенеративных процессах [88].

### ИНТЕГРИНЫ $\beta 1$ КАК МАРКЕРЫ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Поведение стволовых клеток контролируется взаимодействием между внутренними транскрипционными программами и внешними сигналами [89]. Внешние сигналы обеспечиваются локальным микроокружением или нишей, в которой находятся стволовые клетки. ВКМ является важным компонентом ниши стволовых клеток [90–93].

В области bulge, где располагаются стволовые клетки ВФ, состав внеклеточного матрикса значительно отличается от состава в остальных участках эпидермиса [94, 95]. В этой области в несколько раз повышена экспрессия коллагенов типов VI, XVIII, V, тенасцина С, периостина, богатого цистеином гликопротеина, нефронектина и некоторых других компонентов ВКМ. Функциональное значение этих различий остается малоизученным. Несомненным представляется непосредственное участие ВКМ и интегриновых рецепторов в регуляции судьбы эпидермальных СК. Интересно, что структура ВКМ в центральной части роговицы, содержащей дифференцирующиеся клетки, и в лимбе, содержащем СК роговицы, также существенно различаются. Область лимба обогащена коллагенами VII, XVI и IV, тенасцином С, витронектином и ламинином [96]. Соответственно различается и спектр интегринов, экспрессируемых в этих областях роговицы. Медленно пролиферирующие, сохраняющие метку ДНК, клетки лимба характеризуются повышенной экспрессией интегринов  $\beta 1$  и  $\beta 4$ , а также  $\alpha 6$ . Мелкие клоногенные клетки из корнеосклерального кольца выделены на основании фенотипа  $\alpha 6^{\text{bright}}/\text{CD}71^{\text{dim}}$  [97], использованного также для выделения популяции эпидермальных СК [98].

В настоящее время показано, что интегрины могут использоваться для обогащения СК популяций, получаемых из различных тканей [99–102].

В культуре кератиноцитов человека популяции СК и транзиторно-амплифицируемых клеток разделили по степени экспрессии  $\beta 1$ -интегринов и скоро-

сти адгезии к белкам ВКМ. Популяция СК с высоким уровнем экспрессии  $\beta 1$ -интегринов обладала высокой колониеобразующей эффективностью и адгезировала к белкам ВКМ намного быстрее транзитного компартмента, клетки которого после одного или пяти циклов деления подвергались терминальной дифференцировке [103]. Подвижность клеток зависит от уровня экспрессии интегринов, причем при высоком уровне подвижность ингибируется, а наиболее благоприятен для подвижности клеток промежуточный уровень [104]. Таким образом, транзитные клетки, слабо экспрессирующие  $\beta 1$ -интегрины, должны быть значительно более подвижными, чем сильно экспрессирующие СК, что подтверждено с помощью цейтраферной съемки. Более того, при высокой плотности культуры транзитные клетки были рассредоточены, в отличие от компактно расположенных СК [11].

Высокий уровень экспрессии интегринов  $\beta 1$  (яркое свечение после окраски антителами) использовали в качестве маркера для определения пространственной организации СК и их потомков в эпидермисе человека [11]. Кератиноциты с низкой экспрессией интегринов этого класса выходили из компартмента СК, начинали интенсивно пролиферировать и подвергались дифференцировке.

В эпидермисе мыши интегрины  $\beta 1$  интенсивно экспрессируются в зоне bulge ВФ и активно используются в качестве маркеров этой зоны [68]. Однако использовать экспрессию  $\beta 1$ -интегринов в качестве маркеров клеток bulge ВФ человека не представляется возможным, поскольку они экспрессируются на всем протяжении внешнего слоя наружного корневого влагалища, соединительно-тканного чехлика и в дермальной папилле [105].

Сходные результаты получены при оценке экспрессии интегринов  $\beta 1$  в органных культурах ВФ кожи головы человека. В сайтах иммунореактивности интегринов  $\beta 1$  наблюдалась также коэкспрессия фибронектина и тенасцина С. Исследователи не обнаружили значительного повышения иммунореактивности  $\beta 1$ -интегринов *in situ* в зоне bulge. Применение активирующих интегрины  $\beta 1$  антител и имитирующих натуральные лиганды, трипептидов RGD (арг-гли-асп) *in vitro* способствовало росту органных культур ВФ, выделенных с помощью микродиссекции, и препятствовало их спонтанной регрессии. Таким образом, несмотря на отсутствие повышенной экспрессии интегринов  $\beta 1$  в СК ВФ человека, сигнальные пути с их участием играют, по-видимому, определенную роль в контроле роста фолликулов. Данный подход может стать потенциальным инструментом для предотвращения потери волос у человека путем направленной стимуляции внутриклеточной сигнализации  $\beta 1$ -интегринов [106].

Показано, что интегрины  $\beta 1$  и МАР-киназа способствуют поддержанию компартмента СК *in vitro*. При трансфицировании культуры кератиноцитов человека ретровирусом, содержащим мутантную субъединицу интегрин  $\beta 1$  (доминантно-негативная мутация), снижался поверхностный уровень экспрессии этих субъединиц, адгезивность клеток и активация МАР-киназы. Это приводило к дифференцировке СК [17].

На модели химического канцерогенеза кожи показано, что эпидермис-специфический нокаут гена интегрин  $\alpha 3$  замедляет стадию инициации под действием диметилбензантрацена (DMBA), способствуя выходу СК ВФ из ниши и их дифференцировке, препятствуя таким образом накоплению трансформированных клеток в коже. Дальнейшая обработка форболовым эфиром не приводила к прогрессии опухолевого роста у экспериментальных животных. В то же время при длительном воздействии только DMBA в однокомпонентном протоколе прогрессия опухолей с переходом в злокачественную форму в эпидермисе животных с нокаутом гена интегрин  $\alpha 3$  проходила эффективнее и с большей скоростью, хотя число очагов малигнизации было ниже [107].

Интегрины  $\beta 1$  необходимы для апикальной локализации комплекса белков, регулирующих асимметричное деление эпидермальных СК, которое обеспечивает баланс между расположенными на БМ стволовыми и прогениторными клетками и их дифференцирующимися потомками в супрабазальных слоях эпидермиса [108].

Интегрины могут активировать непосредственно рецепторы факторов роста в отсутствие этих факторов [109].

Интегриновые рецепторы сочетают функции механического прикрепления клеток к субстрату и двунправленной сигнализации. Они, с одной стороны, обеспечивают адекватную реакцию клетки на сигналы среды, а с другой – позволяют клетке самой модулировать свое микроокружение. В эпидермисе адгезия базальных клеток к БМ критична для прочного соединения эпидермиса с дермой, поддержания гистотипической структуры эпидермиса и выполнения им защитных функций. Однако этим функции интегринов не исчерпываются. Помимо участия в сборке белков БМ, интегрины осуществляют контроль ориентации митотического веретена и апикальной локализации белкового комплекса при асимметричном делении базальных кератиноцитов, способствуя непрерывной регенерации эпидермиса и поддержанию пула базальных кератиноцитов. Регулируя миграцию, пролиферацию и дифференцировку эпидермальных клеток, интегрины в конечном счете во многом определяют морфогенез кожи и ее при-



датков. Нарушение экспрессии интегринов приводит к задержке развития ВФ в эмбриогенезе или к деградации фолликулов и потере волос во взрослом со-

стоянии. Нарушения в экспрессии интегринов могут лежать в основе многих патологических состояний, в том числе малигнизации. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hynes R.O. // *Cell*. 2002. V. 110. № 6. P. 673–687.
2. Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. // *Cell Tissue Res*. 2010. V. 339. № 1. P. 269–280.
3. Bouvard B., Brakebusch C., Gustafsson E., Aszódi A., Bengtsson T., Berna A., Fässler R. // *Circ. Res*. 2001. V. 89. № 3. P. 211–223.
4. Bokel C., Brown N.H. // *Dev. Cell*. 2002. V. 3. № 3. P. 311–321.
5. Stenn K.S., Paus R. // *Physiol. Rev*. 2001. V. 81. № 1. P. 449–494.
6. Gray J., Dawber R. A Pocketbook of hair and scalp disorders: an illustrated guide. Oxford: Blackwell Science, 1999.
7. Adams J.C., Watt F.M. // *J. Cell Biol*. 1991. V. 115. № 3. P. 829–841.
8. Hertle M., Adams J., Watt F.M. // *Development*. 1991. V. 112. № 1. P. 193–206.
9. Adams J.C., Watt F.M. // *Cell*. 1990. V. 63. № 2. P. 425–435.
10. Palmer E.L., Ruegg C., Ferrando R., Pytela R., Sheppard D. // *J. Cell Biol*. 1993. V. 123. P. 1289–1297.
11. Jensen U.B., Lowell S., Watt F.M. // *Development*. 1999. V. 126. № 11. P. 2409–2418.
12. Hashmi S., Marinkovich M.P. // *Clin. Dermatol*. 2011. V. 29. № 4. P. 398–411.
13. Stepp M.A. // *Dev. Dyn*. 1999. V. 214. № 3. P. 216–228.
14. Watt F.M. // *EMBO J*. 2002. V. 21. № 15. P. 3919–3926.
15. Carroll J.M., Romero M.R., Watt F.M. // *Cell*. 1995. V. 83. № 6. P. 957–968.
16. Watt F.M., Kubler M.D., Hotchin N.A., Nicholson L.J., Adams J.C. // *J. Cell Sci*. 1993. V. 106. P. 175–182.
17. Zhu A.J., Haase I., Watt F.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 12. P. 6728–6733.
18. Dowling J., Yu Q.C., Fuchs E. // *J. Cell Biol*. 1996. V. 134. № 2. P. 559–572.
19. Georges-Labouesse E., Messaddeq N., Yehia G., Cadalbert L., Dierich A., LeMeur M. // *Nat. Genet*. 1996. V. 13. № 3. P. 370–373.
20. van der Neut R., Krimpenfort P., Calafat J., Niessen C.M., Sonnenberg A. // *Nat. Genet*. 1996. V. 13. № 3. P. 366–369.
21. Ashton G.H., Sorelli P., Mellerio J.E., Keane F.M., Eady R.A., McGrath J.A. // *Br. J. Dermatol*. 2001. V. 144. № 2. P. 408–414.
22. Germain E.C., Santos T.M., Rabinovitz I. // *Mol. Biol. Cell*. 2009. V. 20. № 1. P. 56–67.
23. Kligys K.R., Wu Y., Hopkinson S.B., Kaur S., Platanius L.S., Jones J.C. // *J. Biol. Chem*. 2012. V. 287. № 22. P. 17975–17984.
24. Sehgal B.U., DeBiase P.J., Matzno S., Chew T.L., Claiborne J.N., Hopkinson S.B., Russell A., Marinkovich M.P., Jones J.C. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. № 46. P. 35487–35498.
25. Hintermann E., Bilban M., Sharabi A., Quaranta V. // *J. Cell Biol*. 2001. V. 153. № 3. P. 465–478.
26. Russell A.J., Fincher E.F., Millman L., Smith R., Vela V., Waterman E.A., Dey C.N., Guide S., Weaver V.M., Marinkovich M.P. // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. P. 3543–3556.
27. Fassler R., Meyer M. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 1896–1908.
28. Stephens L.E., Sutherland A.E., Klimanskaya I.V., Andrieux A., Meneses J., Pedersen R.A., Damsky C.H. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 1883–1895.
29. Fässler R., Pfaff M., Murphy J., Noegel A.A., Johansson S., Timpl R., Albrecht R. // *J. Cell Biol*. 1995. V. 128. № 5. P. 979–988.
30. Bagutti C., Wobus A.M., Fassler R., Watt F.M. // *Dev. Biol*. 1996. V. 179. № 1. P. 184–196.
31. Marinkovich M.P., Keene D.R., Rimberg C.S., Burgeson R.E. // *Dev. Dyn*. 1993. V. 197. № 4. P. 255–267.
32. Bagutti C., Hutter C., Chiquet-Ehrismann R., Fässler R., Watt F.M. // *Dev. Biol*. 2001. V. 231. № 2. P. 321–333.
33. Raghavan S., Bauer C., Mundschau G., Li Q., Fuchs E. // *J. Cell Biol*. 2000. V. 150. № 5. P. 1149–1160.
34. Brakebusch C., Grose R., Quondamatteo F., Ramirez A., Jorcano J.L., Pirro A., Svensson M., Herken R., Sasaki T., Timpl R. // *EMBO J*. 2000. V. 19. № 15. P. 3990–4003.
35. Levy L., Broad S., Diekmann D., Evans R.D., Watt F.M. // *Mol. Biol. Cell*. 2000. V. 11. № 2. P. 453–466.
36. <http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/Labs/Lab15/Lab15.htm>
37. Hotchin N.A., Gandarillas A., Watt F.M. // *J. Cell Biol*. 1995. V. 128. № 6. P. 1209–1219.
38. Grose R., Hutter C., Bloch W., Thorey I., Watt F.M., Fässler R., Brakebusch C., Werner S. // *Development*. 2002. V. 129. № 9. P. 2303–2315.
39. Lopez-Rovira T., Silva-Vargas V., Watt F.M. // *J. Invest. Dermatol*. 2005. V. 125. № 6. P. 1215–1227.
40. Conti F.J., Rudling R.J., Robson A., Hodiola-Dilke K.M. // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. P. 2737–2747.
41. Kreidberg J.A., Donovan M.J., Goldstein S.L., Rennke H., Shepherd K., Jones R.C., Jaenisch R. // *Development*. 1996. V. 122. № 11. P. 3537–3547.
42. DiPersio C.M., Hodiola-Dilke K.M., Jaenisch R., Kreidberg J.A., Hynes R.O. // *J. Cell Biol*. 1997. V. 137. № 3. P. 729–742.
43. DiPersio C.M., van der Neut R., Georges-Labouesse E., Kreidberg J.A., Sonnenberg A., Hynes R.O. // *J. Cell Sci*. 2000. V. 113. P. 3051–3062.
44. Panteleyev A.A., Botchkareva N.V., Sundberg J.P., Cristiano A.M., Paus R. // *Am. J. Pathol*. 1999. V. 155. № 1. P. 159–171.
45. Oro A.E., Scott M.P. // *Cell*. 1998. V. 95. № 5. P. 575–578.
46. van Genderen C., Okamura R.M., Farinas I., Quo R.G., Parslow T.G., Bruhn L., Grosschedl R. // *Genes Dev*. 1994. V. 8. № 22. P. 2691–2703.
47. St-Jacques B., Dassule H.R., Karavanova I., Botchkarev V.A., Li J., Danielian P.S., McMahon J.A., Lewis P.M., Paus R., McMahon A.P. // *Curr. Biol*. 1998. V. 8. № 19. P. 1058–1068.
48. Chiang C., Swan R.Z., Grachtchouk M., Bolinger M., Litingtung Y., Robertson E.K., Cooper M.K., Gaffield W., Westphal H., Beachy P.A. // *Dev. Biol*. 1999. V. 205. № 1. P. 1–10.
49. Shattil S.J., Kim C., Ginsberg M.H. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010. V. 11. № 4. P. 288–300.
50. Zhang X., Jiang G., Cai Y., Monkley S.J., Critchley D.R., Sheetz M.P. // *Nat. Cell Biol*. 2008. V. 10. № 9. P. 1062–1068.
51. Choi C.K., Vicente-Manzanares M., Zareno J., Whitmore L.A., Mogilner A., Horwitz A.R. // *Nat. Cell Biol*. 2008. V. 10. № 9. P. 1039–1050.
52. Xu W., Baribault H., Adamson E.D. // *Development*. 1998. V. 125. № 2. P. 327–337.

53. Geiger B., Spatz J.P., Bershadsky A.D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 1. P. 21–33.
54. Geiger B., Yamada K.M. // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2011. V. 3. № 5. a005033.
55. Turner C.E. // *Nat. Cell Biol.* 2000. V. 2. № 12. P. E231–E236.
56. Zamir E., Geiger B. // *J. Cell Sci.* 2001. V. 114. P. 3577–3579.
57. Frame M.C. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 989–998.
58. Mitra S.K., Hanson D.A., Schlaepfer D.D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. V. 6. № 1. P. 56–68.
59. Legate K.R., Montanez E., Kudlacek O., Fassler R. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 1. P. 20–31.
60. Huttenlocher A., Horwitz A.R. // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2011. V. 3. № 9. a005074.
61. Ridley A.J. // *Bioessays.* 1994. V. 16. № 5. P. 321–327.
62. Beckerle M.C., Burridge K., DeMartino G.N., Croall D.E. // *Cell.* 1987. V. 51. P. 569–577.
63. Yu D.H., Qu C.K., Henegariu O., Lu X., Feng G.S. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 33. P. 21125–21131.
64. Hannigan G.E., Leung-Hageteijn C., Fitz-Gibbon L., Coppelino M.G., Radeva G., Filmus J., Bell J.C., Dedhar S. // *Nature.* 1996. V. 379. P. 91–96.
65. Grashoff C., Thievensen I., Lorenz K., Ussar S., Fässler R. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. V. 16. № 5. P. 565–571.
66. Yamauchi K., Kurosaka A. // *Arch. Dermatol. Res.* 2010. V. 302. № 4. P. 263–270.
67. Fuchs E., Merrill B.J., Jamora C., DasGupta R. // *Dev. Cell.* 2001. V. 1. № 1. P. 13–25.
68. Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., Cotsarelis G., Birchmeier W. // *Cell.* 2001. V. 105. № 4. P. 533–545.
69. Zhou P., Byrne C., Jacobs J., Fuchs E. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. № 6. P. 700–713.
70. Logan C.Y., Nusse R. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 20. P. 781–810.
71. Delcommenne M., Tan C., Gray V., Rue L., Woodgett J., Dedhar S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 19. P. 11211–11216.
72. Novak A., Hsu S.C., Leung-Hageteijn C., Radeva G., Papkoff J., Montesano R., Roskelley C., Grosschedl R., Dedhar S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 8. P. 4374–4379.
73. Oloumi A., Syam S., Dedhar S. // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 59. P. 7747–7757.
74. Sakai T., Li S., Dicheva D., Grashoff C., Sakai K., Kostka G., Braun A., Pfeifer A., Yurchenco P.D., Fässler R. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 7. P. 926–940.
75. Lynch D.K., Ellis C.A., Edwards P.A., Hiles I.D. // *Oncogene.* 1999. V. 18. № 56. P. 8024–8032.
76. Zervas C.G., Gregory S.L., Brown N.H. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 152. № 5. P. 1007–1018.
77. Mackinnon A.C., Qadota H., Norman K.R., Moerman D.G., Williams B.D. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 10. P. 787–797.
78. Hill M.M., Feng J., Hemmings B.A. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 14. P. 1251–1255.
79. Grashoff C., Aszodi A., Sakai T., Hunziker E.B., Fässler R. // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. № 4. P. 432–438.
80. Lorenz K., Grashoff C., Torka R., Sakai T., Langbein L., Bloch W., Aumailley M., Fassler R. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 177. № 3. P. 501–513.
81. Qin J., Wu C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. № 5. P. 607–613.
82. Blanpain C., Fuchs E. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006. V. 22. P. 339–373.
83. Dassule H.R., Lewis P., Bei M., Maas R., McMahon A.P. // *Development.* 2000. V. 127. № 22. P. 4775–4785.
84. Manohar A., Shome S.G., Lamar J., Stirling L., Iyer V., Pumiglia K., DiPersio C.M. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 4043–4054.
85. Nakrieko K.A., Welch I., Dupuis H., Bryce D., Pajak A., St-Arnaud R., Dedhar S., D'Souza S.J., Dagnino L. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. № 4. P. 1462–1473.
86. Choma D.P., Pumiglia K., DiPersio C.M. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 3947–3959.
87. Nakrieko K.A., Rudkouskaya A., Irvine T.S., D'Souza S.J., Dagnino L. // *Mol. Biol. Cell.* 2011. V. 22. № 14. P. 2532–2540.
88. Judah D., Rudkouskaya A., Wilson R., Carter D.E., Dagnino L. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. e36704.
89. Watt F.M., Driskell R.R. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2010. V. 365. P. 155–163.
90. Hall P.A., Watt F.M. // *Development.* 1989. V. 106. № 4. P. 619–633.
91. Scadden D.T. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 1075–1079.
92. Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. // *Nature.* 2001. V. 414. P. 98–104.
93. Watt F.M., Hogan B.L. // *Science.* 2000. V. 287. P. 1427–1430.
94. Morris R.J., Liu Y., Marles L., Yang Z., Trempus C., Li S., Lin J.S., Sawicki J.A., Cotsarelis G. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 4. P. 411–417.
95. Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W.E., Rendl M., Fuchs E. // *Science.* 2004. V. 303. P. 359–363.
96. Ordonez P., Di Girolamo N. // *Stem Cells.* 2012. V. 30. № 2. P. 100–107.
97. Hayashi R., Yamoto M., Saito T., Oshima T., Okano T., Tano Y., Nishida K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 367. № 2. P. 256–263.
98. Li A., Simmons P.J., Kaur P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 7. P. 3902–3907.
99. Wagers A.J., Weissman I.L. // *Stem Cells.* 2006. V. 24. № 4. P. 1087–1094.
100. Stingl J., Eirew P., Ricketson I., Shackleton M., Vaillant F., Choi D., Li H.I., Eaves C.J. // *Nature.* 2006. V. 439. P. 993–997.
101. Shackleton M., Vaillant F., Simpson K.J., Stingl J., Smyth G.K., Asselin-Labat M.L., Wu L., Lindeman G.J., Visvader J.E. // *Nature.* 2006. V. 439. P. 84–88.
102. Watt F.M., Fujiwara H. // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2011. V. 3. № 4. a005124.
103. Jones P.H., Watt F.M. // *Cell.* 1993. V. 73. № 4. P. 713–724.
104. Huttenlocher A., Sandborg R.R., Horwitz A.F. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995. V. 7. № 5. P. 697–706.
105. Kloepper J.E., Tiede S., Brinckmann J., Reinhardt D.P., Meyer W., Faessler R., Paus R. // *Exp. Dermatol.* 2008. V. 7. № 7. P. 592–609.
106. Kloepper J.E., Hendrix S., Bodo E., Tiede S., Humpries M.J., Philpott M.P., Fässler R., Paus R. // *Exp. Cell Res.* 2008. V. 314. № 3. P. 498–508.
107. Sachs N., Secades P., van Hulst L., Kreft M., Song J.Y., Sonnenberg A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 52. P. 21468–21473.
108. Lechler T., Fuchs E. // *Nature.* 2005. V. 437. P. 275–280.
109. Moro L., Venturino M., Bozzo C., Silengo L., Altruda F., Beguinot L., Tarone G., Defilippi P. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 22. P. 6622–6632.