

Povezovanje celic v tkiva

Lodish: Integrating cells into tissues,
W.H. Freeman & Co., NY.

Razdelitev poglavja

- Pritrjevanje celic in komuniciranje med njimi
- Pritrjevanje celic na medceličnino
- Kolageni v medceličnini
- Nekolagenske sestavine medceličnine

Razdelitev poglavja

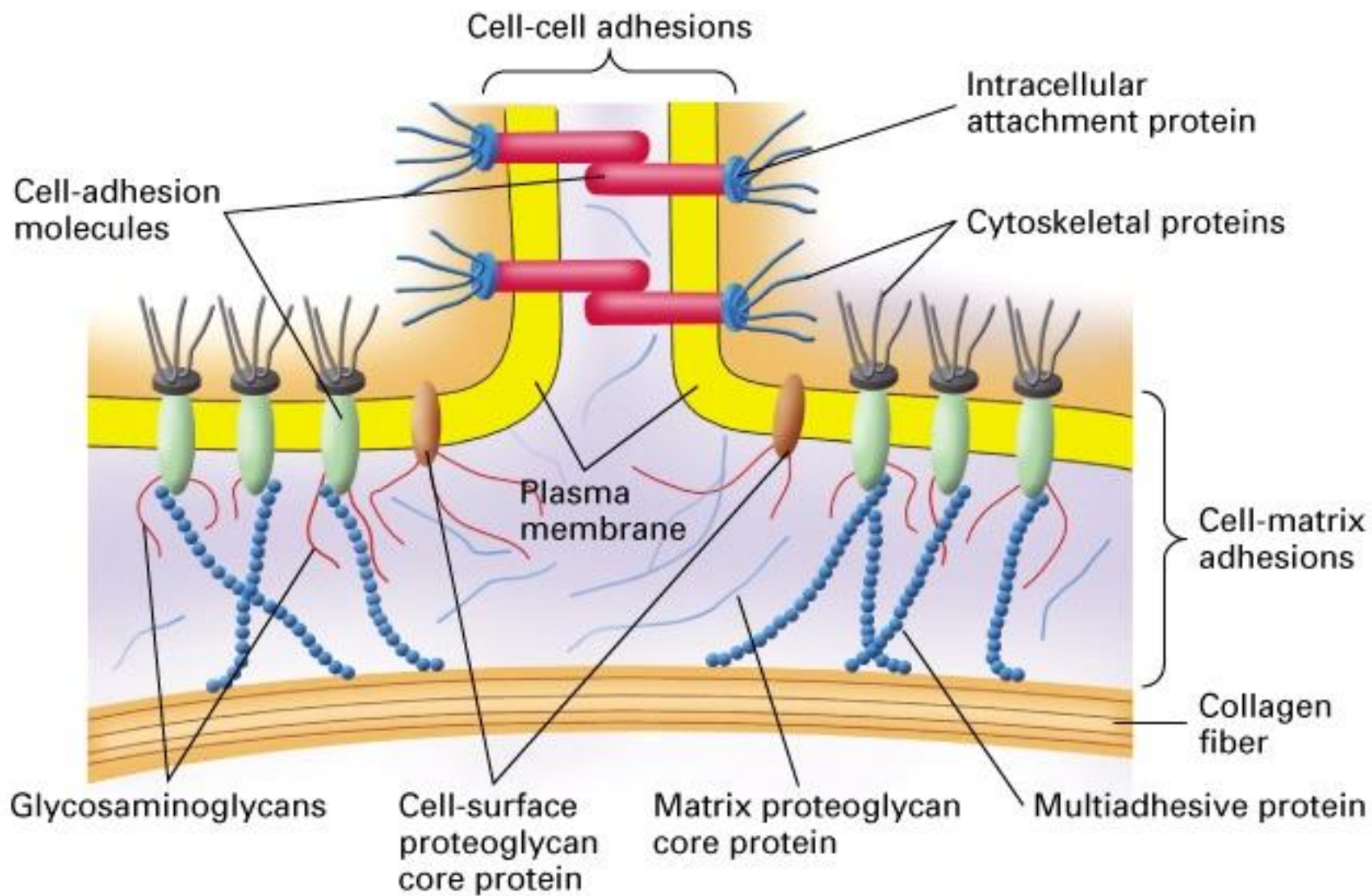
- Pritrjevanje celic in komuniciranje med njimi
- Pritrjevanje celic na medceličnino
- Kolageni v medceličnini
- Nekolagenske sestavine medceličnine

Membranski proteini in večceličnost

- adhezijske molekule (CAMs): združevanje enakih ali podobnih celic v tkiva
- medcelični stiki: stabilizacija povezav in komuniciranje
- celice izločajo medceličnino ali zunajcelični matriks (ECM): povezovanje celic in zaloga hormonov, ki uravnavajo rast in razvoj

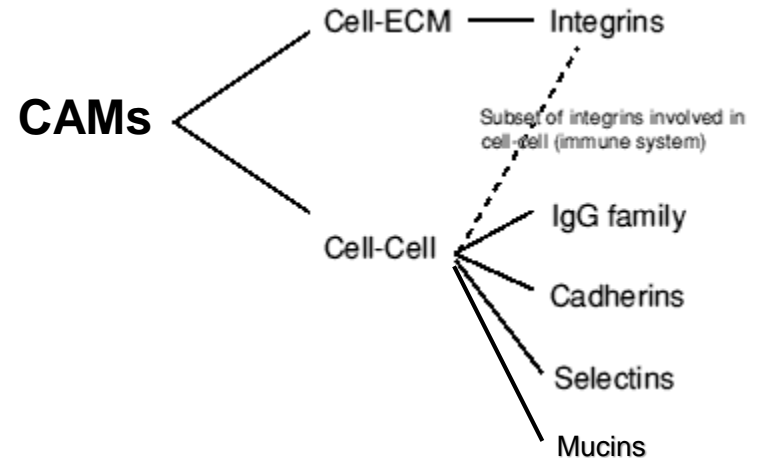
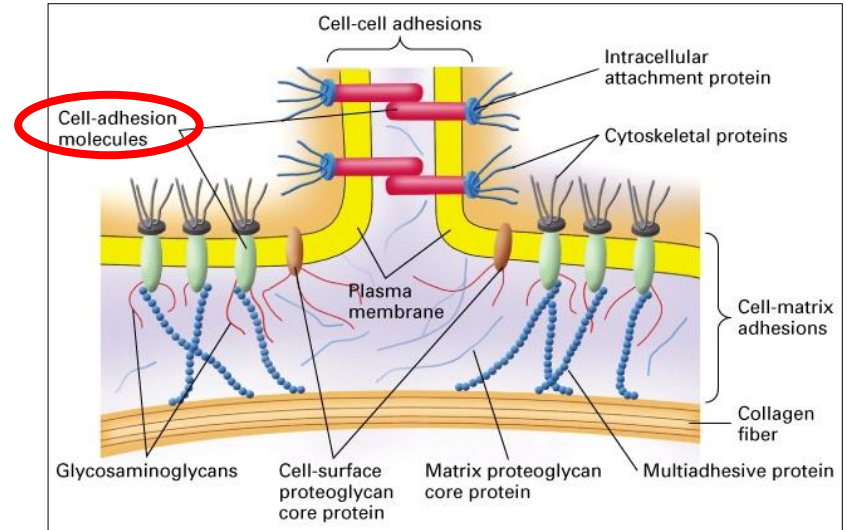
CAM = Cell-Adhesion Molecule

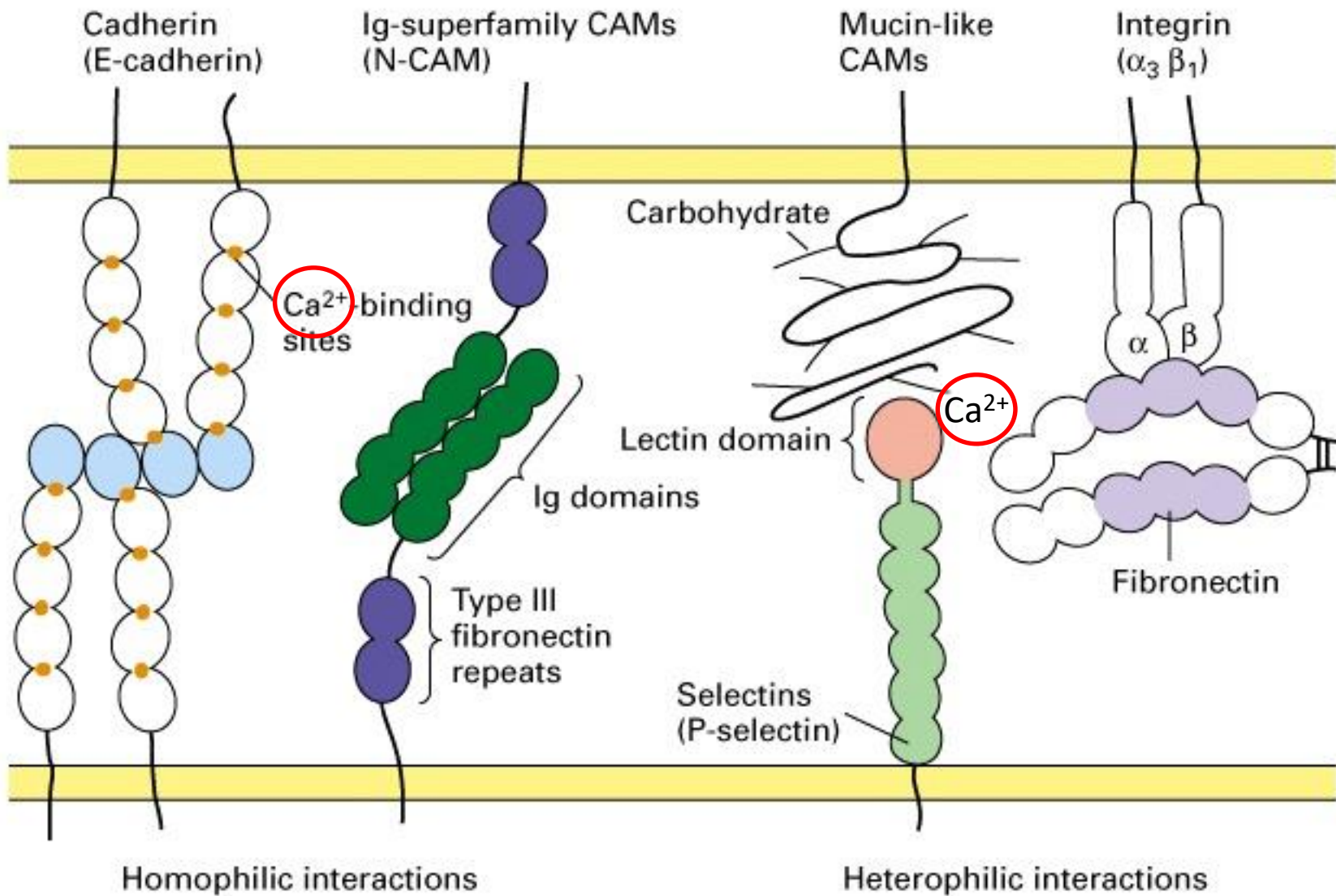
ECM = ExtraCellular Matrix



Adhezijske molekule (CAMs)

- Kadherini (Ca^{2+})
- CAM naddružine Ig
- Selektini (Ca^{2+})
- Mucini
- Integrini



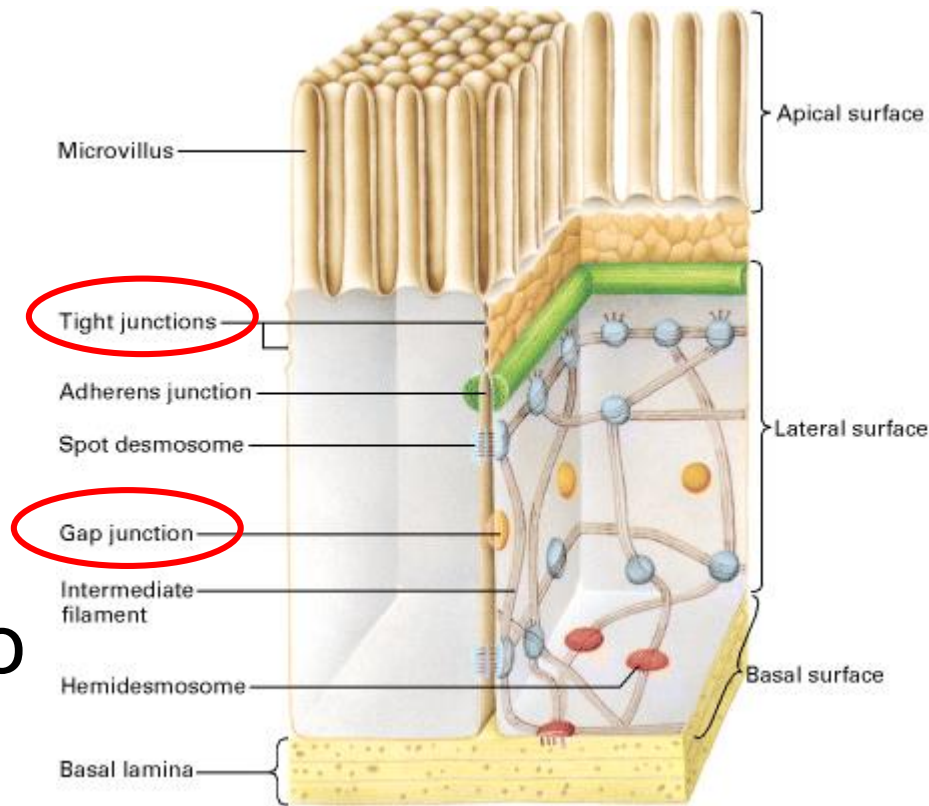


Za integrirano delovanje celic v tkivih so v glavnem odgovorni:

- presledkovni stiki
- tesni stiki
- medcelični stiki
- stiki celic z medceličnino



povezovani z znotrajceličnim skeletom



Seminar 6.1.2021

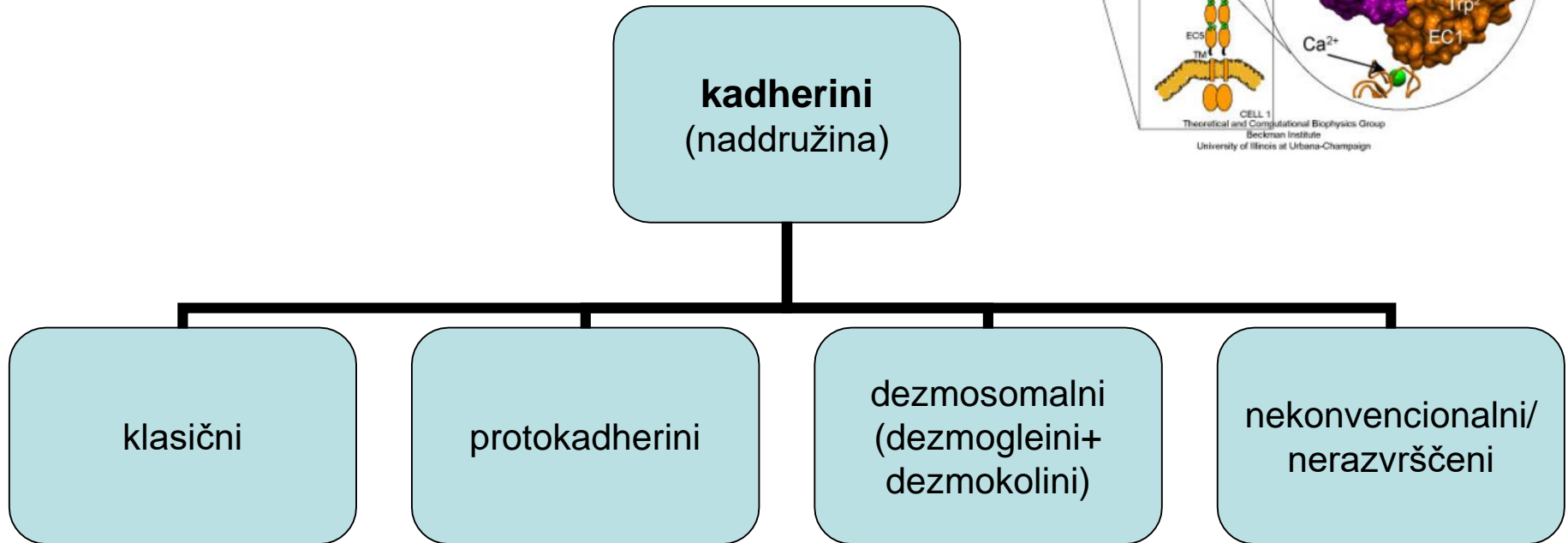
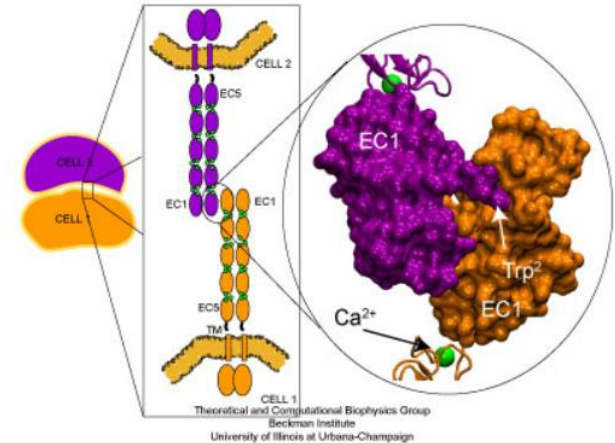
Andrej Race, Andrej Ivanovski,
Mateja Žvipelj, Neža Pavko

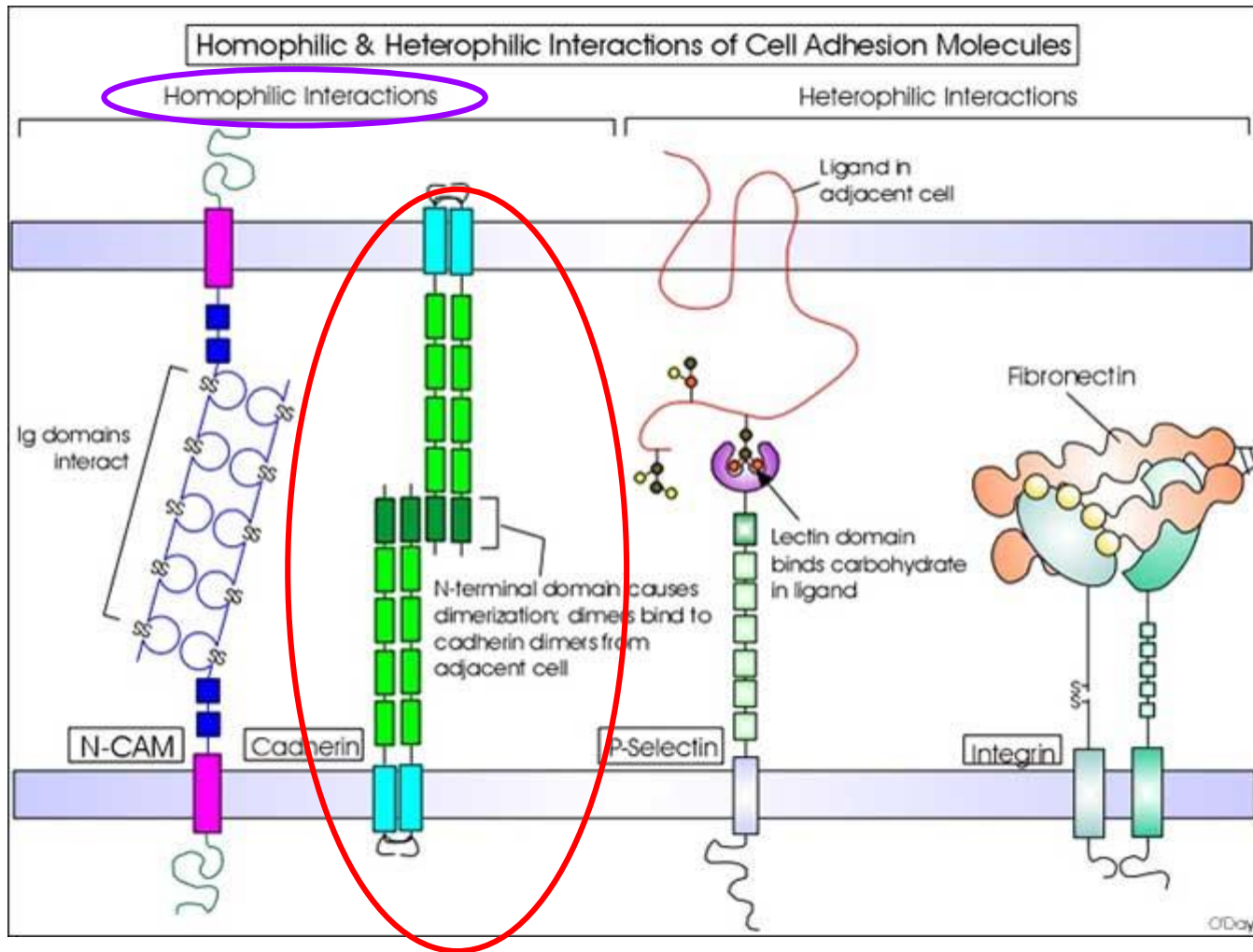
Adhezijske molekule (CAMs)

- kadherini: funkcija odvisna od Ca^{2+}
- naddružina imunoglobulinov
- selektini: funkcija odvisna od Ca^{2+}
- mucini
- integrini

Kadherini:

- transmembranski proteini tipa I
- kadherinske ponovitve (med njimi se veže Ca^{2+})
- vežejo se samo na kadherine istega tipa





Tip I integralni MP 720-750 AK, 50 - 60% identičnih ostankov.
 Za dimerizacijo, s tem pa za zmožnost adhezije, so potrebni Ca^{2+} ioni.
 Porazdelitev različnih kadherinov je značilna za posamezna tkiva.
 Odrasli vretenčarji: največ E-kadherina.

Glavne kadherinske molekule na sesalskih celicah

Molecule	Predominant Cellular Distribution
E-cadherin	Preimplantation embryos, non-neural epithelial tissue
P-cadherin	Trophoblast
N-cadherin	Nervous system, lens, cardiac and skeletal muscle

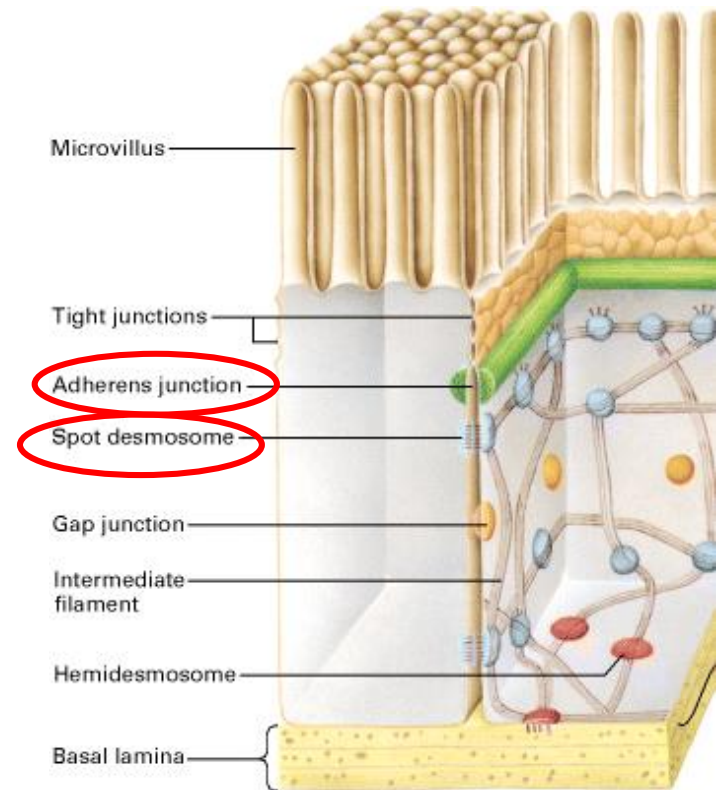
> 40 vrst kadherinov. Pomembna vloga pri diferenciaciji tkiv, vzpostavljanju povezav med nevroni ...

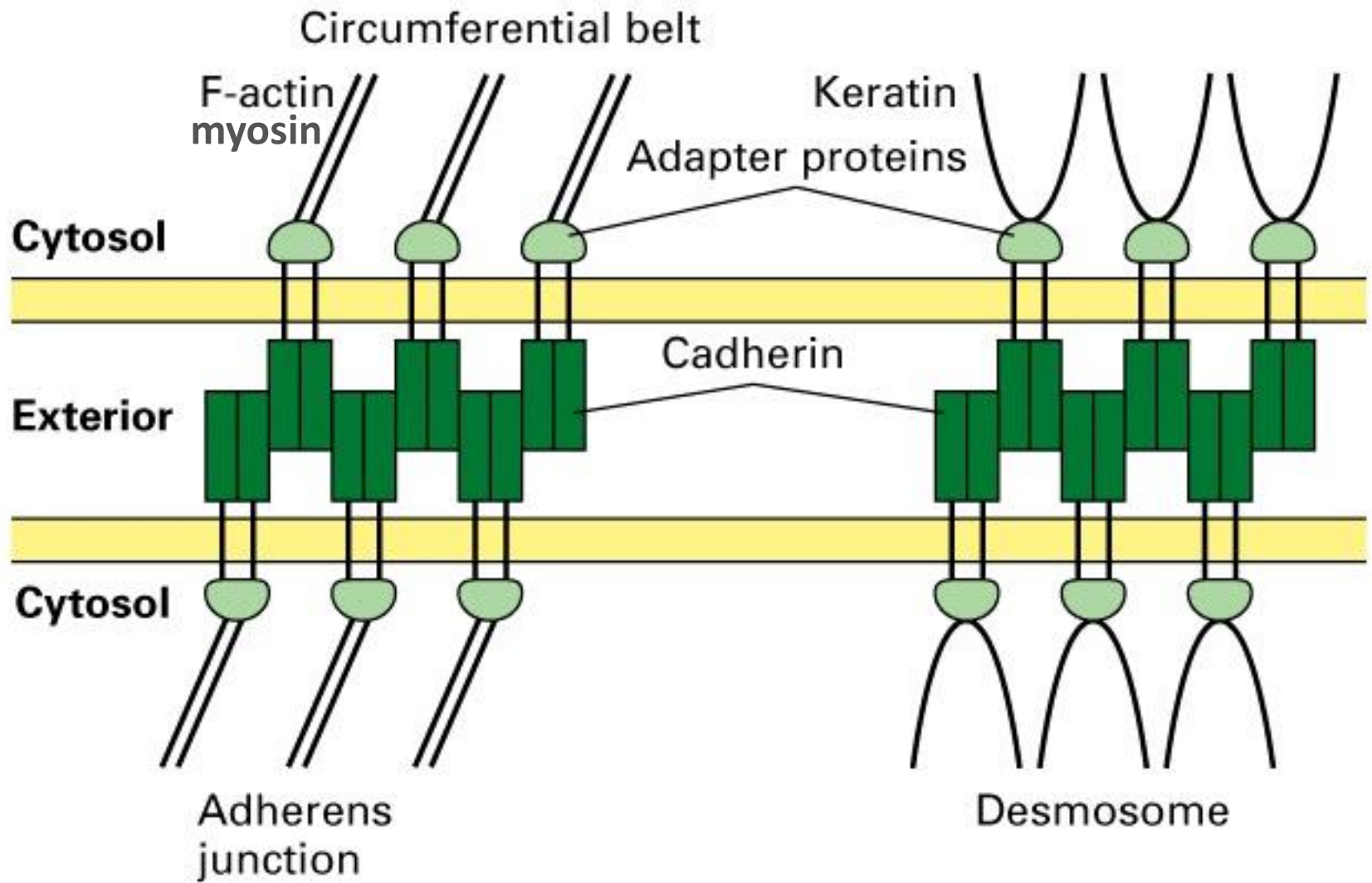
Izguba kadherinov na površini celic rakastih celic ⇔ metastaziranje.

E: epitelijski, P: placentalni, N: nevronski,
T: brez citoplazemske domene, V: vaskularni

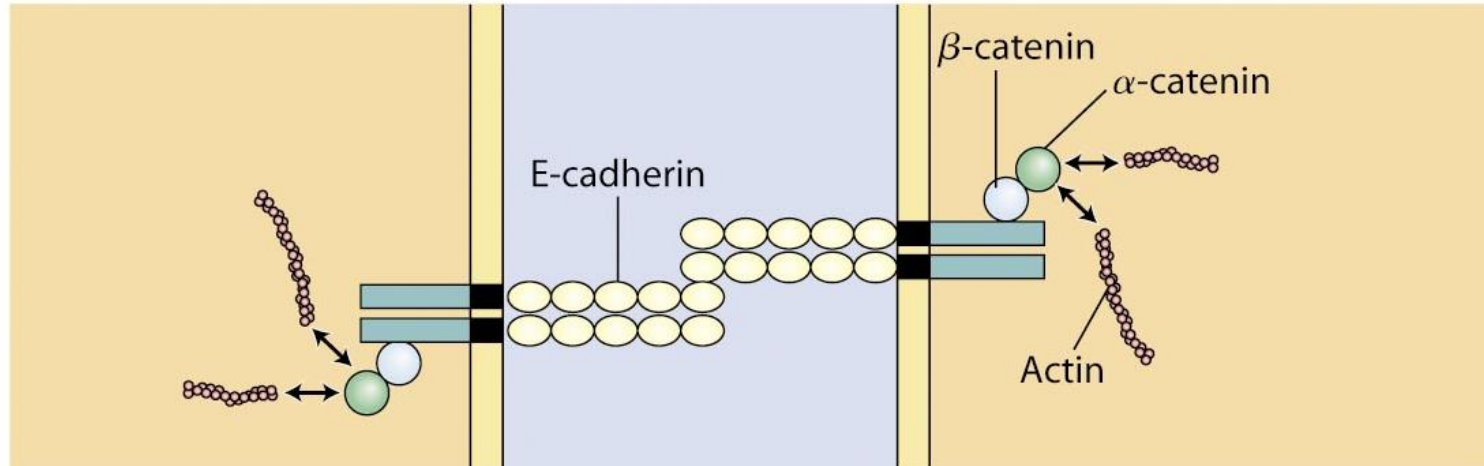
Medcelične povezave s kadherini

- **Adherenčni stiki:** pri epitelijskih celicah stiki, ki jih tvorijo E-kadherini. Katenini pa povezujejo E-kadherine z obročem iz aktina in miozina.
- **Dezmosomi:** so medcelični stiki, ki jih tvorita kadherina dezmgoglein in dezmkolin. Kadherine povezujeta s keratinskimi (intermediarnimi) filamenti v citosolu plakoglobin in plakofilin.

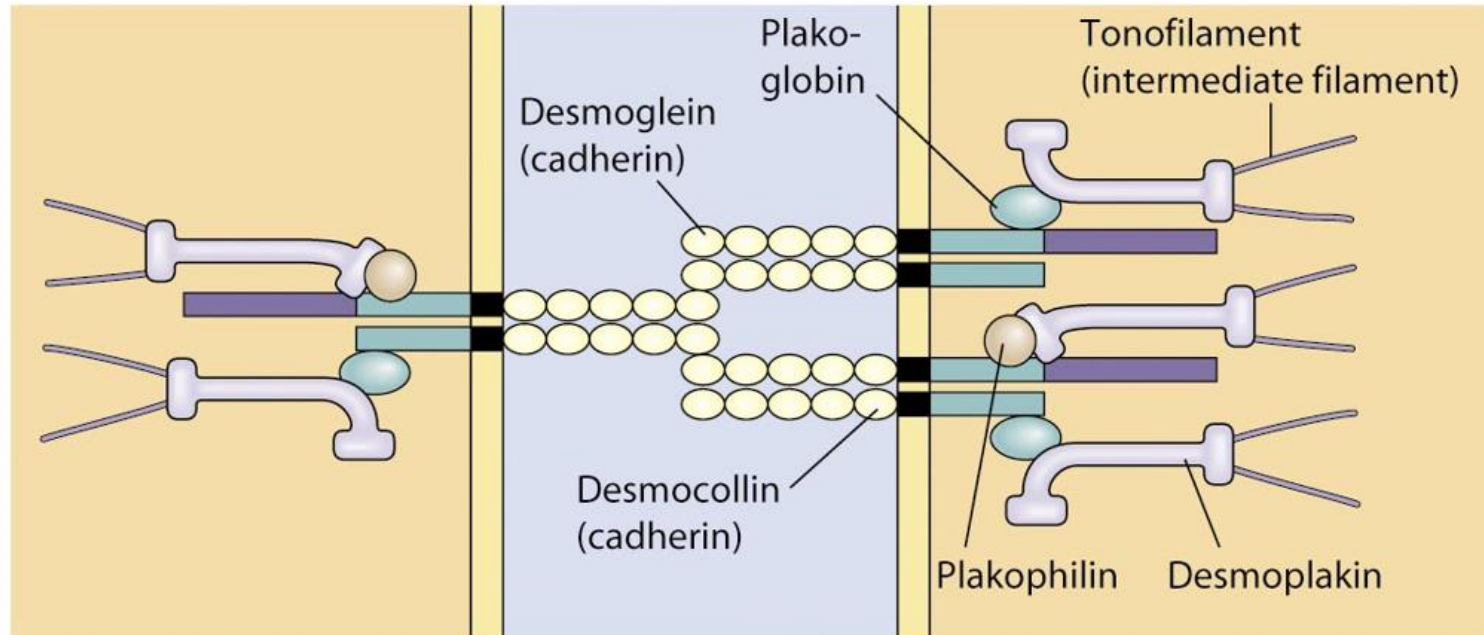




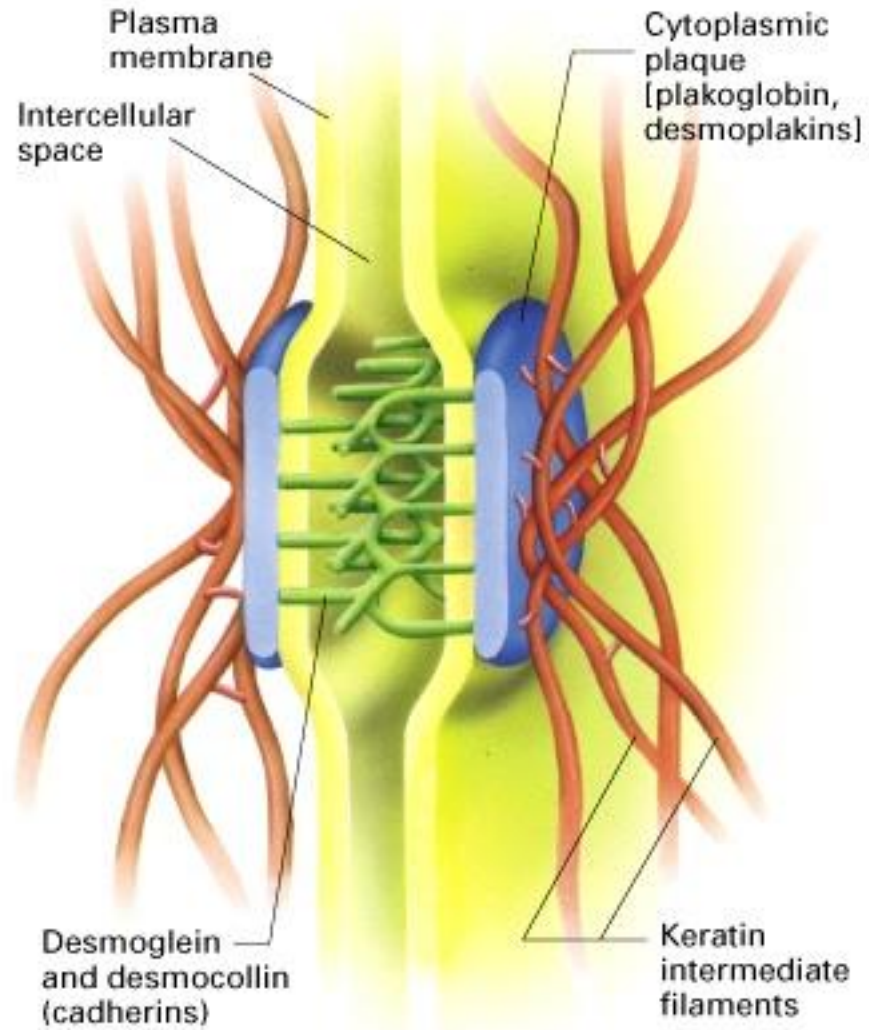
Adherenčni stik



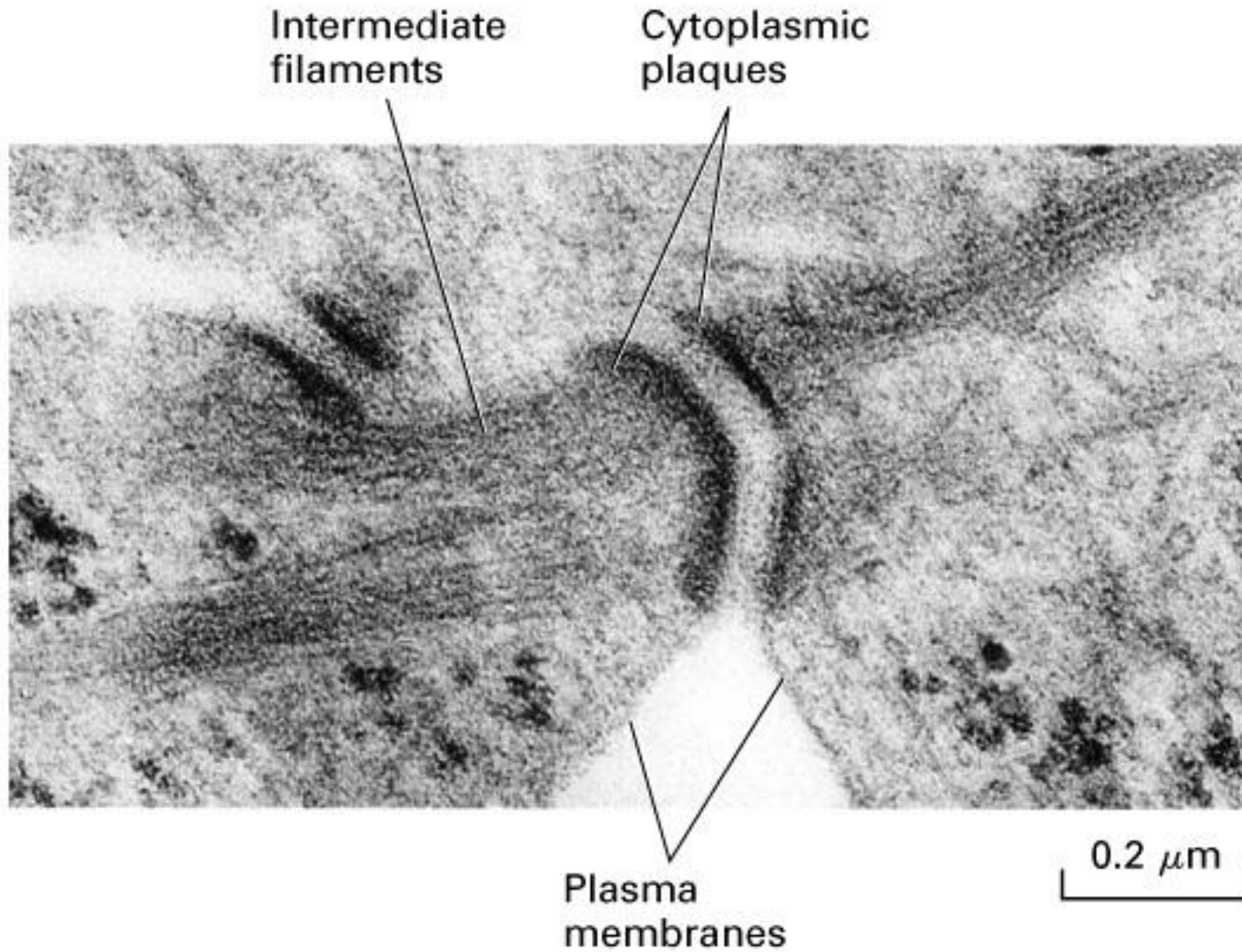
Dezmosom



Dezmosom

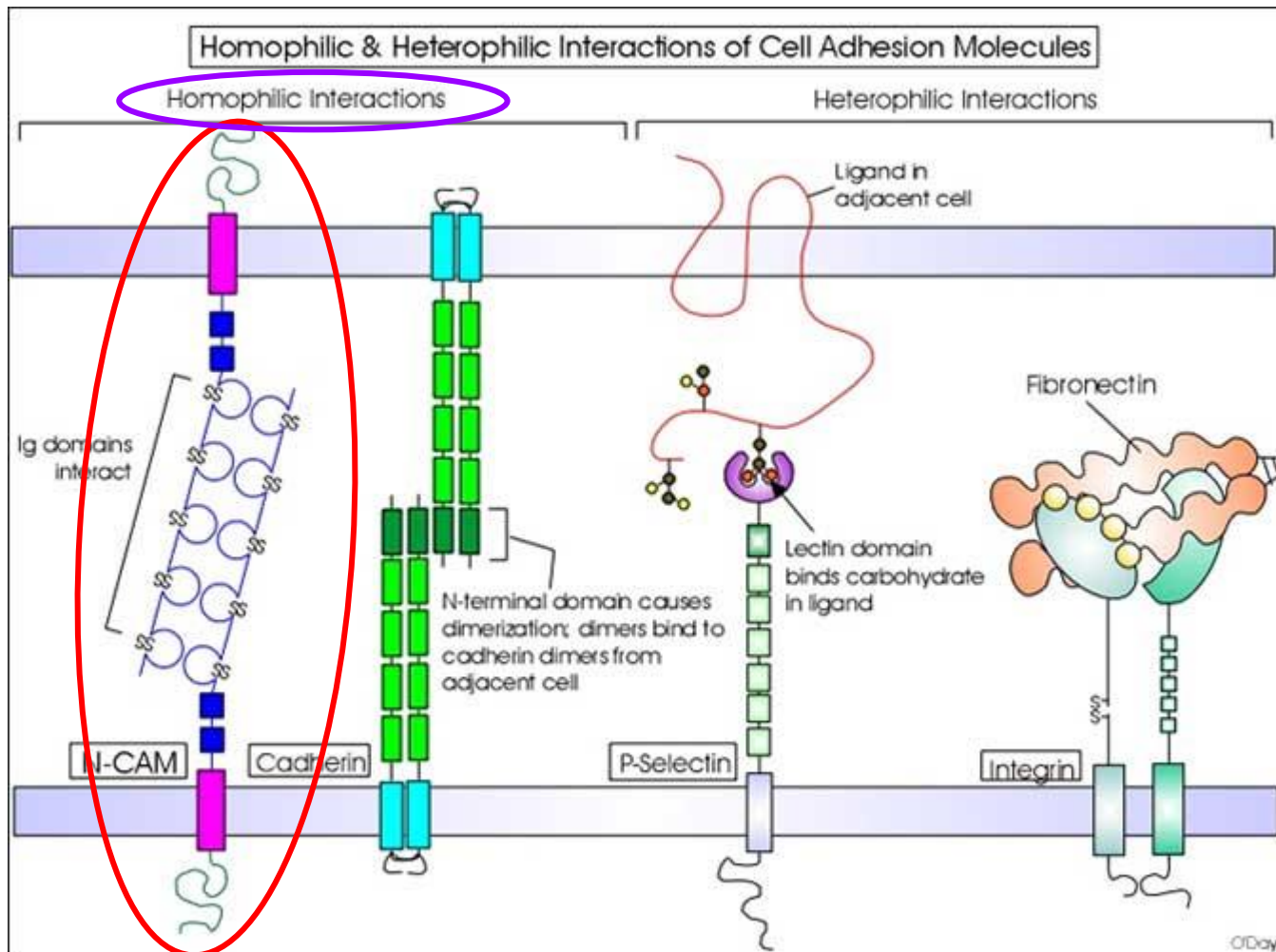


Z desmosomom povezana keratinocita

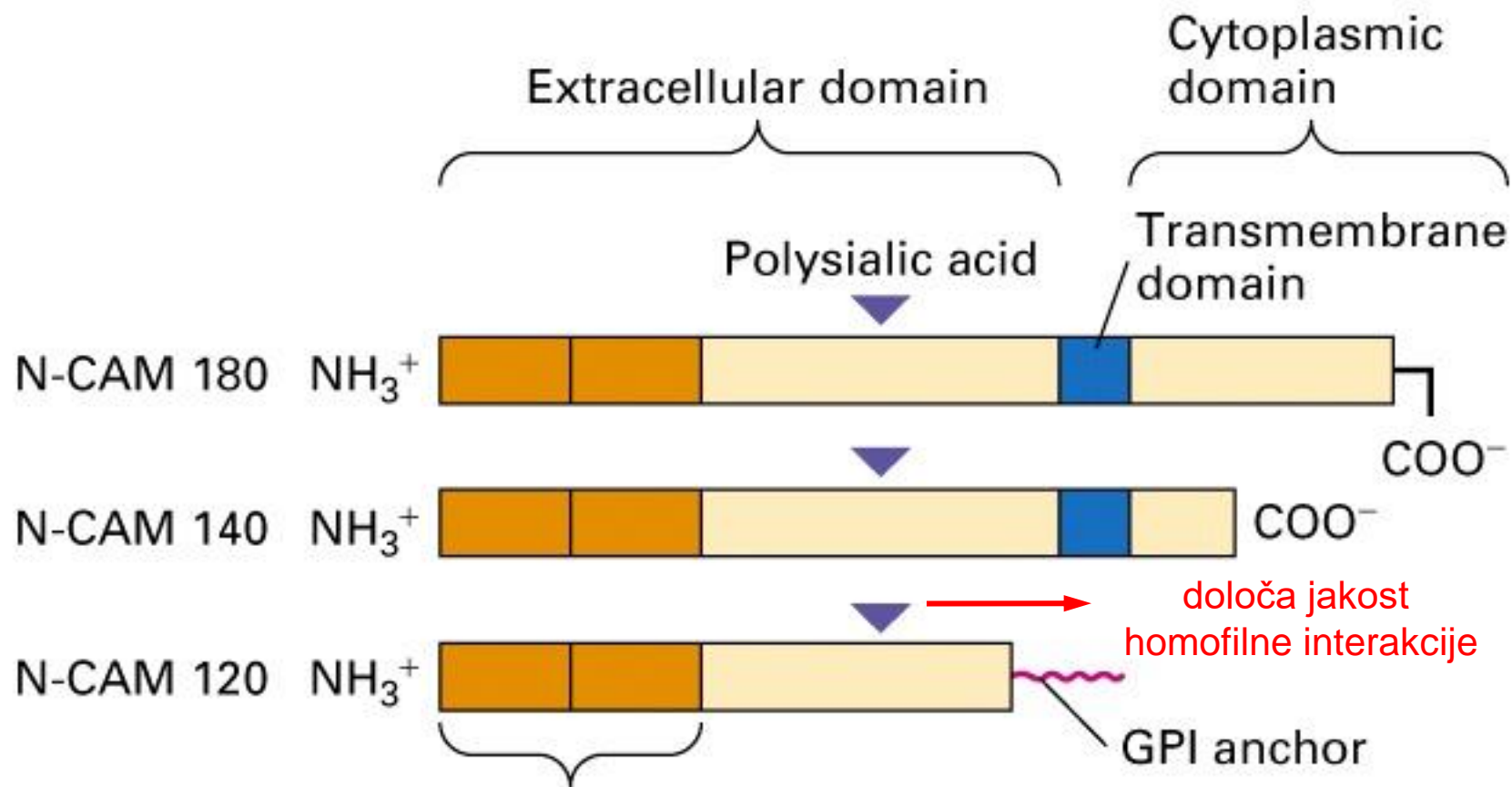


Adhezijske molekule (CAMs)

- kadherini: odvisni od Ca^{2+}
- **naddružina imunoglobulinov**
- selektini: odvisni od Ca^{2+}
- mucini
- integrini



N-CAM = adhezijske molekule v nevronih (Neural-CAM, tudi Vascular-CAM, Inter-CAM).
 Homofilna interakcija neodvisna od Ca^{2+} . Tudi heterofilne interakcije (z integrini).
 En gen, a alternativno izrezovanje intronov in različna glikozilacija.
 Pomembni med morfogenezo, pri diferenciaciji mišičnih, živčnih in glialnih celic.

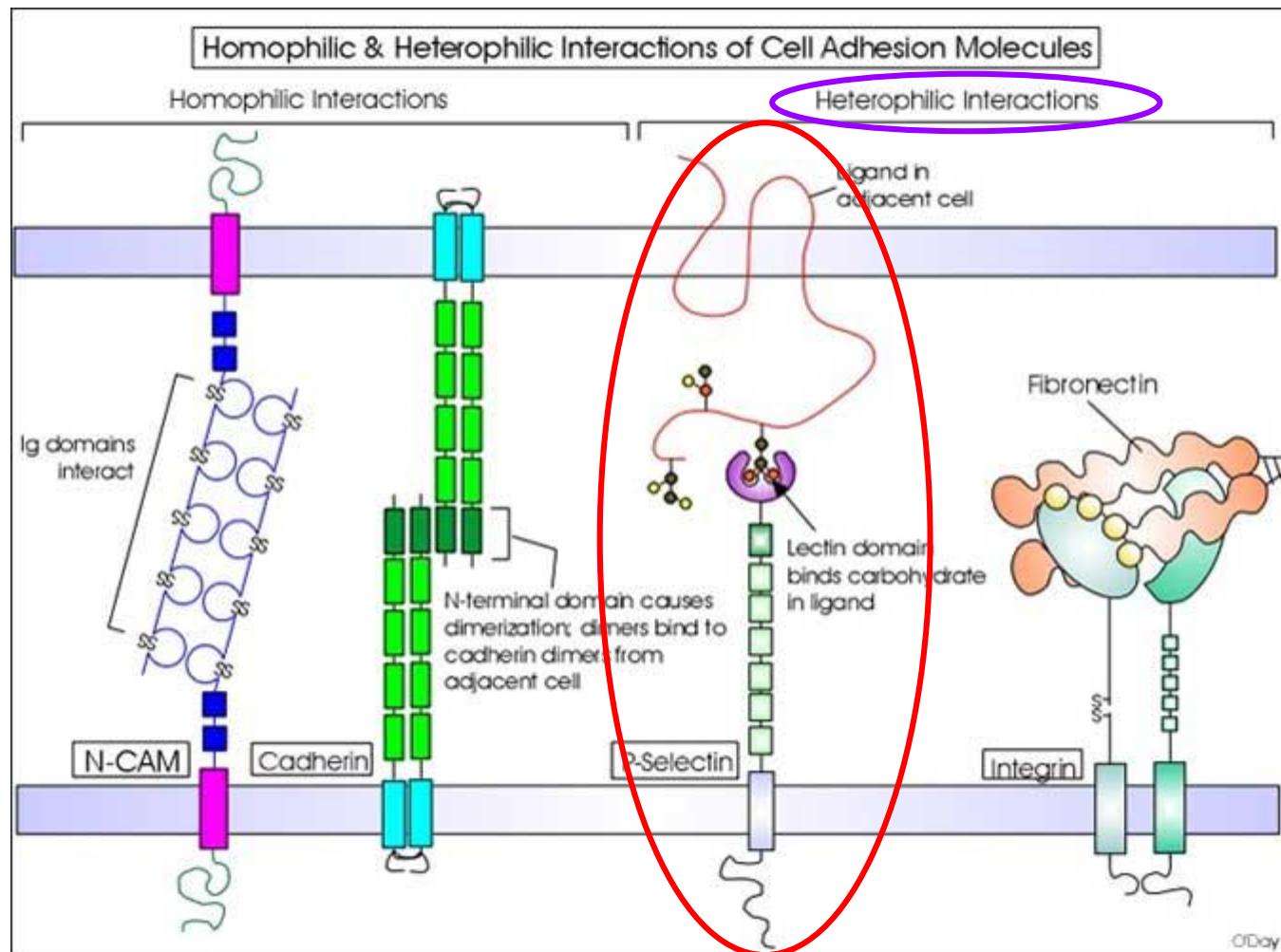


Binding sites for heparan sulfate proteoglycans and for N-CAMs on other cells

določa jakost homofilne interakcije

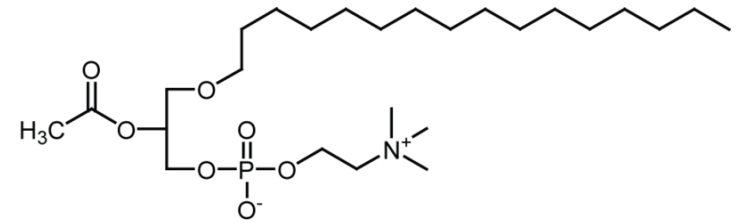
Adhezijske molekule (CAMs)

- kadherini: odvisni od Ca^{2+}
- naddružina imunoglobulinov
- **selektini: odvisni od Ca^{2+}**
- mucini
- integrini

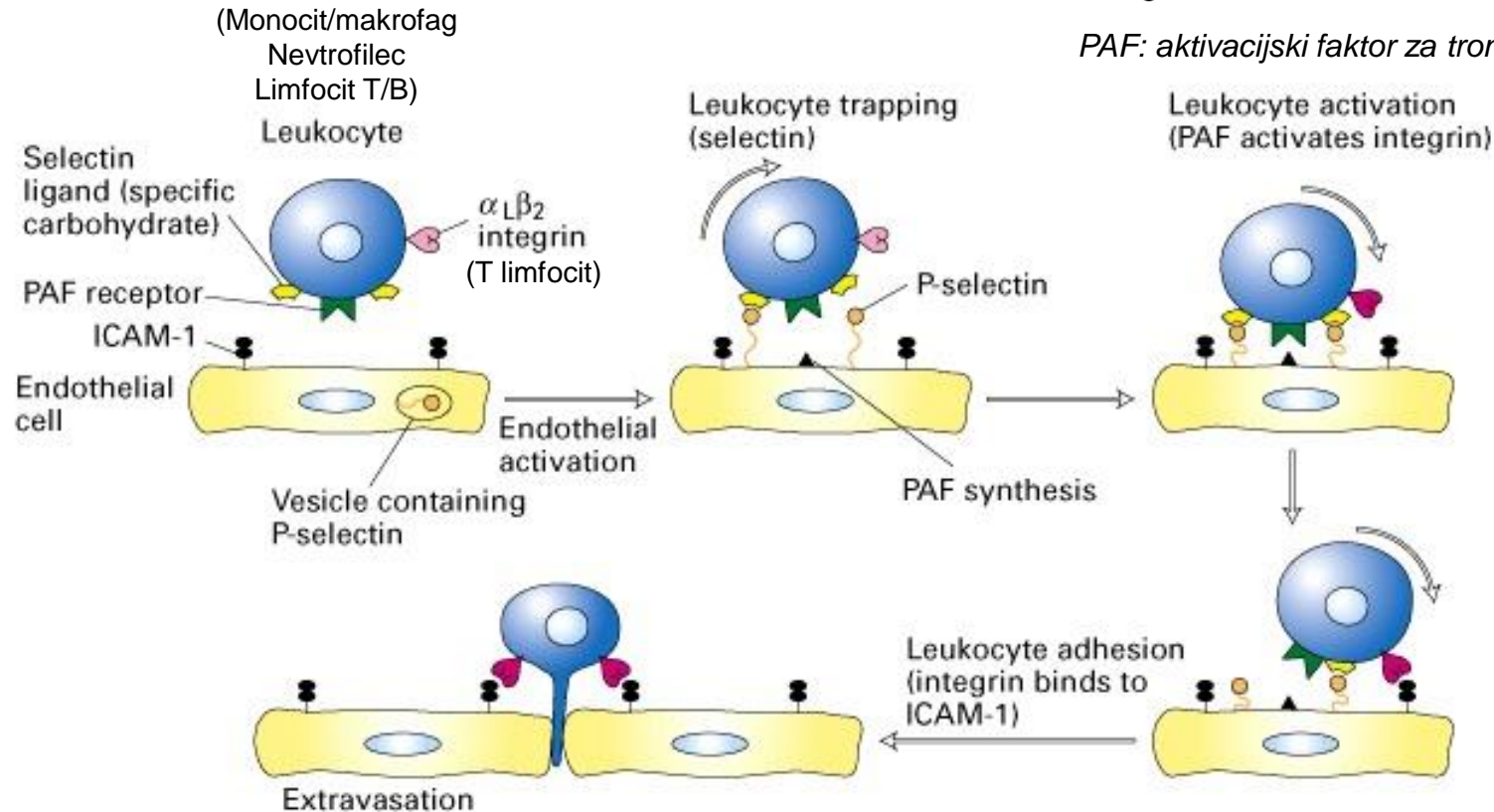


Selektini delujejo pri povezavah levkocitov (monociti, nevtrofilci, limfociti T in B) z endotelijskimi celicami žilnih sten, pa tudi pri interakciji z elementi ECM. P-selektin je v membrani endotelijske celice. Spada med lektine (vežejo ogljikove hidrate); funkcija zahteva Ca^{2+} ione.

Ključna vloga selektinov pri ekstravazaciji levkocitov



PAF: aktivacijski faktor za trombocite



P-selektin se ob delovanju citokinov (vnetje, infekcija) z eksocitozo založnih mešičkov izpostavi na površini endotelijske celice. Vezava PAF na PAFR sproži aktivacijo integrinov na levkocitu in njihovo vezavo na endotelijski ICAM-1 in ICAM-2 (Inter-CAM), CAM iz naddružine Ig.

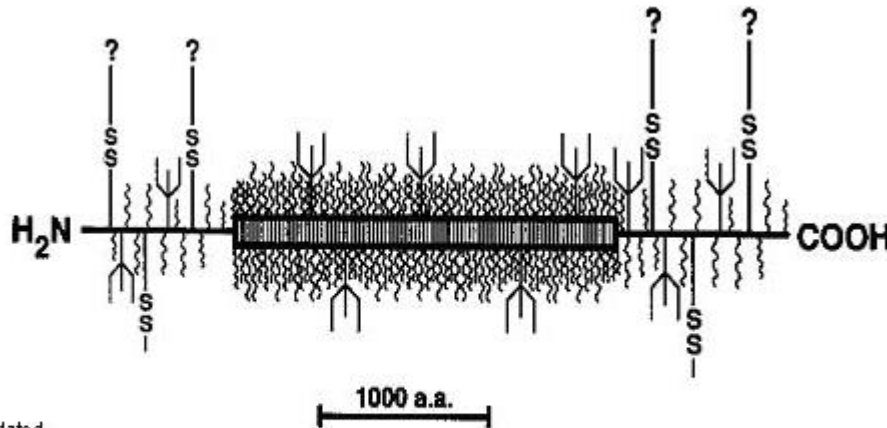
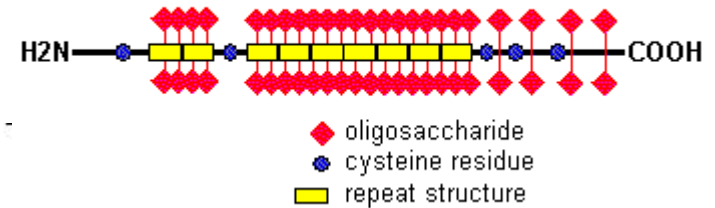
Adhezijske molekule (CAMs)

- kadherini: odvisni od Ca^{2+}
- naddružina imunoglobulinov
- selektini: odvisni od Ca^{2+}
- mucini
- integrini

Osnovne lastnosti mucinov:

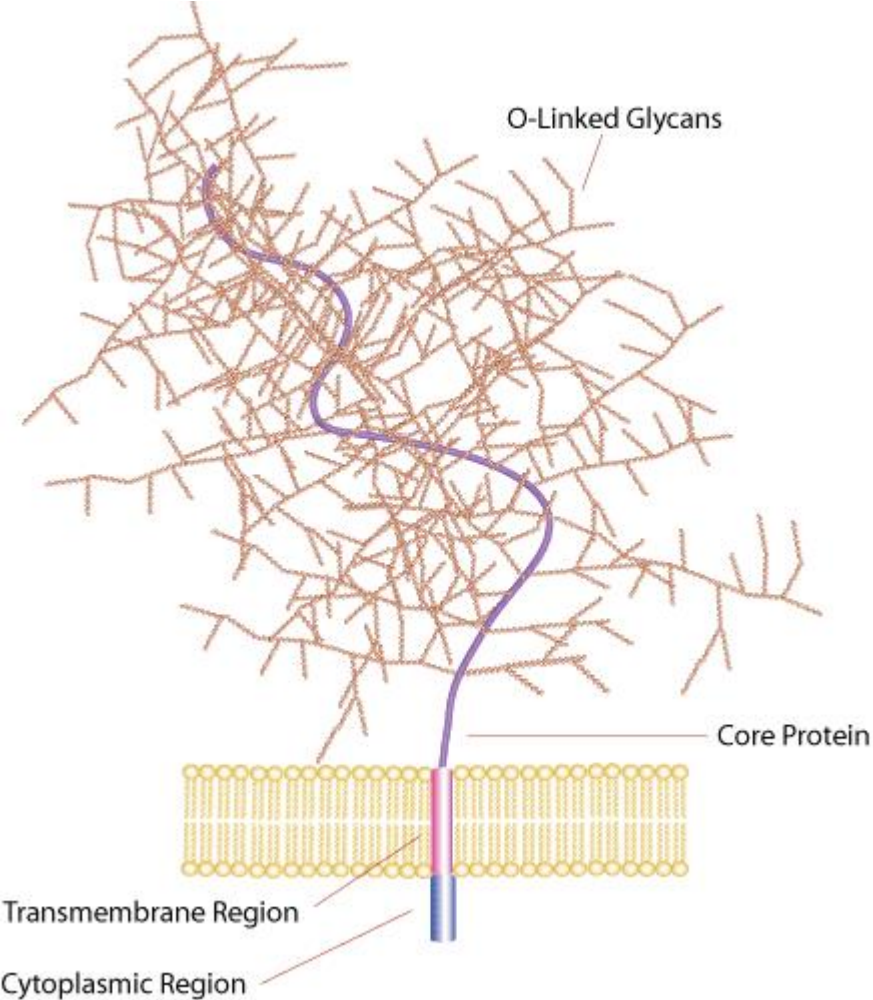
- visoko glikozilirani, predvsem v osrednjem delu strukture
- N- in C-konec je bogat s Cys
- osrednji del (50% Ser in Thr) vsebuje >100 O-vezanih sladkornih verig
- združujejo se v agregate z $10^6 - 10^7$ Da (nekovalentne interakcije in S-S)
- so pomembna sestavina sluzi
- predstavljajo bariero za proteaze

Generic structure of a mucin monomer



- Glycosylated
- O-linked Oligosaccharides
- ψ N-linked Oligosaccharides
- SS- Disulfide bridges

Struktura mucina



Razdelitev poglavja

- Pritrjevanje celic in komuniciranje med njimi
- Pritrjevanje celic na medceličnino
- Kolageni v medceličnini
- Nekolagenske sestavine medceličnine

Glavne funkcije medceličnine (ExtraCellular Matrix - ECM)

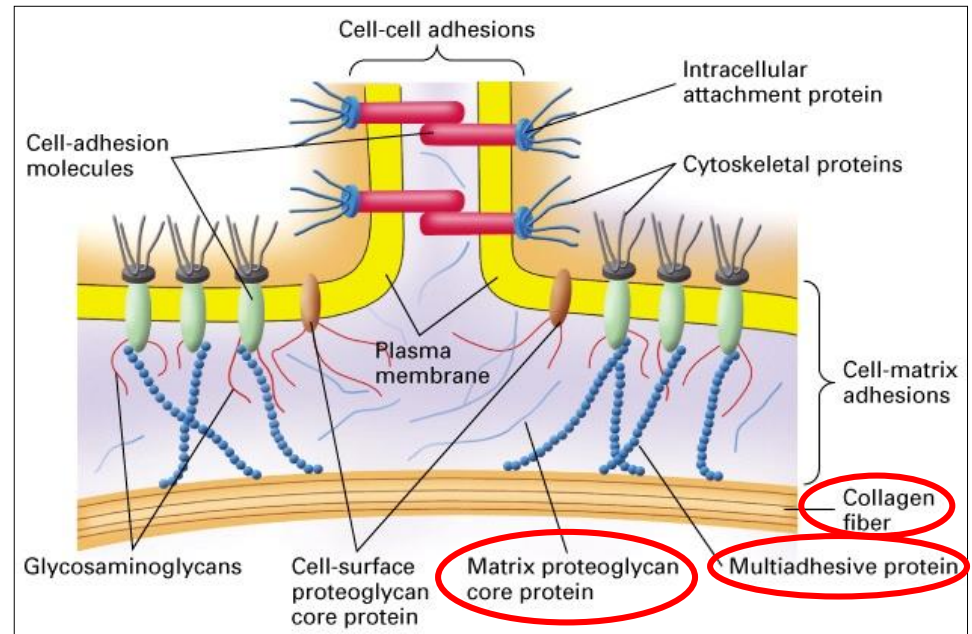
- Organizacija celic v tkiva.
- Koordinacija celičnih funkcij.
- Platforma za migracijo celic.
- Aktivacija signalnih poti za diferenciacijo in delitev celic ter izražanja genov

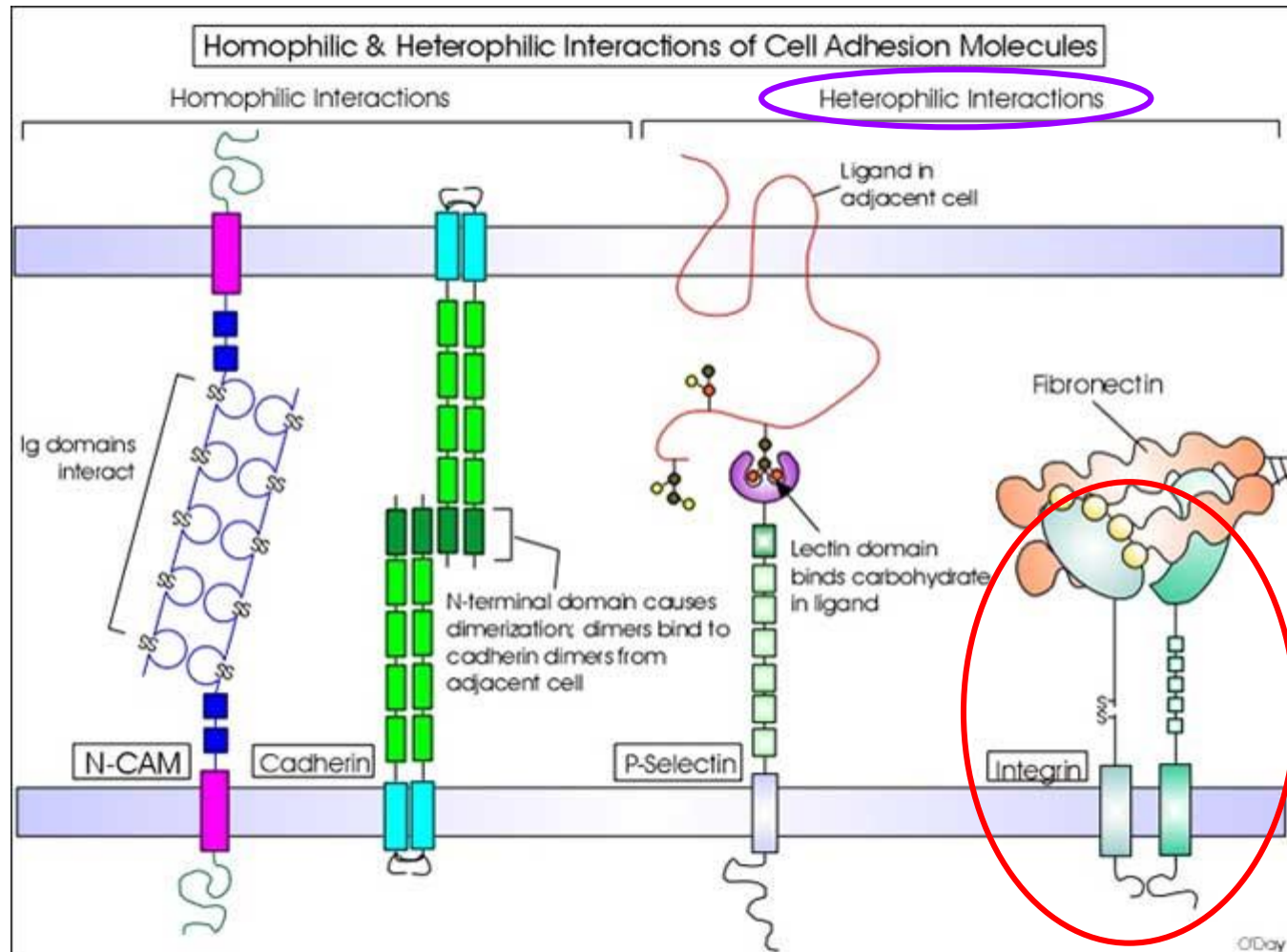
Proteinske sestavine medceličnine

- proteoglikani: viskozni, varujejo celice
- kolagenska vlakna: čvrstost
- multiadhezijski proteini: povezava elementov ECM z receptorji na površini celic

Prijemališča na celicah:

- **integrini**,
- selektini,
- proteoglikani



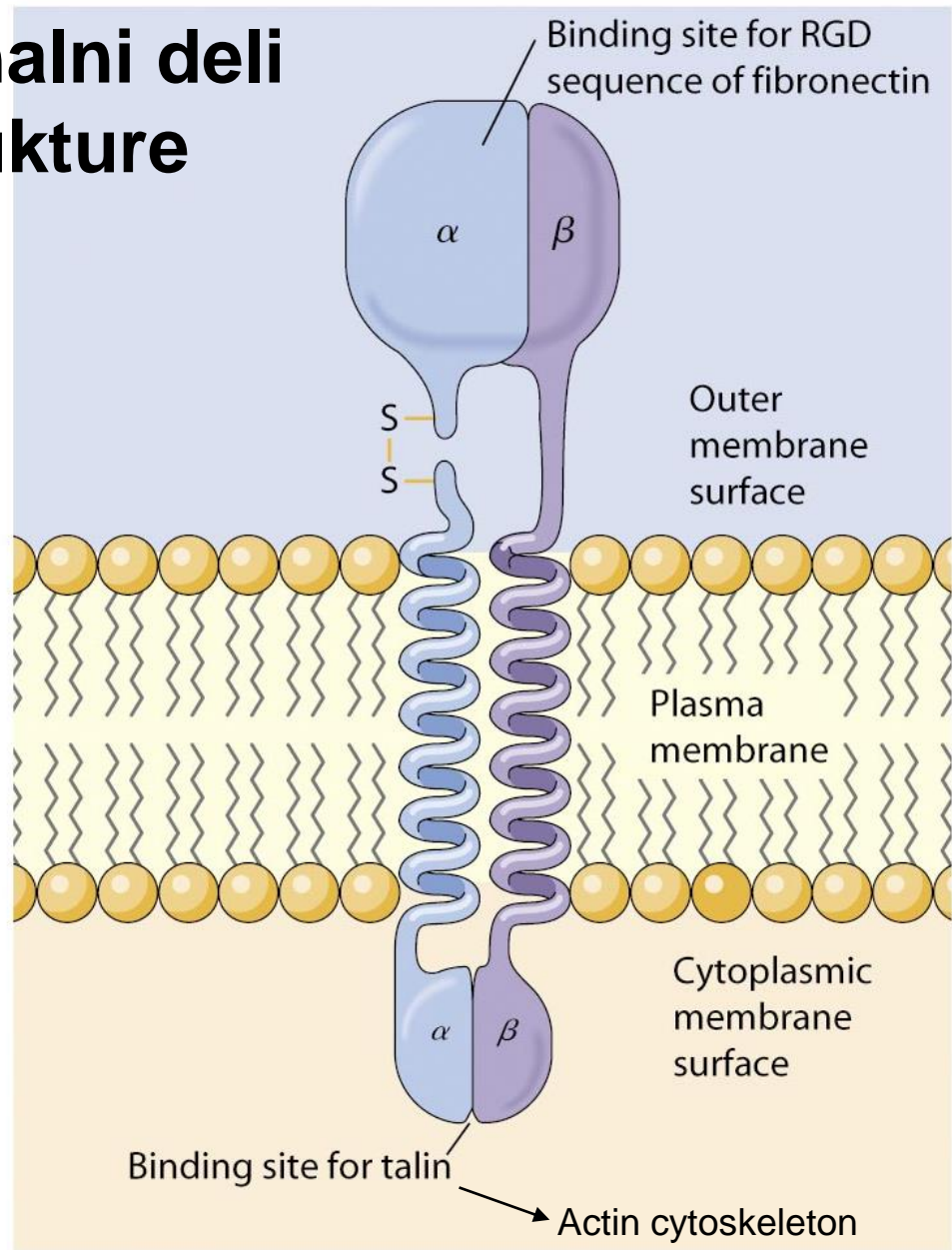
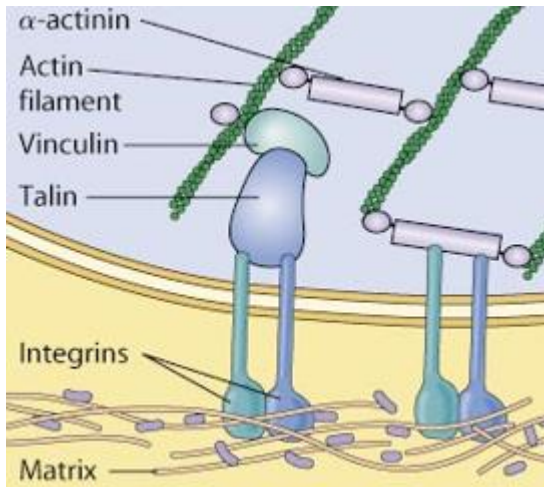


Integrini: $\alpha\beta$ heterodimeri (sesalci: ~24 različnih kombinacij ene od 18 α in ene od 8 β podenot).

Večina celic izraža integrine z različnimi ligand-vezavnimi specifičnostmi.

Tarčne molekule vežejo sorazmerno šibko.

Glavni funkcionalni deli integrinske strukture



Nekateri vretenčarski integrini in njihovi ligandi

Subunits	Ligands
β_1^\dagger	α_1 Collagens, laminin
	α_2 Collagens, laminin
	α_3^\dagger Fibronectin, laminin
	α_4 Fibronectin; VCAM-1
	α_5 Fibronectin
	α_6^\dagger Laminin
	α_7 Laminin
	α_V Fibronectin, vitronectin
β_2	α_L ICAM-1, ICAM-2
	α_M C3b, fibrinogen, factor X; ICAM-1
	α_X Fibrinogen, C3b
β_3^\dagger	α_{IIb} Fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, vitronectin, thrombospondin
	α_V Same as $\beta_3\alpha_{IIb}$; also osteopontin, collagen

**The integrins are grouped in subfamilies sharing a common β subunit. Ligands shown in red are vascular ligands; all others are proteins in the extracellular matrix.*

†These subunits can have multiply spliced isoforms with different cytosolic domains.

Dizintegrini tekmujejo s fiziološkimi ligandi za vezavo na celične integrine

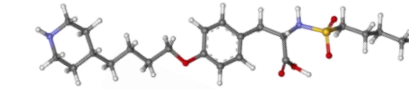
(antitrombotiki: inhibitorji agregacije trombocitov)



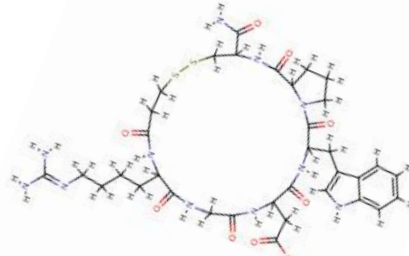
Puščavska pursa ali **efa** (*Echis carinatus*)
Echistatin (RGD-Dis)



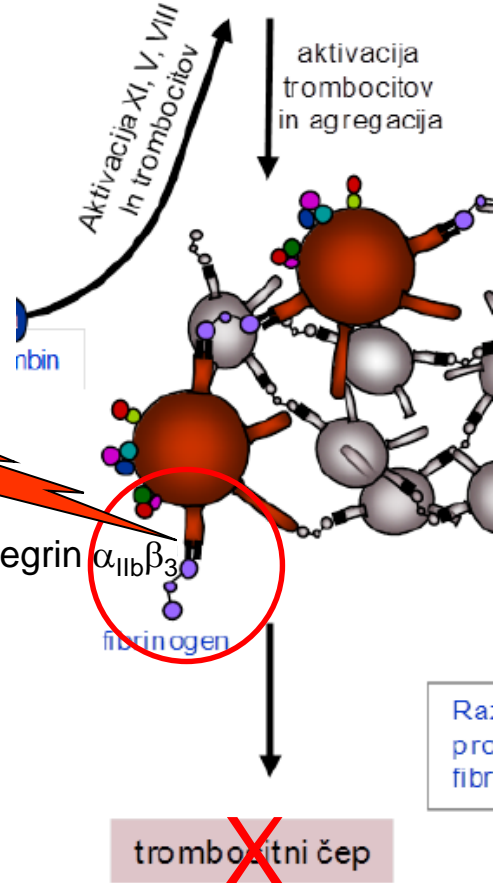
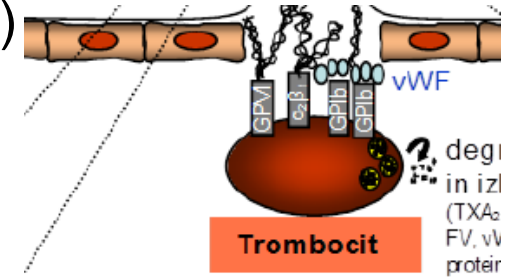
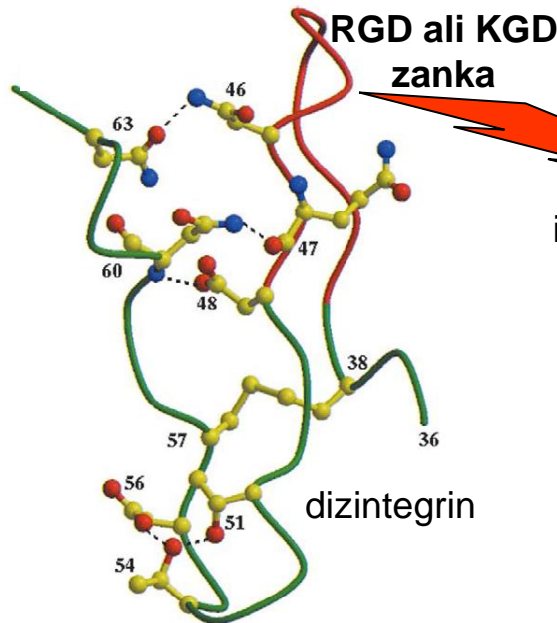
Floridska talna klopotača (*Sistrurus miliarius barbouri*)
Barbourin (KGD-Dis)



Tirofiban (FDA; Aggrastat®)



Eptifibatide (FDA, Integrilin®)

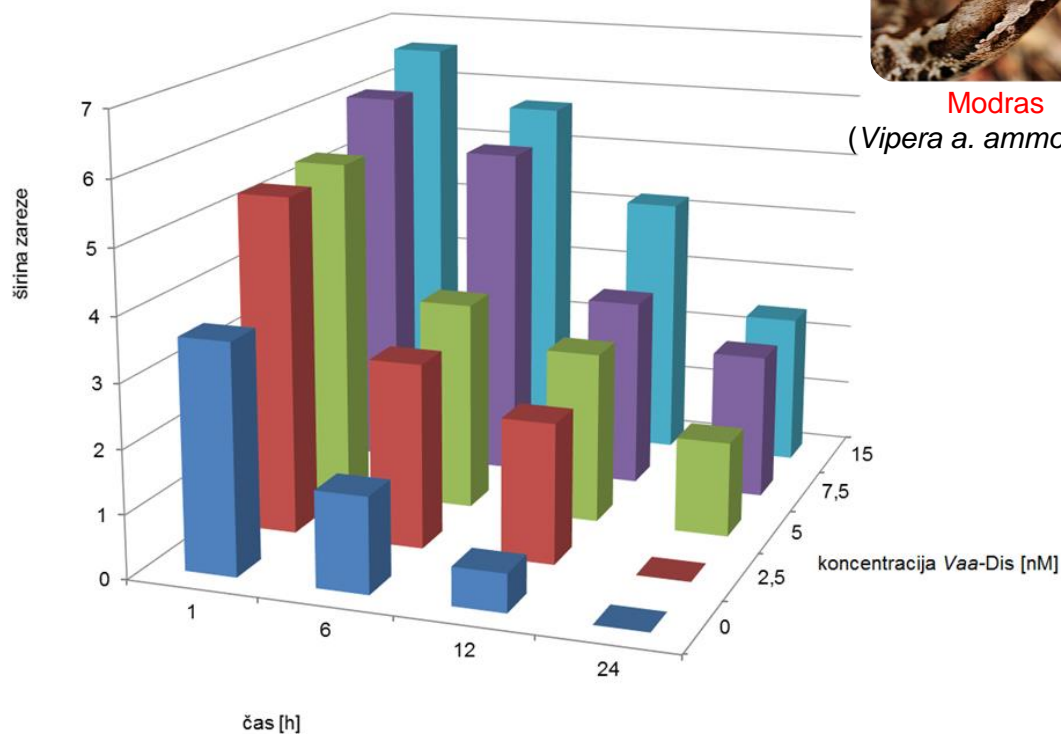
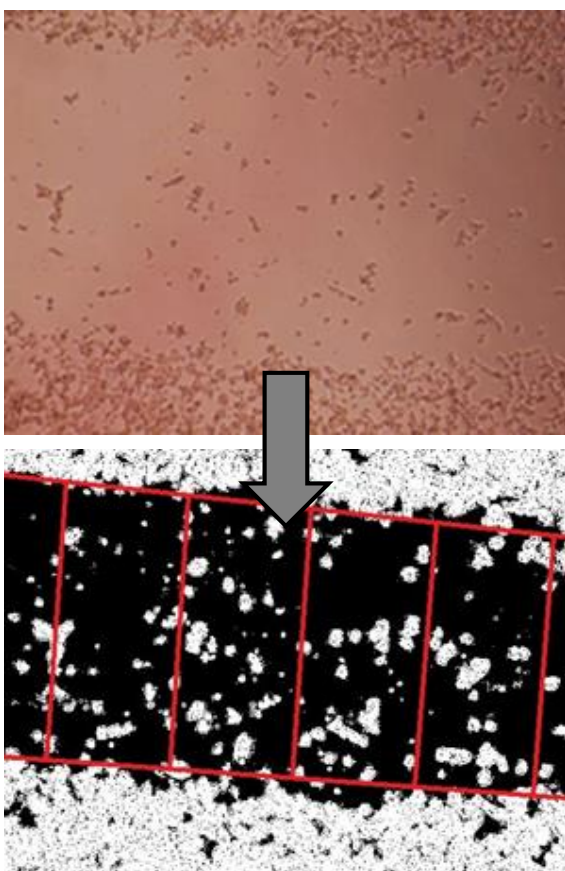


Dizintegrini tekmujejo s fiziološkimi ligandi za vezavo na celične integrine (citostatiki)

Ocena antimetastatskega potenciala Vaa-Dis na celicah raka dojke
MDA-MB-231 s testom celične rane

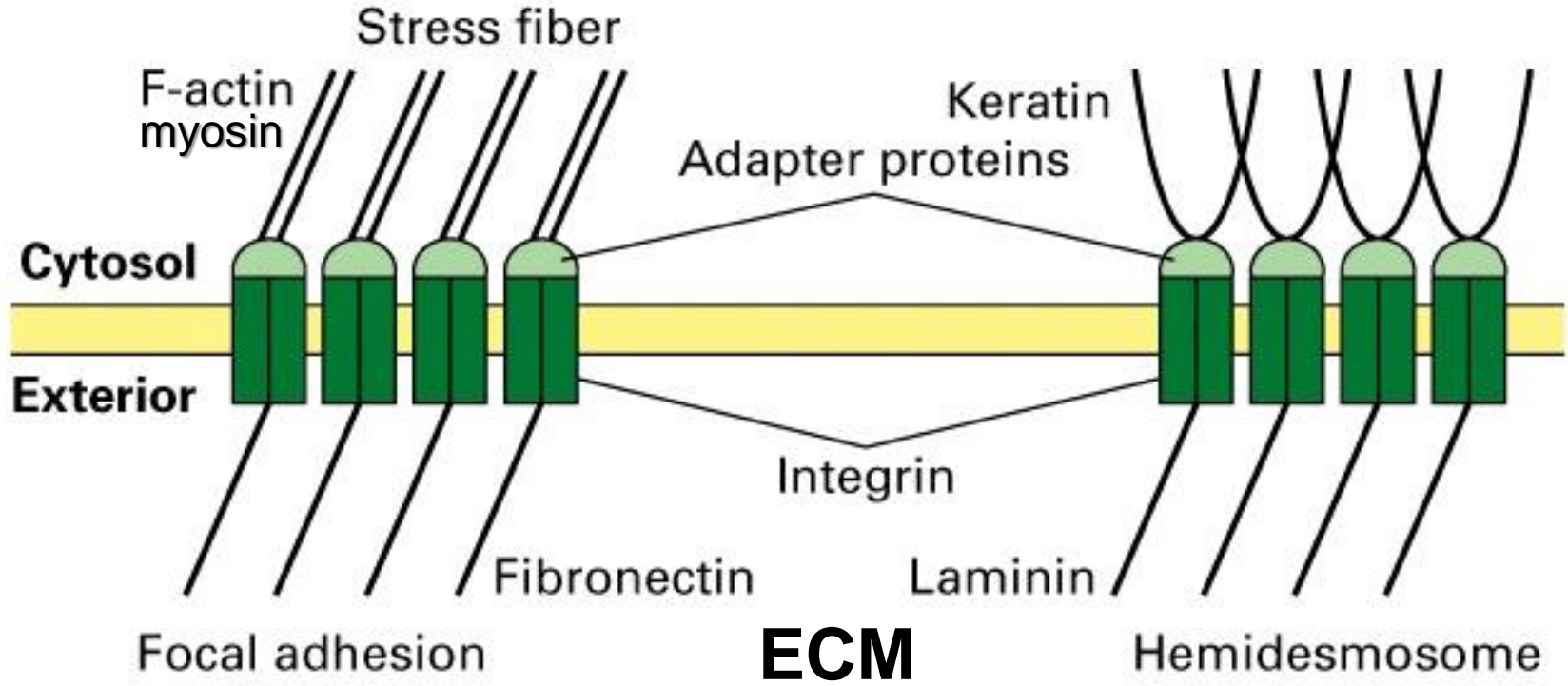


Modras
(*Vipera a. ammodytes*)



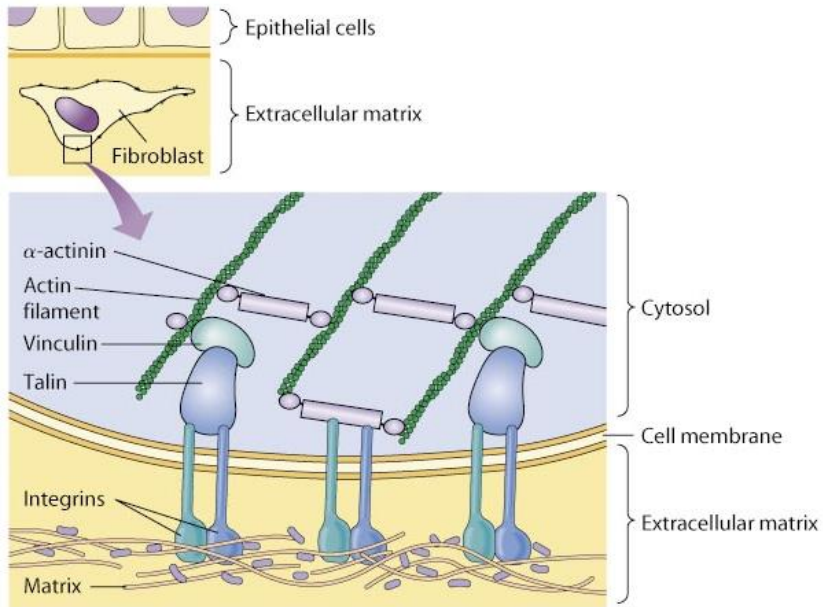
Latinović et al. (2017): Disintegrins from the venom of *Vipera a. ammodytes* efficiently inhibit migration of breast cancer cells. *Acta Chimica Slovenica* 64, 555-559.

Povezave celic z ECM preko integrinov

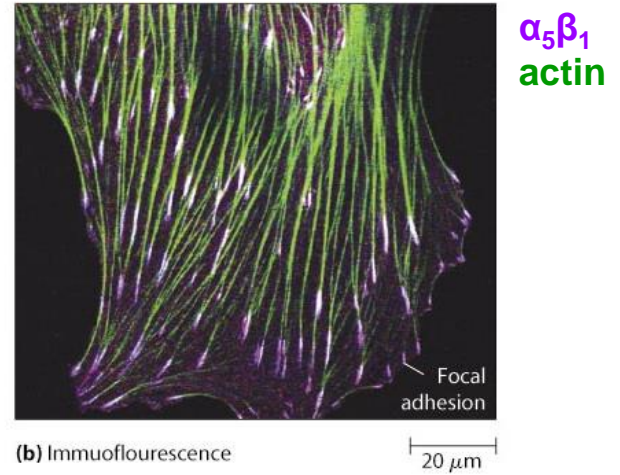


Npr. pri fibroblastih, kožnih keratinocitih in epiteljskih celicah.

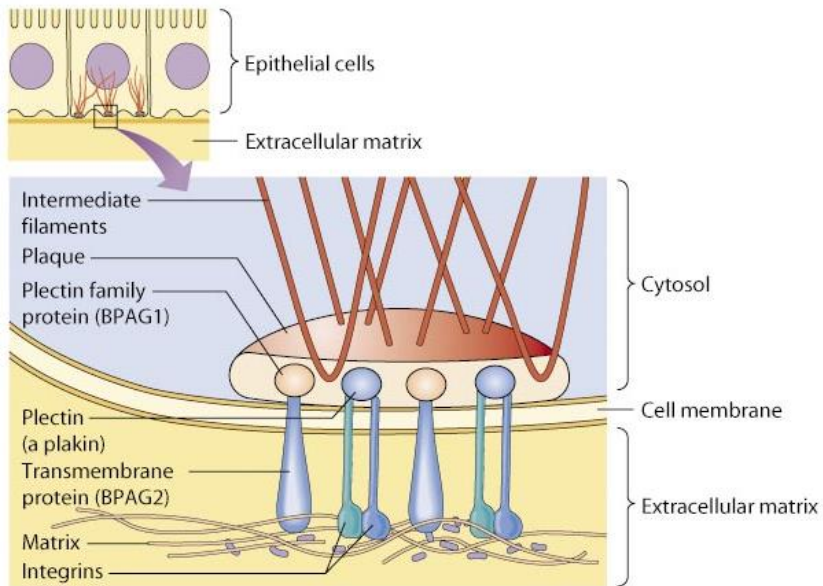
- **Fokalne adhezije** (vzdrževanje oblike celice, prenos mehanskih in drugih regulatornih signalov (za rast, migracijo) z ECM na celico).
- **Hemidezmosomi** (povečanje rigidnosti epitelnega tkiva).



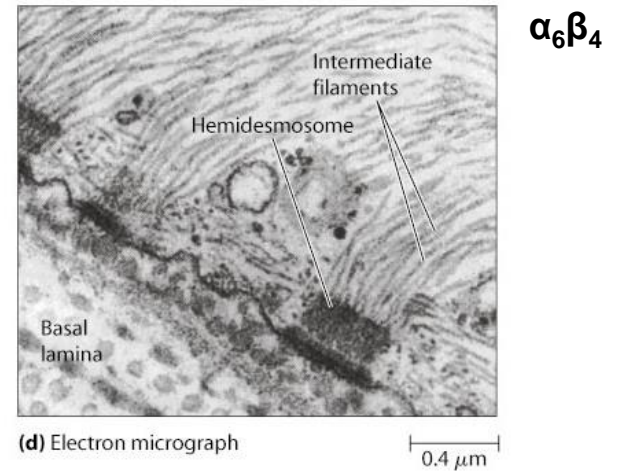
(a) Focal adhesion



(b) Immunofluorescence



(c) Hemidesmosome



(d) Electron micrograph

$\alpha_5\beta_1$
actin

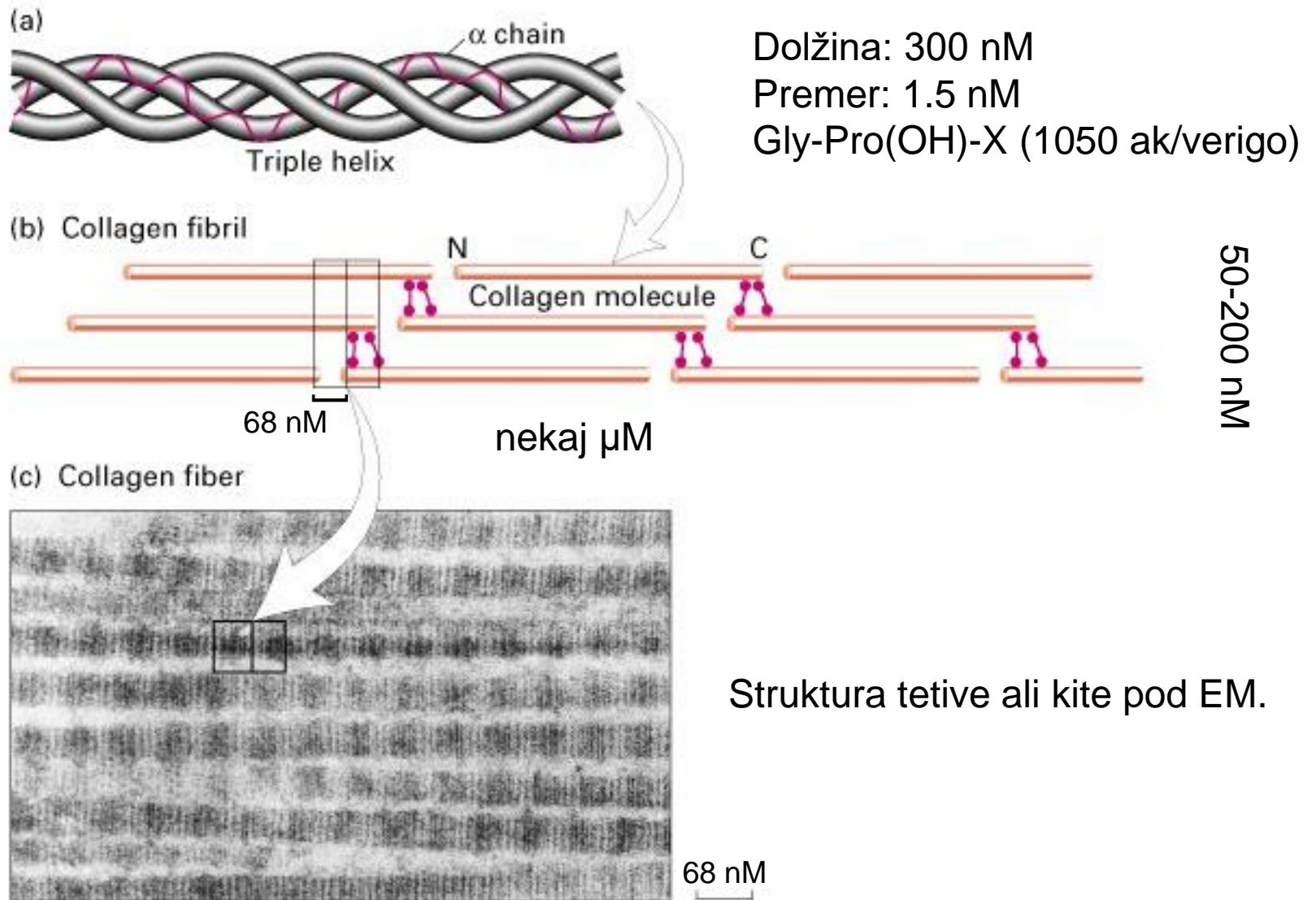
$\alpha_6\beta_4$

Razdelitev poglavja

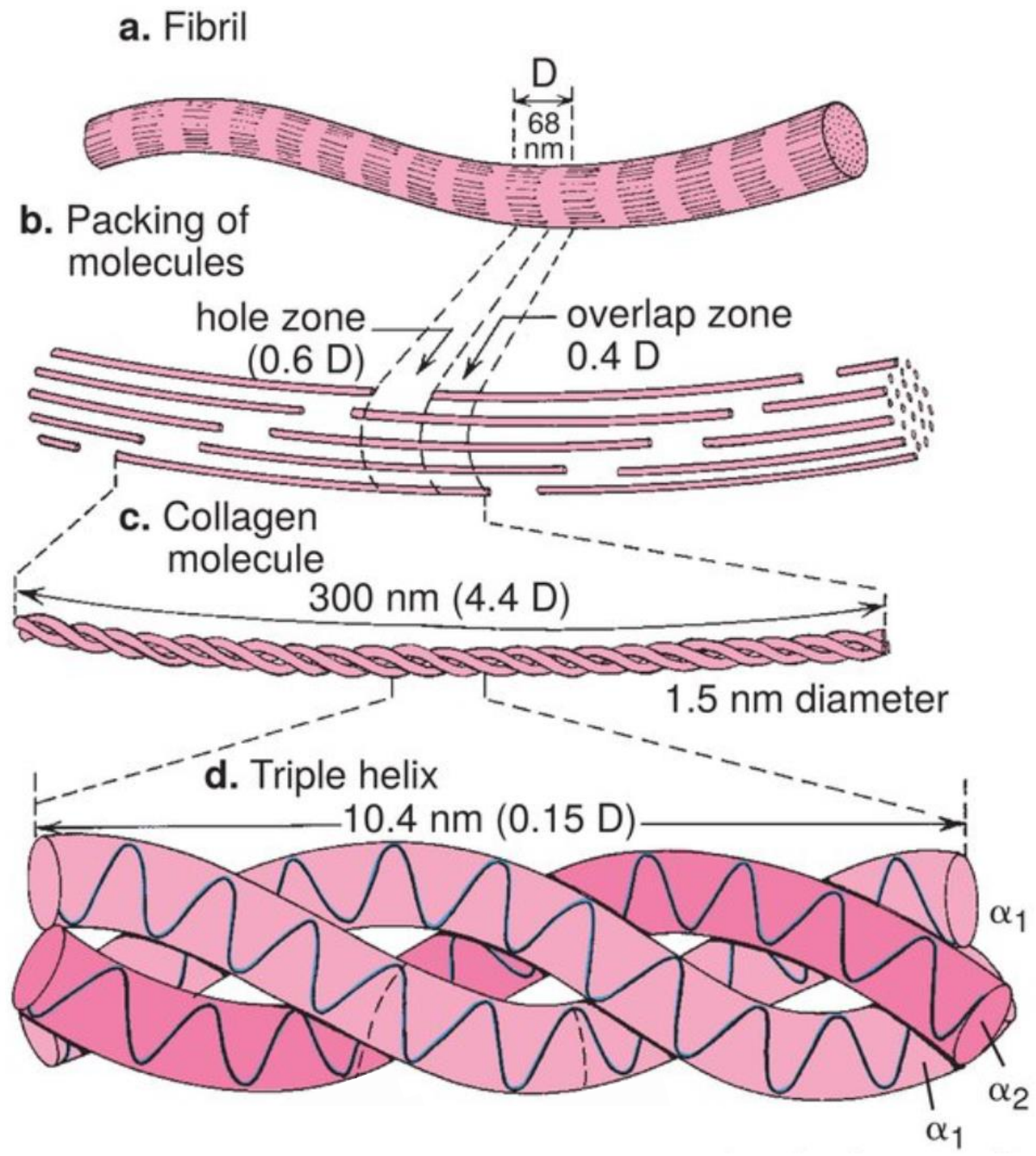
- Pritrjevanje celic in komuniciranje med njimi
- Pritrjevanje celic na medceličnino
- **Kolageni v medceličnini**
- Nekolagenske sestavine medceličnine

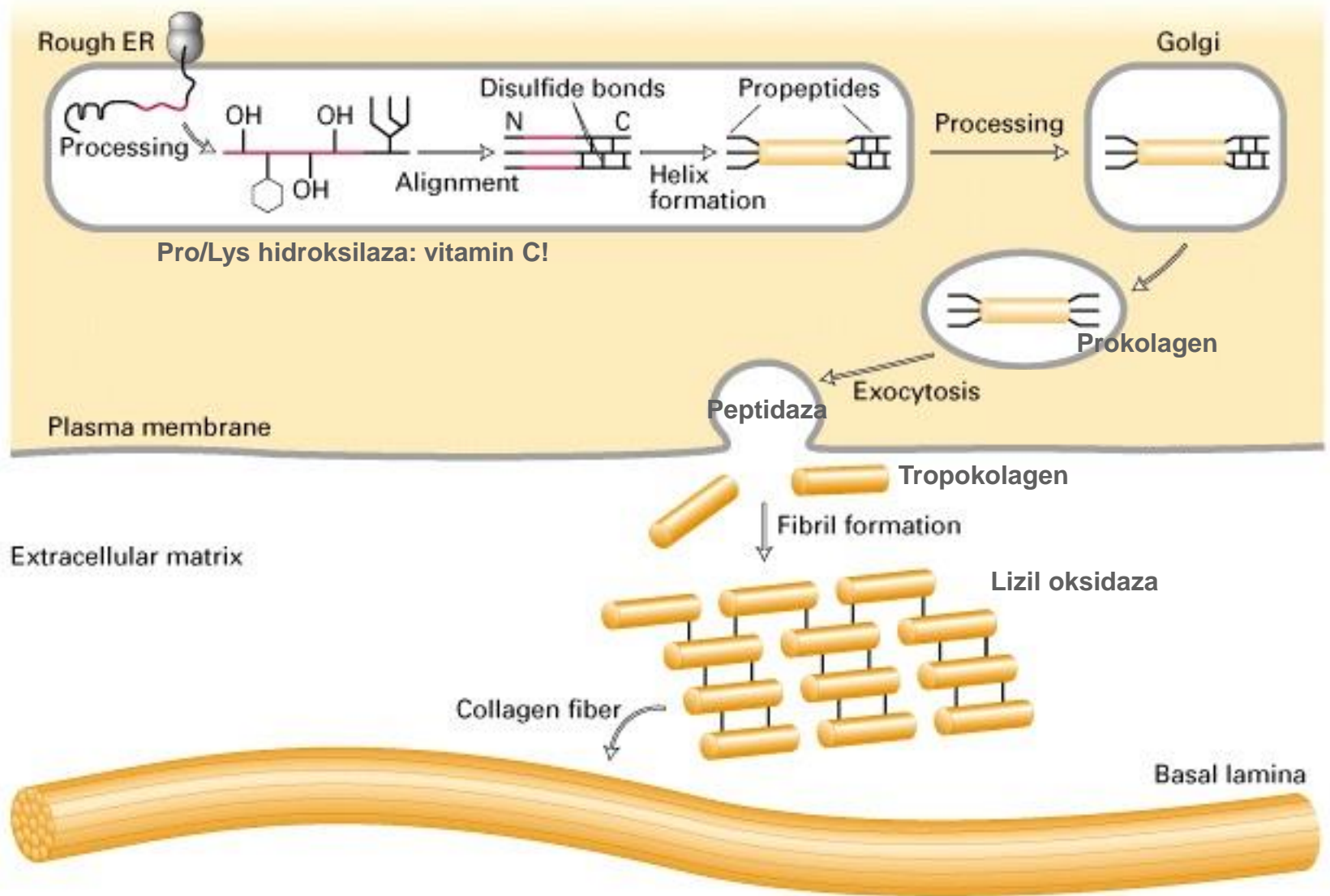
Kolageni

- najpogostejši proteini v živalskem svetu
- izločajo jih fibroblasti in epiteljske celice
- obstaja vsaj 16 tipov kolagenov
- >80% vsega kolagena je tipov I, II in III:
ti tvorijo vlakna; tip IV pa tvori 2D mrežo
- omogočijo odpornost tkiva na natezno silo
- osnovni strukturni element je trojna vijačnica

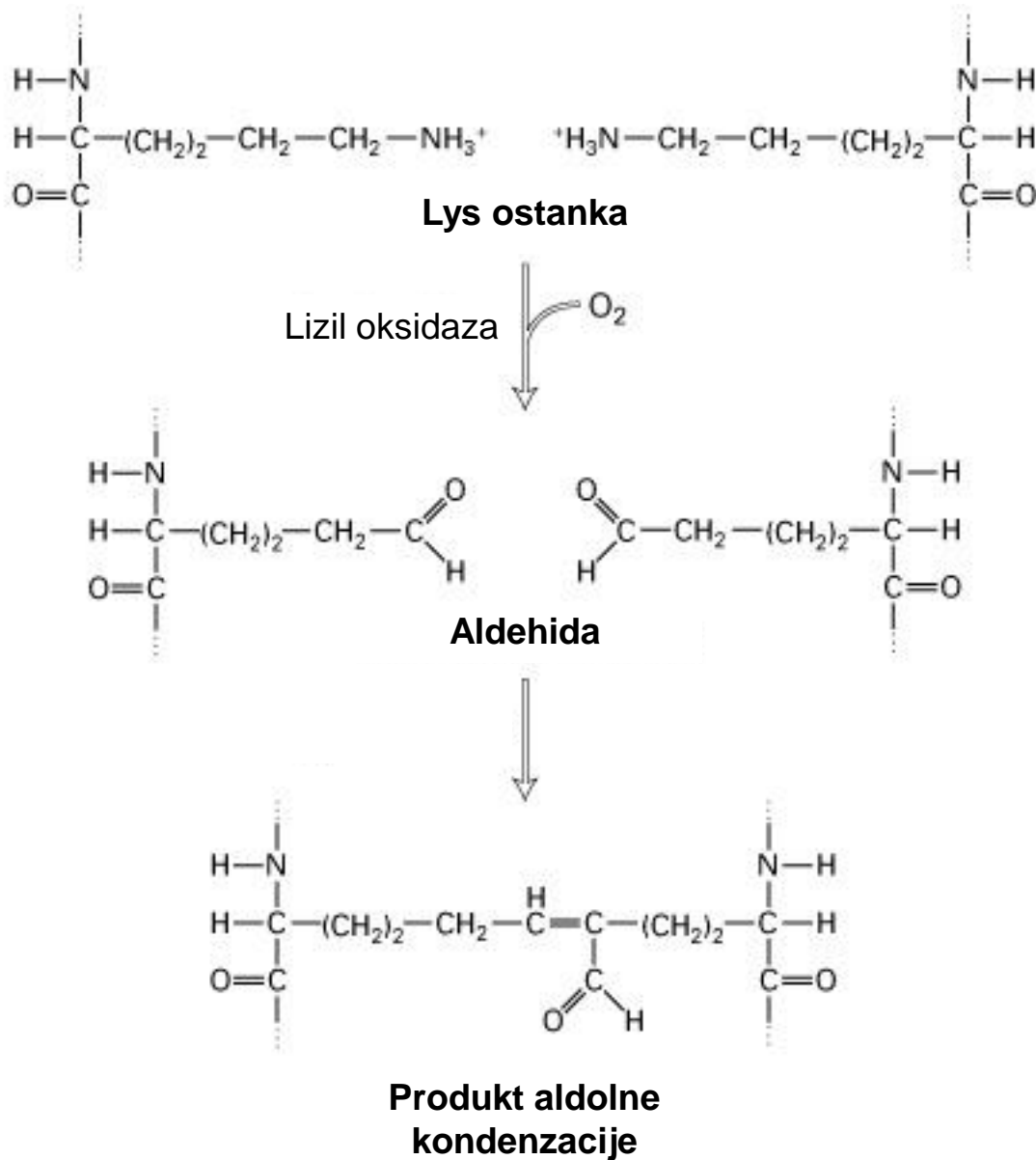


Na mg je kolagensko vlakno tipa I močnejše od jeklenega vlakna!





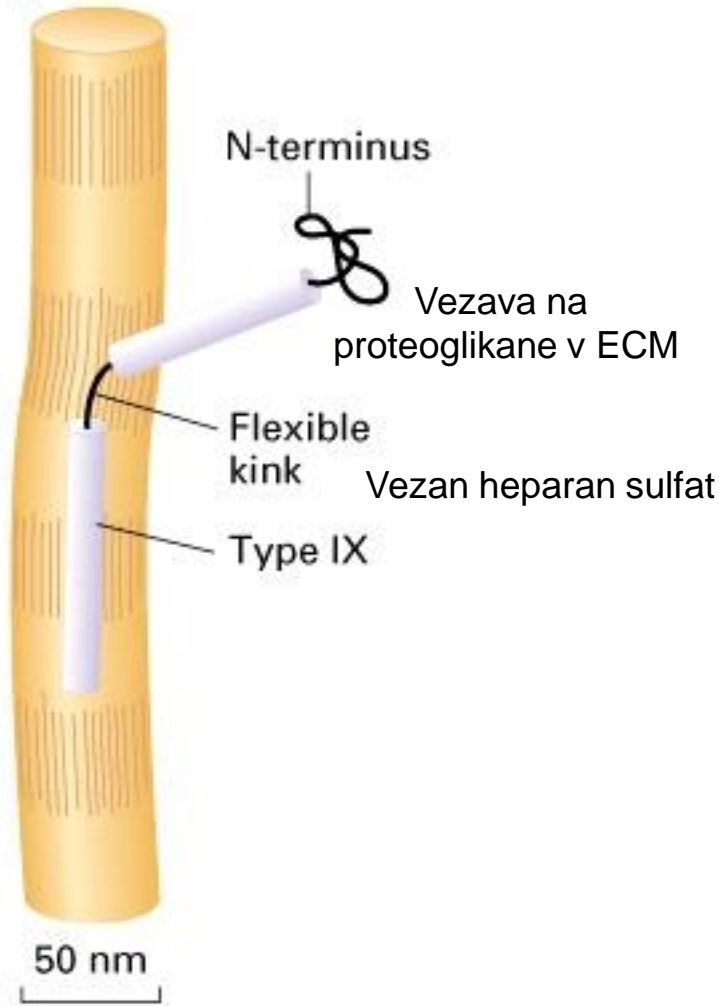
Prečno povezovanje kolagenskih molekul



Glavne kolagenske molekule

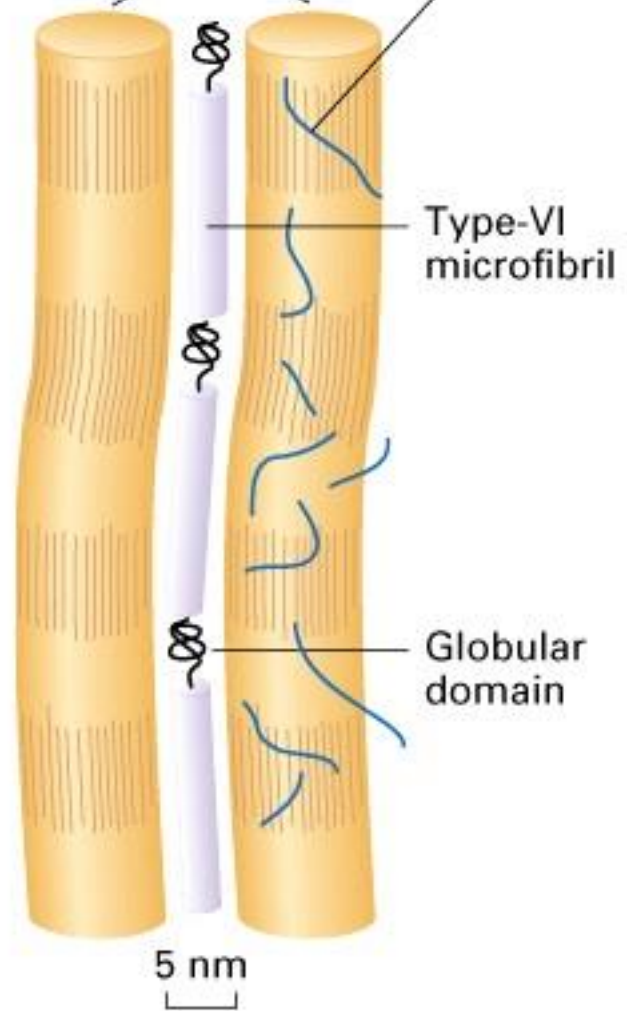
Type	Molecule Composition	Structural Features	Representative Tissues
Fibrillar Collagens			
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$	300-nm-long fibrils	Skin, tendon, bone, ligaments, dentin, interstitial tissues
II	$[\alpha 1(II)]_3$	300-nm-long fibrils	Cartilage, vitreous humor
III	$[\alpha 1(III)]_3$	300-nm-long fibrils; often with type I	Skin, muscle, blood vessels
V	$[\alpha 1(V)]_3$	390-nm-long fibrils with globular N-terminal domain; often with type I	Similar to type I; also cell cultures, fetal tissues
Fibril-Associated Collagens			
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)]$	Lateral association with type I; periodic globular domains	Most interstitial tissues
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	Lateral association with type II; N-terminal globular domain; bound glycosaminoglycan	Cartilage, vitreous humor;
Sheet-Forming Collagens			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	Two-dimensional network	All basal laminae

Type-II fibril

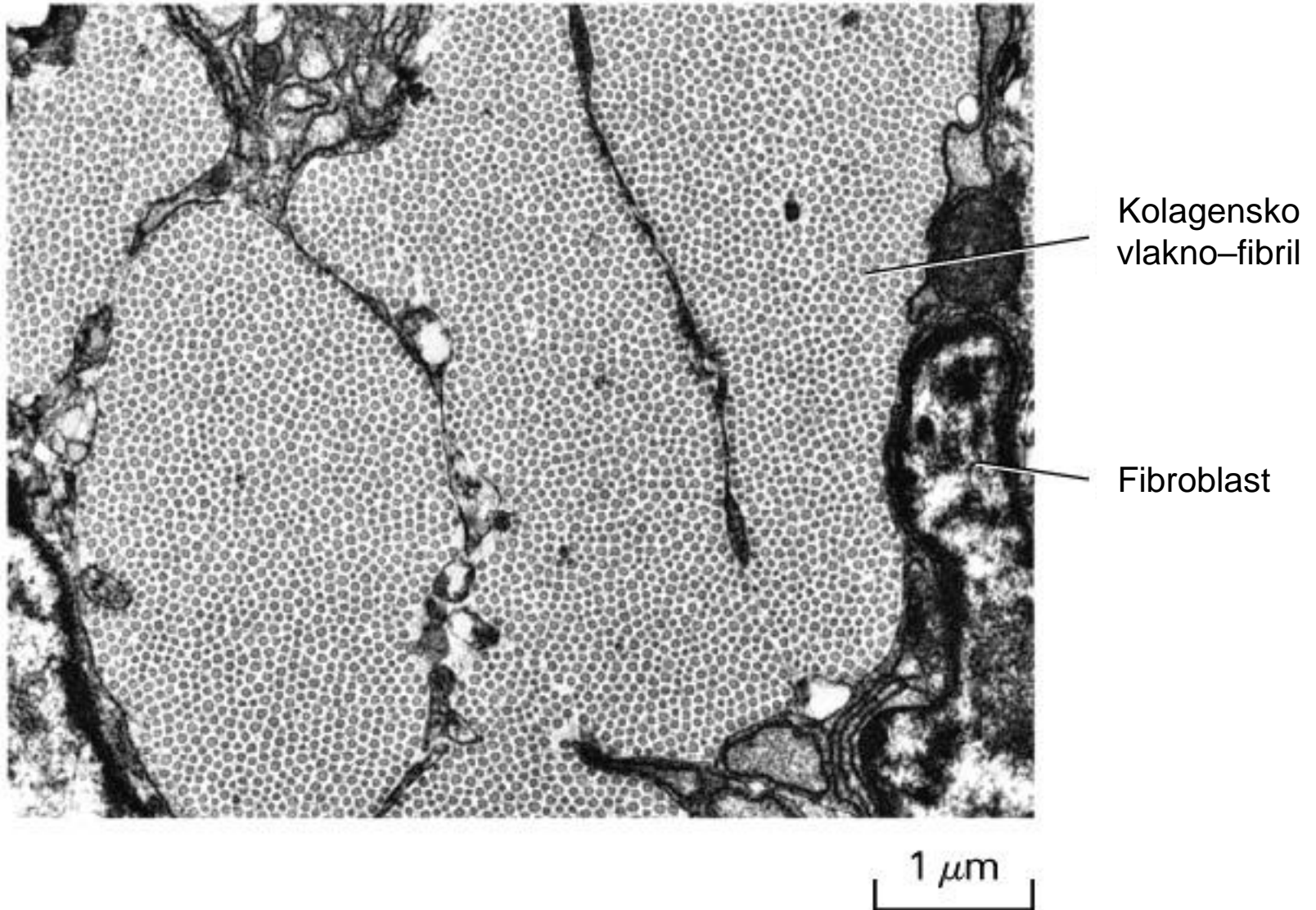


Glavna kolagenska sestavina hrustanca.
Odpornost proti večjim deformacijam oblike.

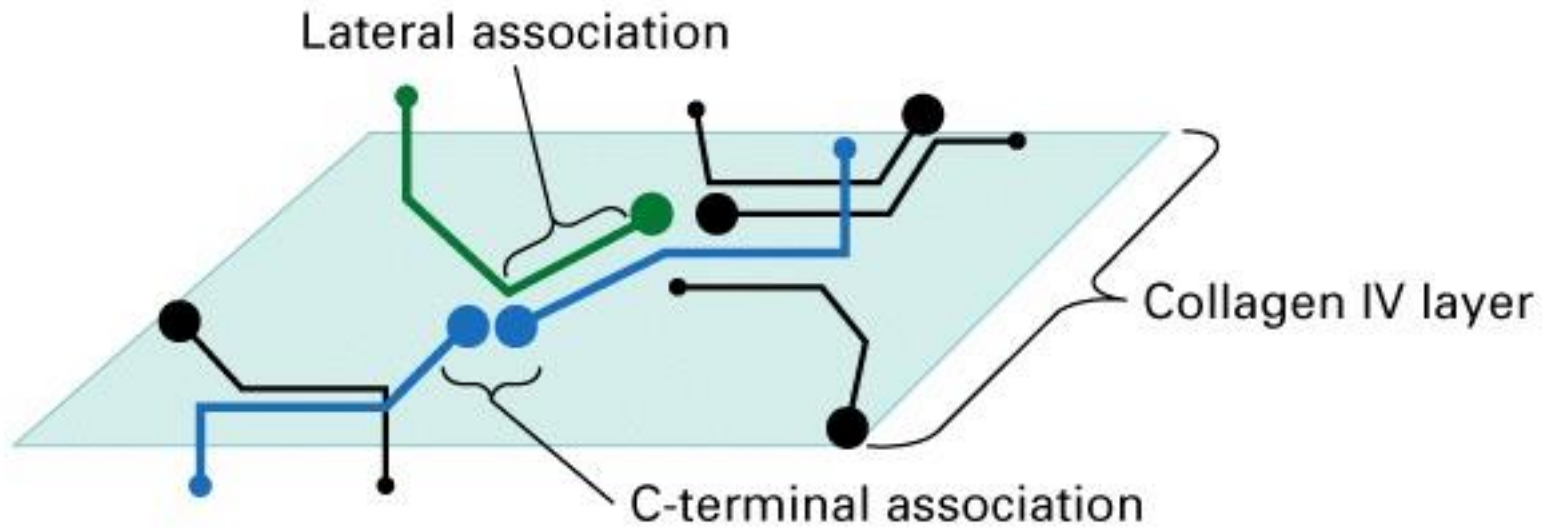
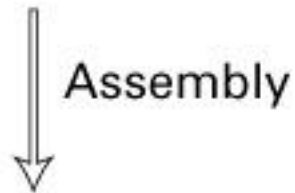
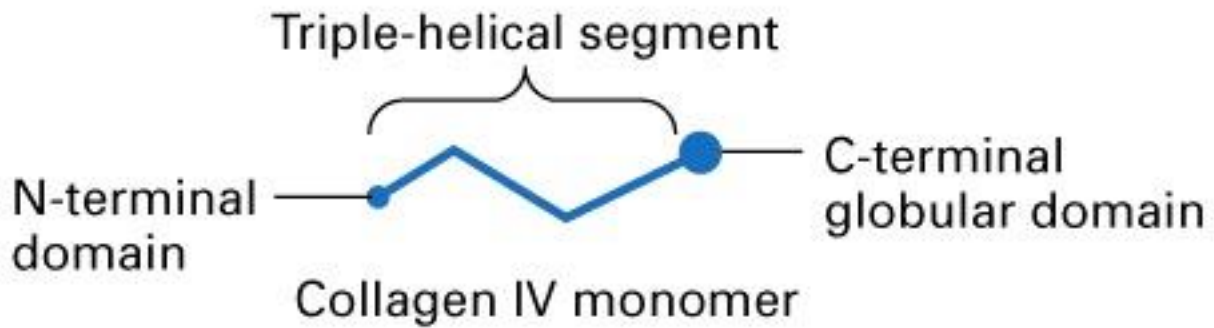
Type-I fibril Proteoglycan



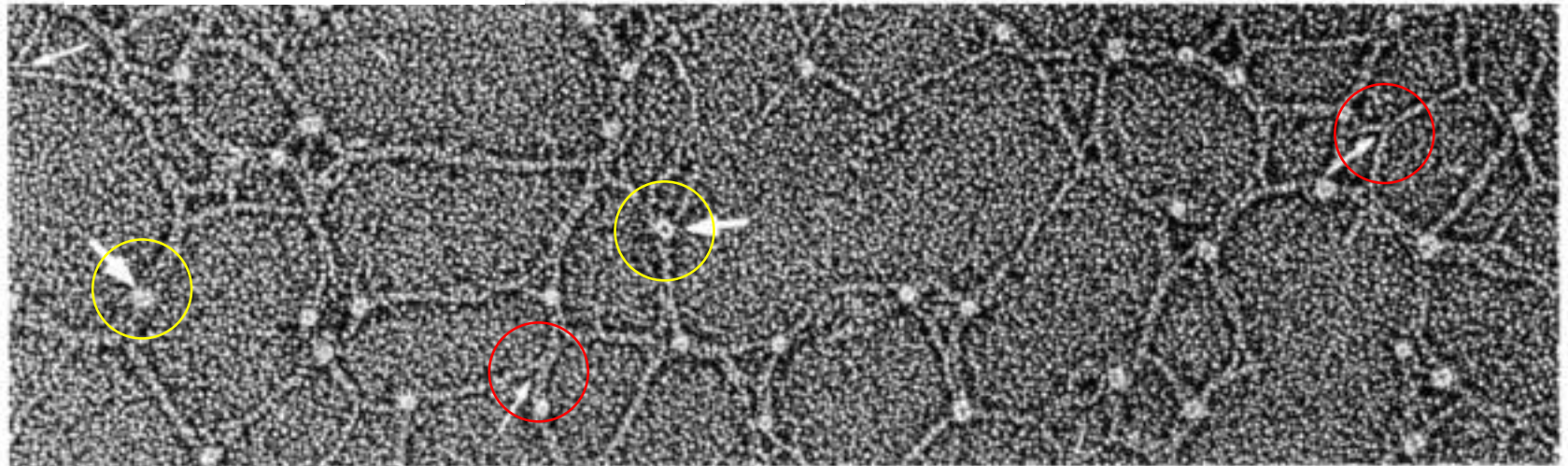
Bolj debela kolagenska vlakna
v tetivi oz. kiti.



Prerez skozi kito: zgrajena je pretežno iz kolagenskih vlaken (fibrilov), ki jih sestavljajo molekule kolagena tipa I.



Dvodimenzionalna mreža kolagena tipa IV ...

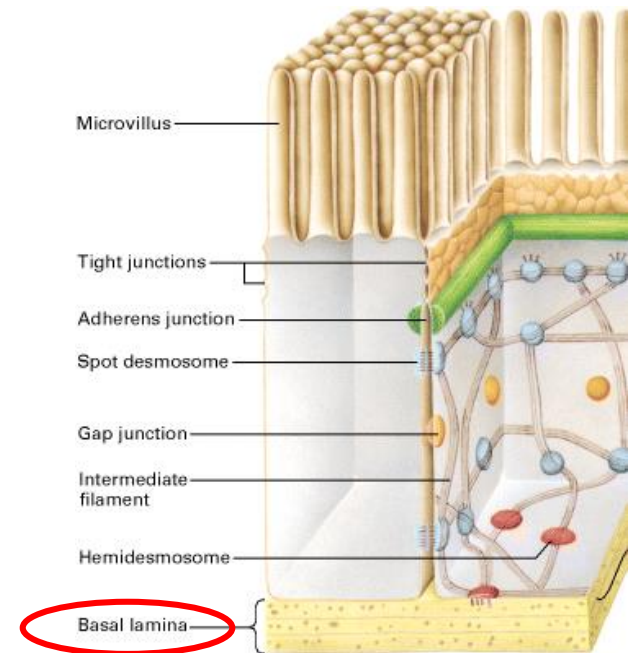


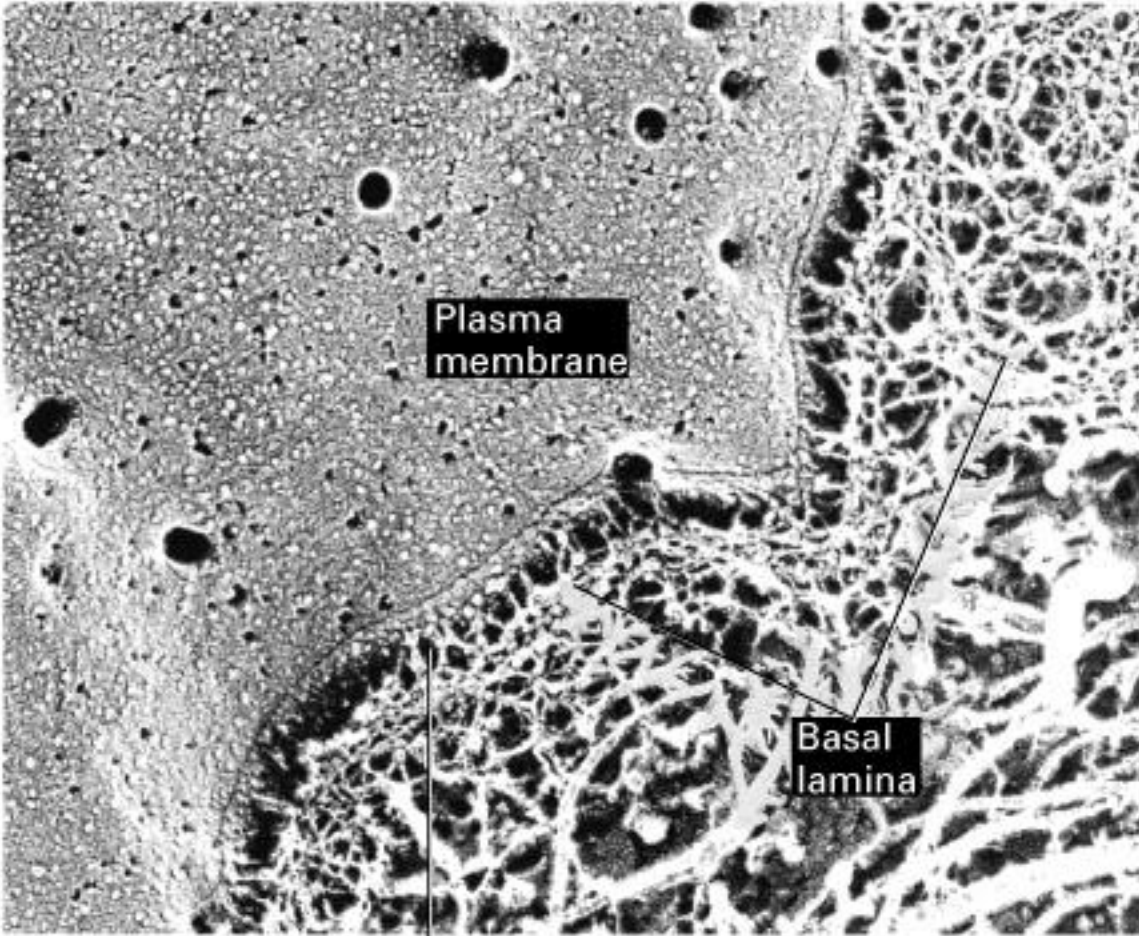
250 nm

... je osnova za tvorbo strukture – BAZALNE LAMINE

Bazalna lamina

- 60 nm – 100 nm debela plošča
- sestavljena iz komponent ECM
- večinski komponenti sta kolagen IV in laminin
- organizira celice v tkiva (podlaga za epitelijske in endotelijske celice, obkroža mišične celice in adipocite)
- omogoča migracijo celic (razvoj in vzdrževanje organizma)



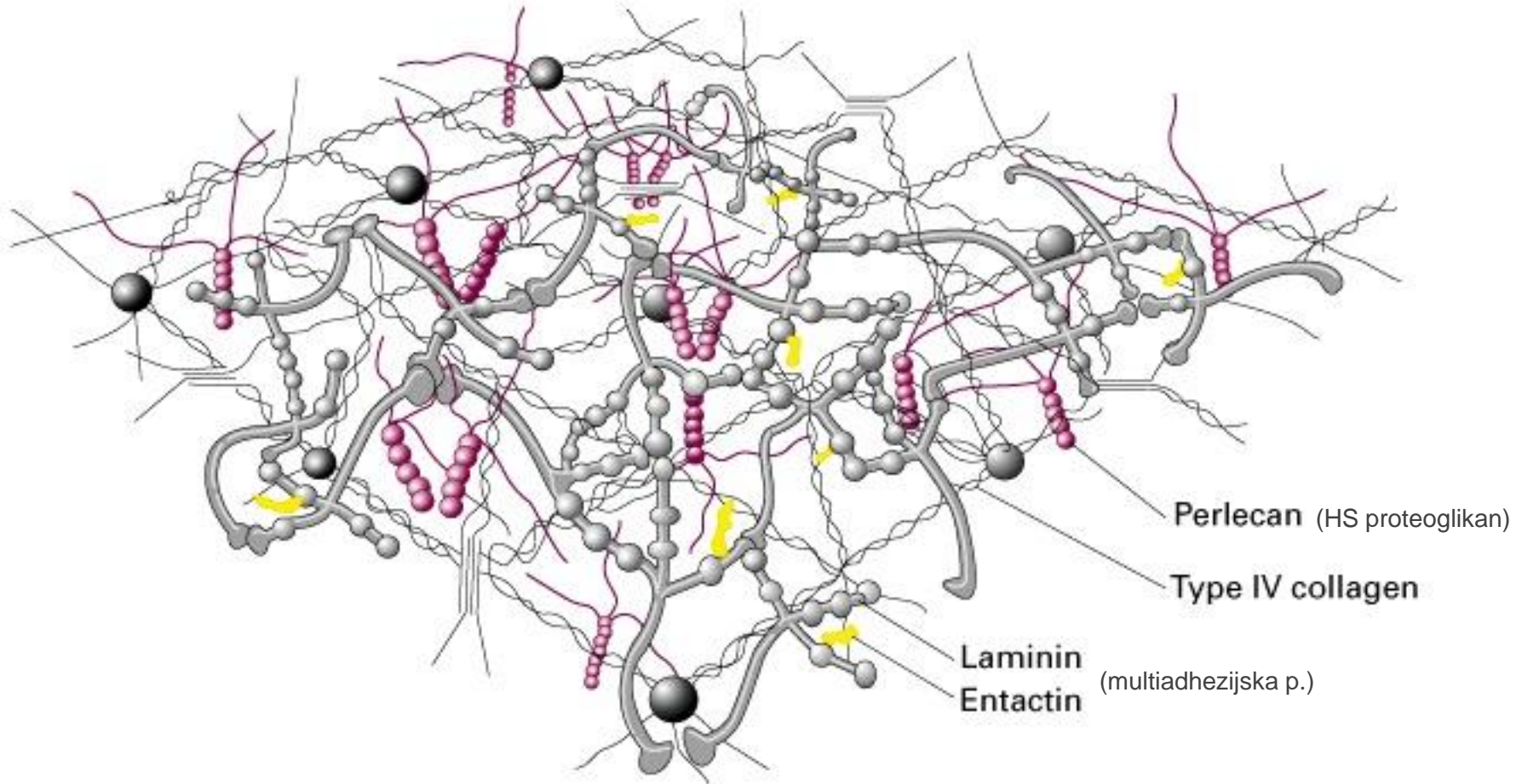


Plasma membrane

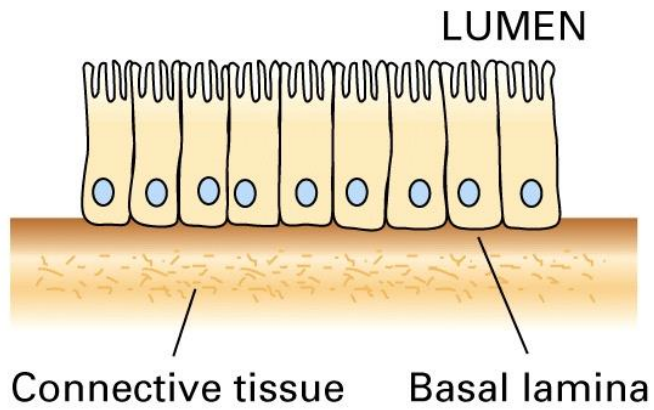
Basal lamina

Cell-surface receptor proteins

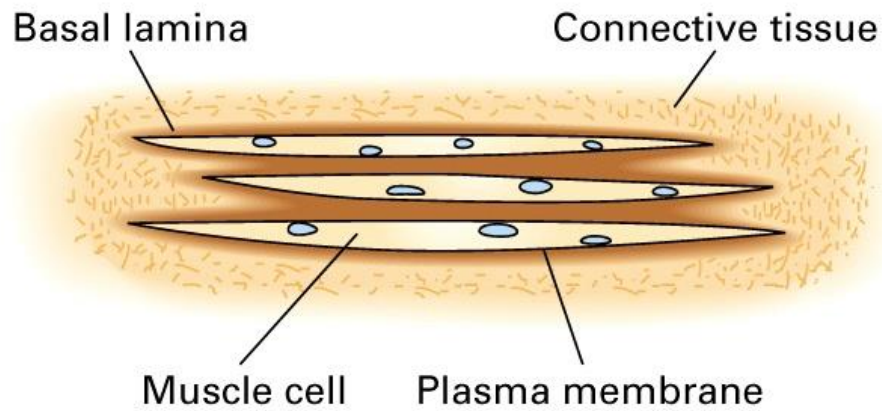
Collagen fibers



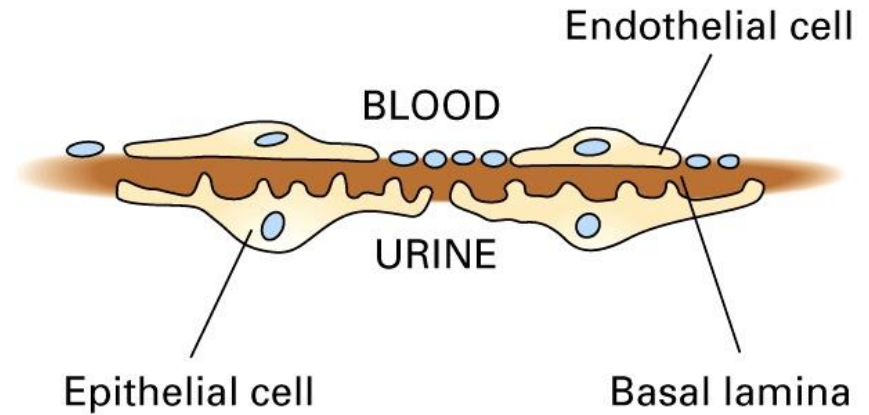
(a) Epithelial sheet



(b) Muscle



(c) Kidney glomerulus



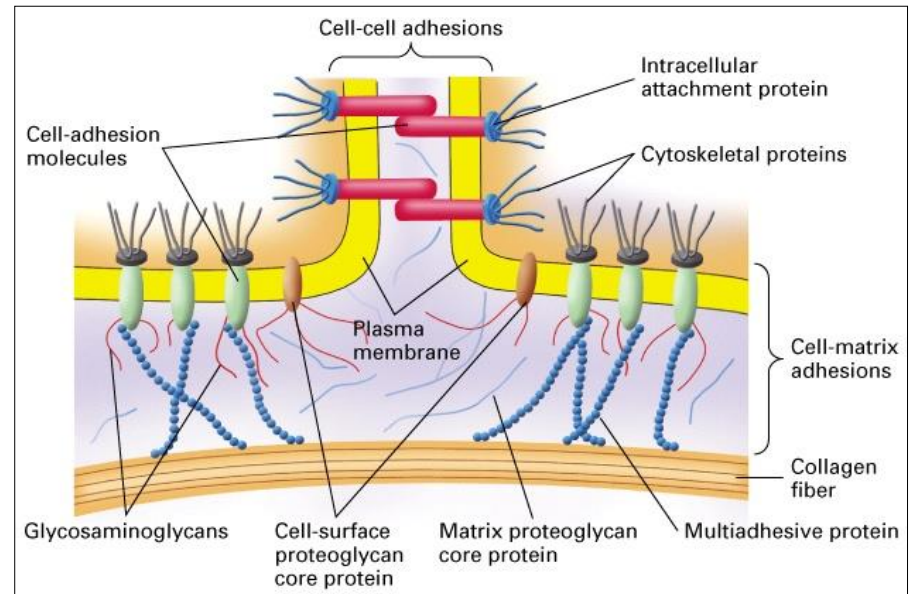
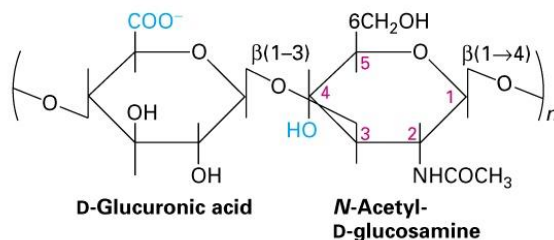
Razdelitev poglavja

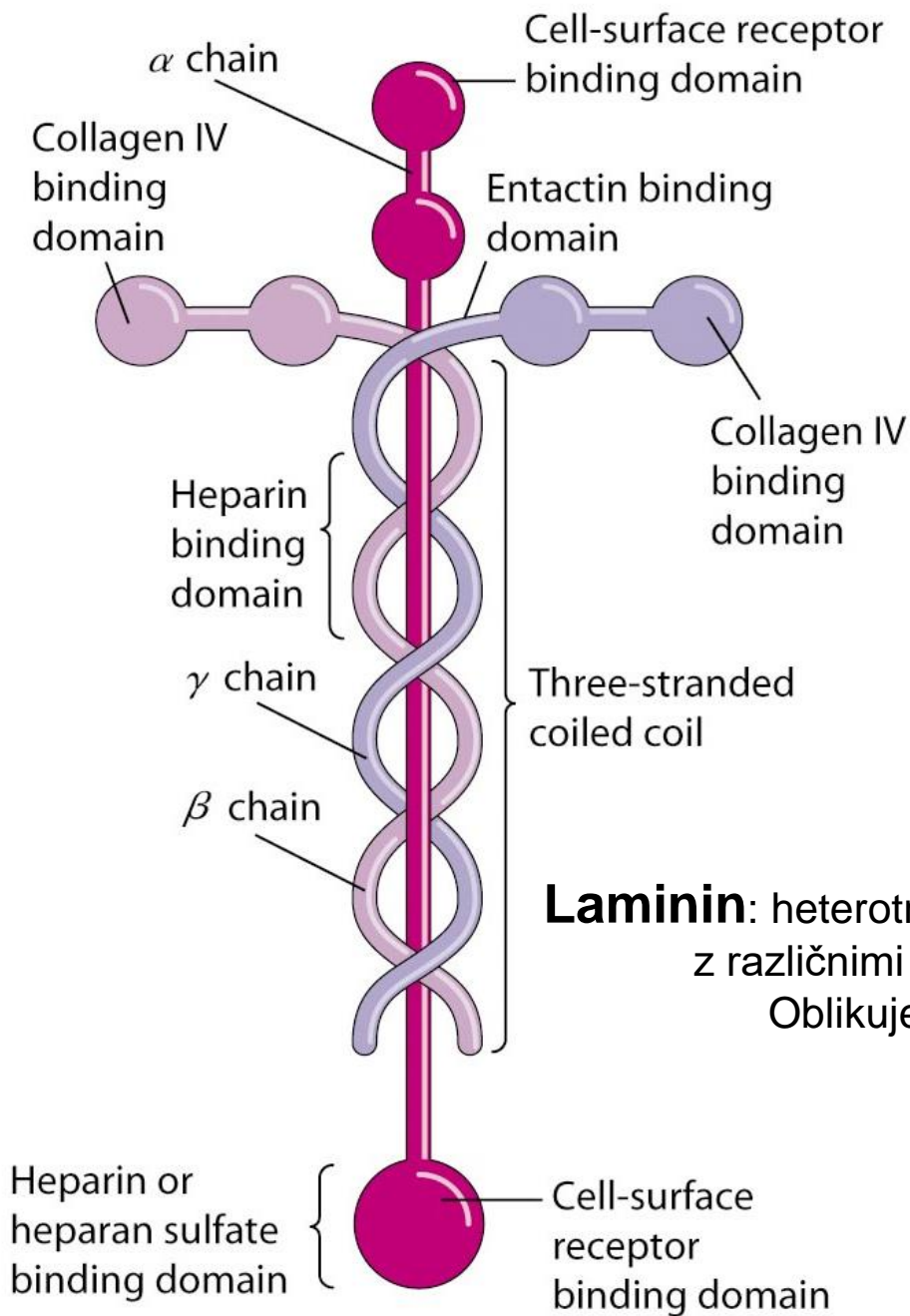
- Pritrjevanje celic in komuniciranje med njimi
- Pritrjevanje celic na medceličnino
- Kolageni v medceličnini
- **Nekolagenske sestavine medceličnine**

Nekolagenske sestavine medceličnine

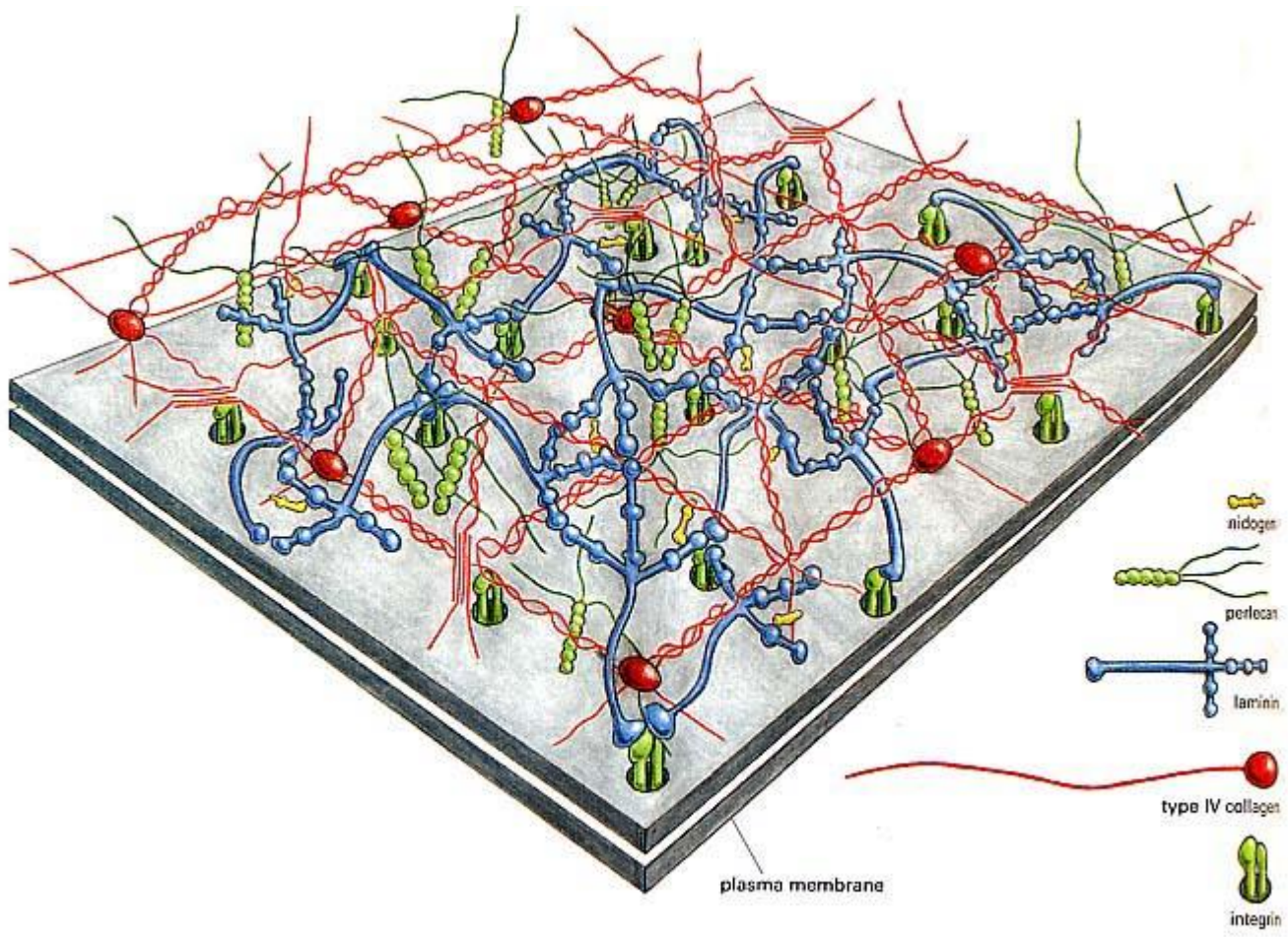
- **Multiadhezijski proteini:** povezujejo komponente ECM, ECM in celice (preko CAM) ter vežejo različne molekule (hormone, rastne faktorje, hranila).
- **Proteoglikani:** viskozni, varujejo celice, ustvarjajo volumen.
- **Hialuronan:** polisaharid, ki se hidratizira v gel (prožnost, amortizacija, odpornost na deformacijo).

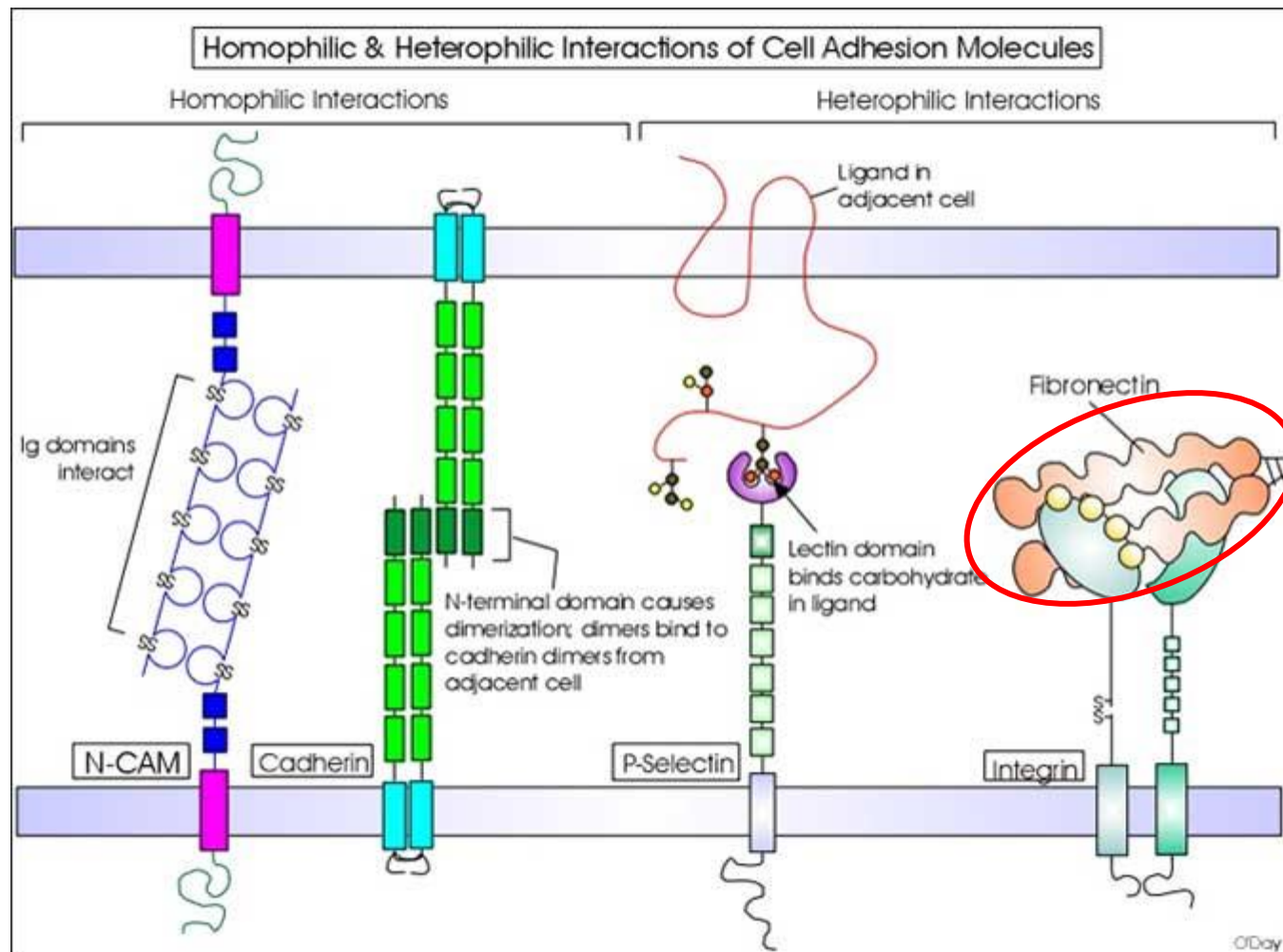
(a) Hyaluron ($n \leq 50,000$)





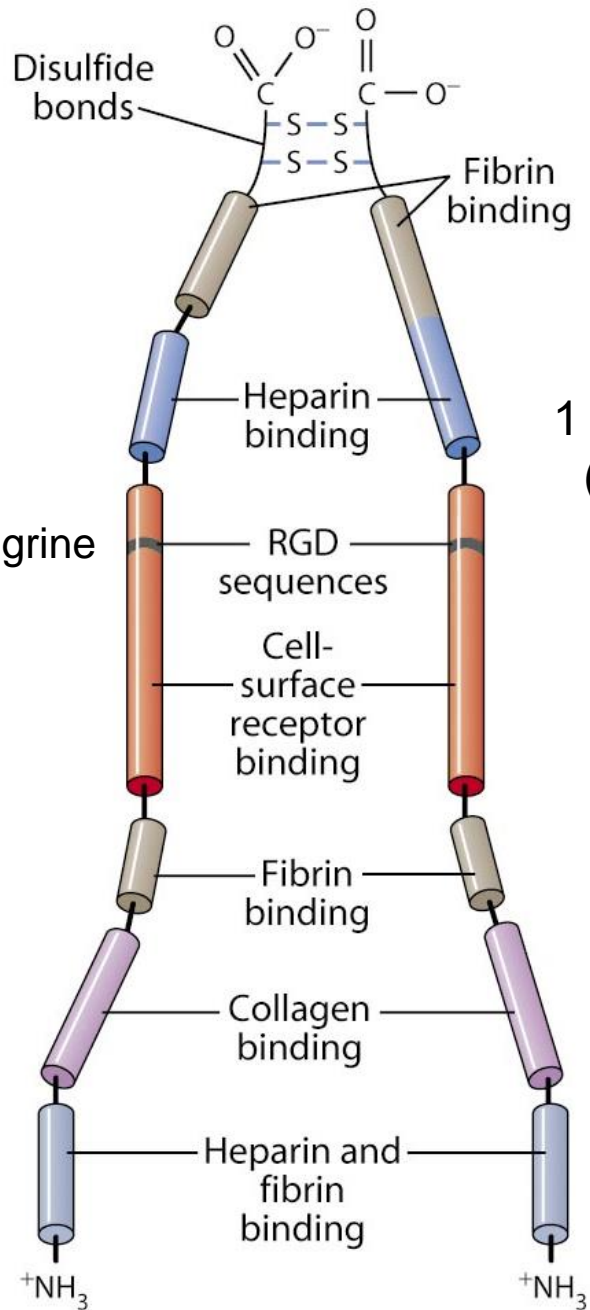
Laminin: heterotrimer, M~820 kDa; izo-oblike z različnimi verigami α (A), β (B) in γ (C). Oblikujejo mrežast preplet z drugimi sestavinami bazalne lamine.



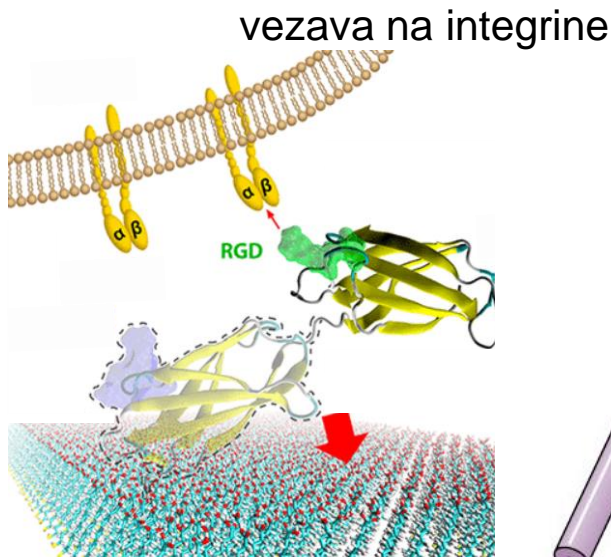


Fibronektin: multiadhezijski protein, s primarno funkcijo povezovanja celic z vlaknastimi kolageni (I, II, III, V). Uravnava organiziranost celičnega skeleta (oblika celice), migracijo in diferenciacijo celic (npr. potovanje imunskih celic na mesto poškodbe, embriogeneza), ...

Fibronektin

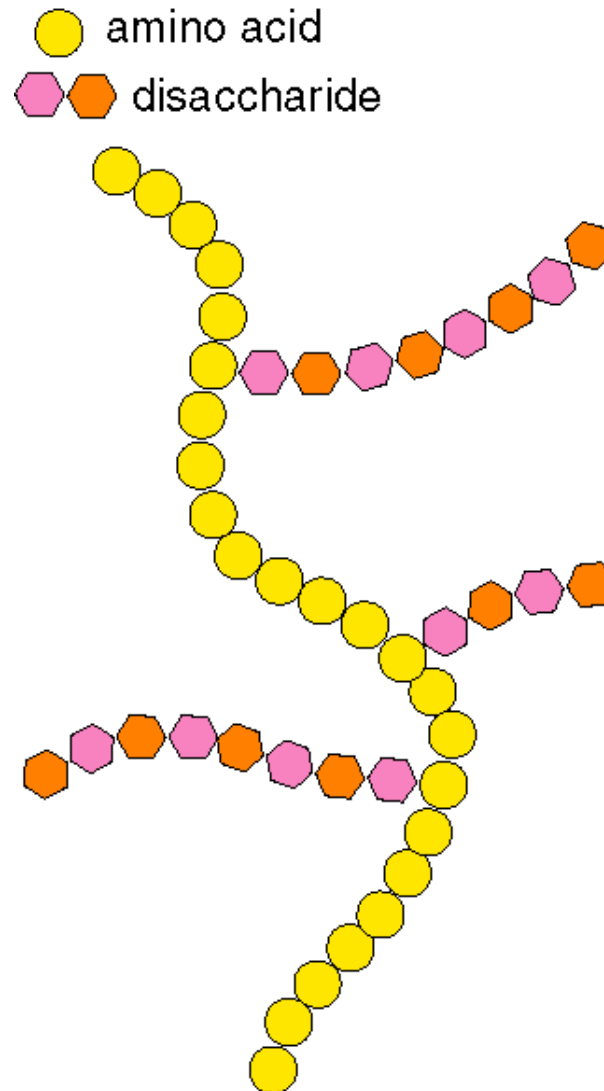


1 gen, vsaj 20 različnih produktov
(alternativno izrezovanje RNA)



Proteoglikani

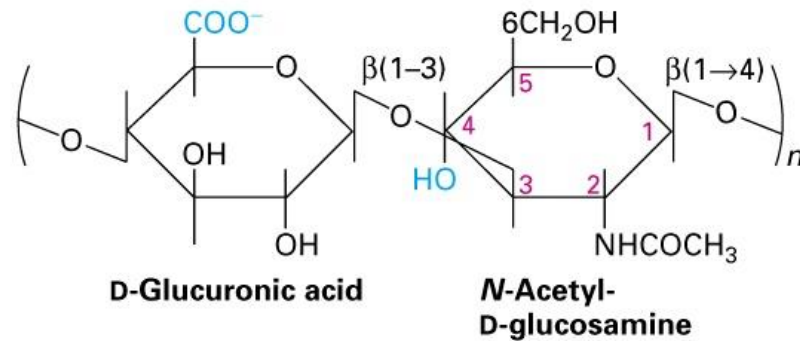
perlecan
agrekan
sindekan



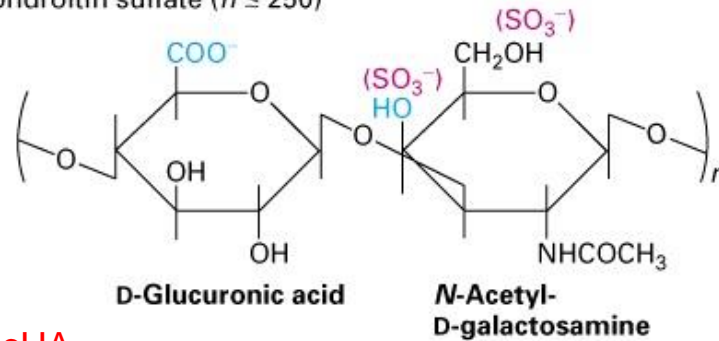
Zgradba proteoglikanov: delež aminokislin je majhen, prevladujejo linearni polimeri disaharidov – glikozaminoglikani (GAG).

Štirje razredi GAG

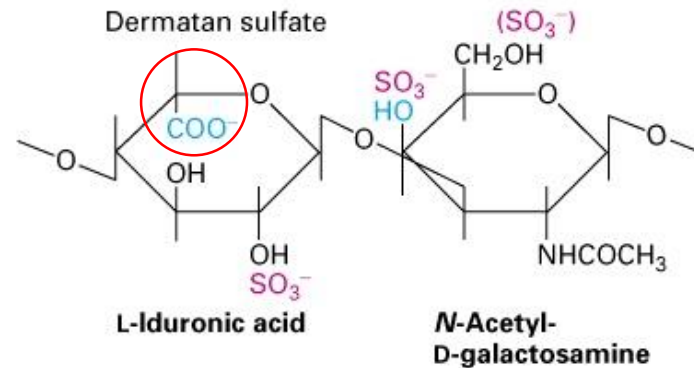
(a) Hyaluron ($n \leq 50,000$)



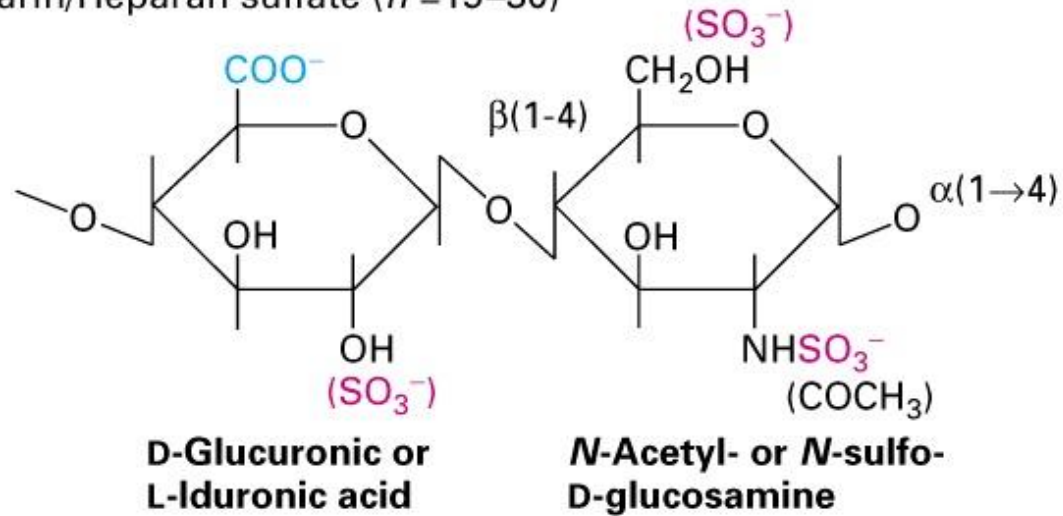
(b) Chondroitin sulfate ($n \leq 250$)



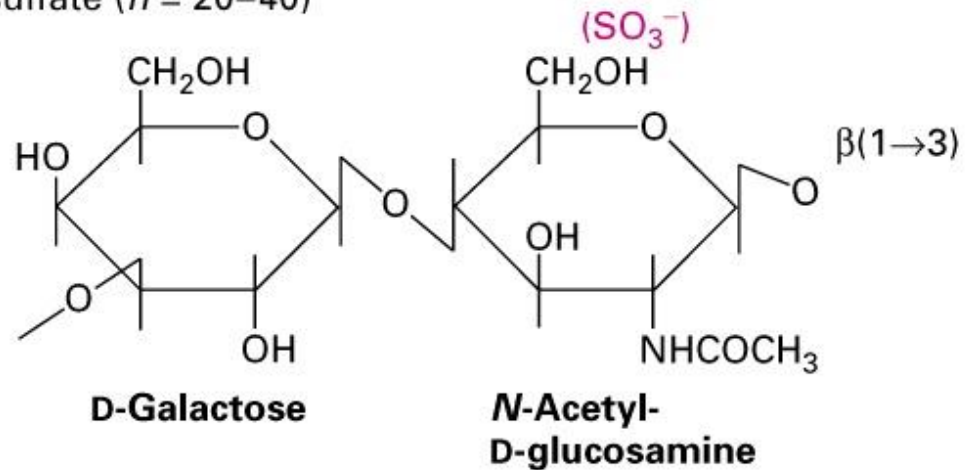
5-epimer D-GlcUA



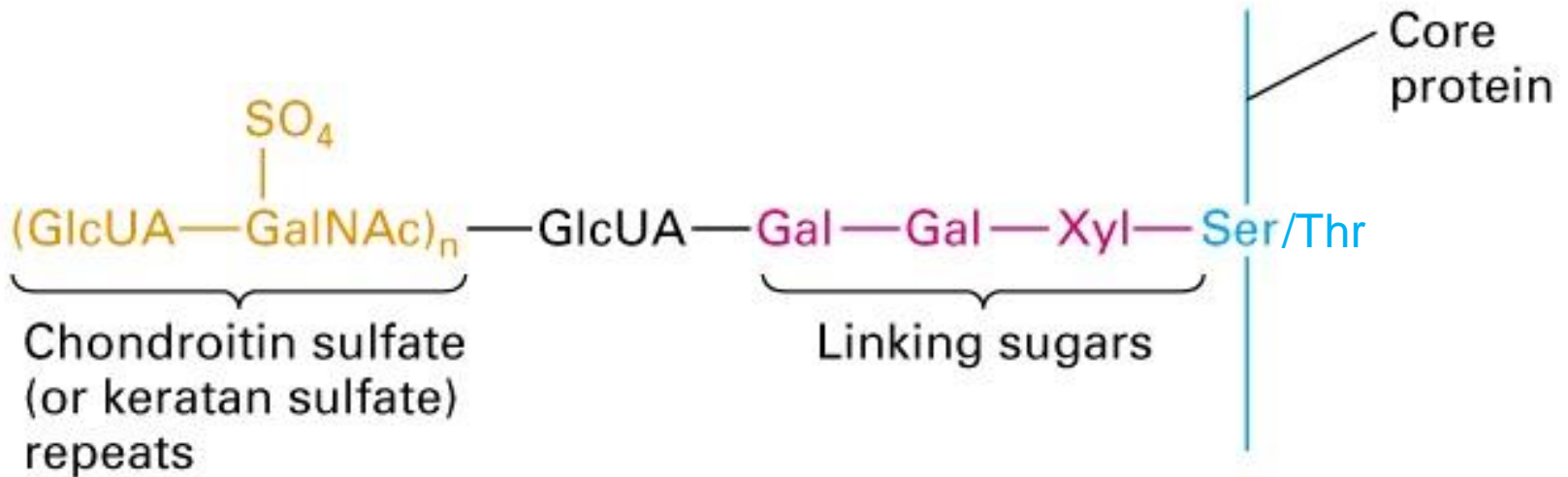
(c) Heparin/Heparan sulfate ($n = 15-30$)



(d) Keratan sulfate ($n = 20-40$)



Glikozilacija in sulfatacija proteoglikanov poteka v Golgijevem aparatu



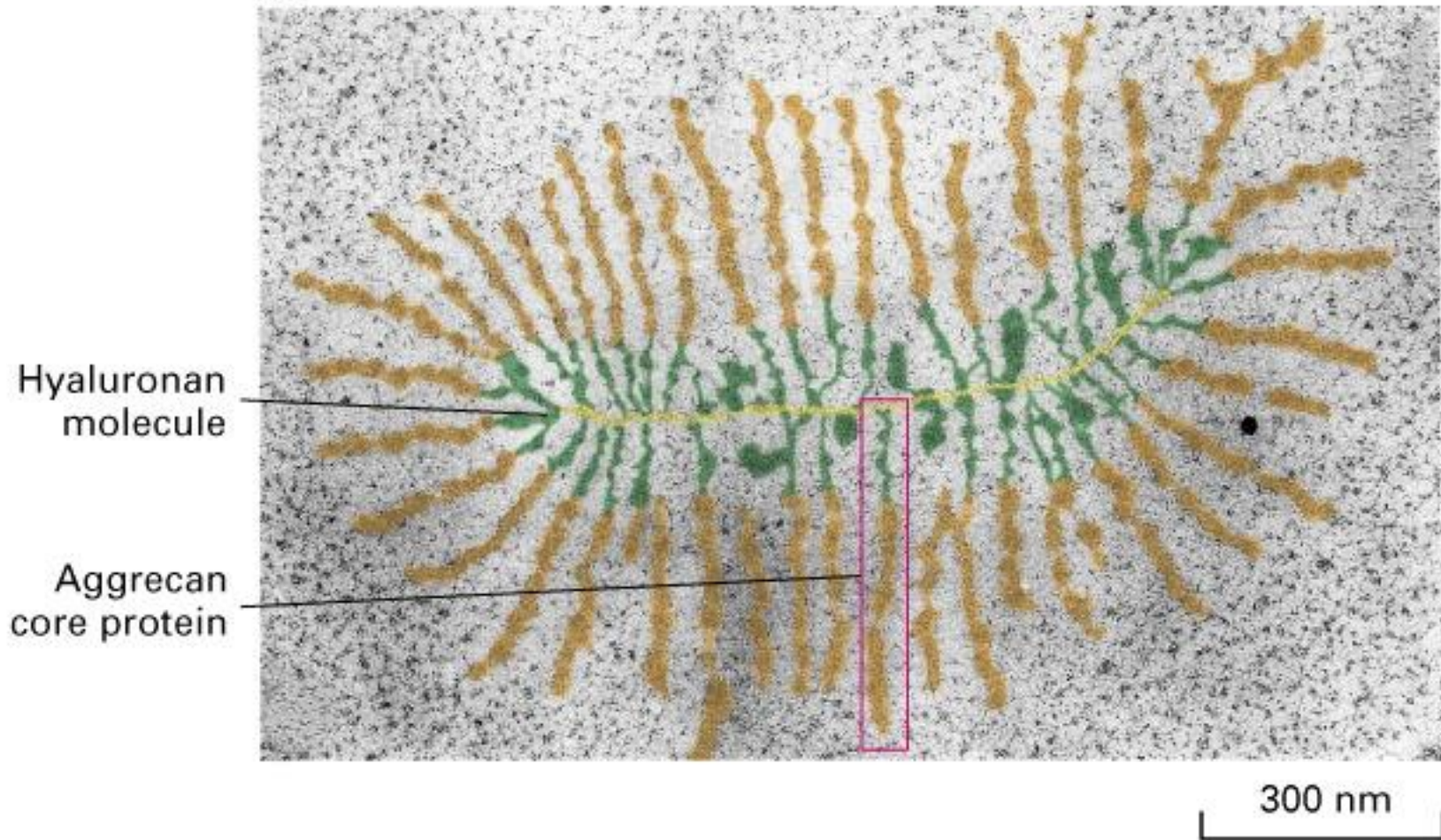
Gal = galactose

GalNAc = *N*-acetylgalactosamine

GlcUA = glucuronic acid

Xyl = xylose

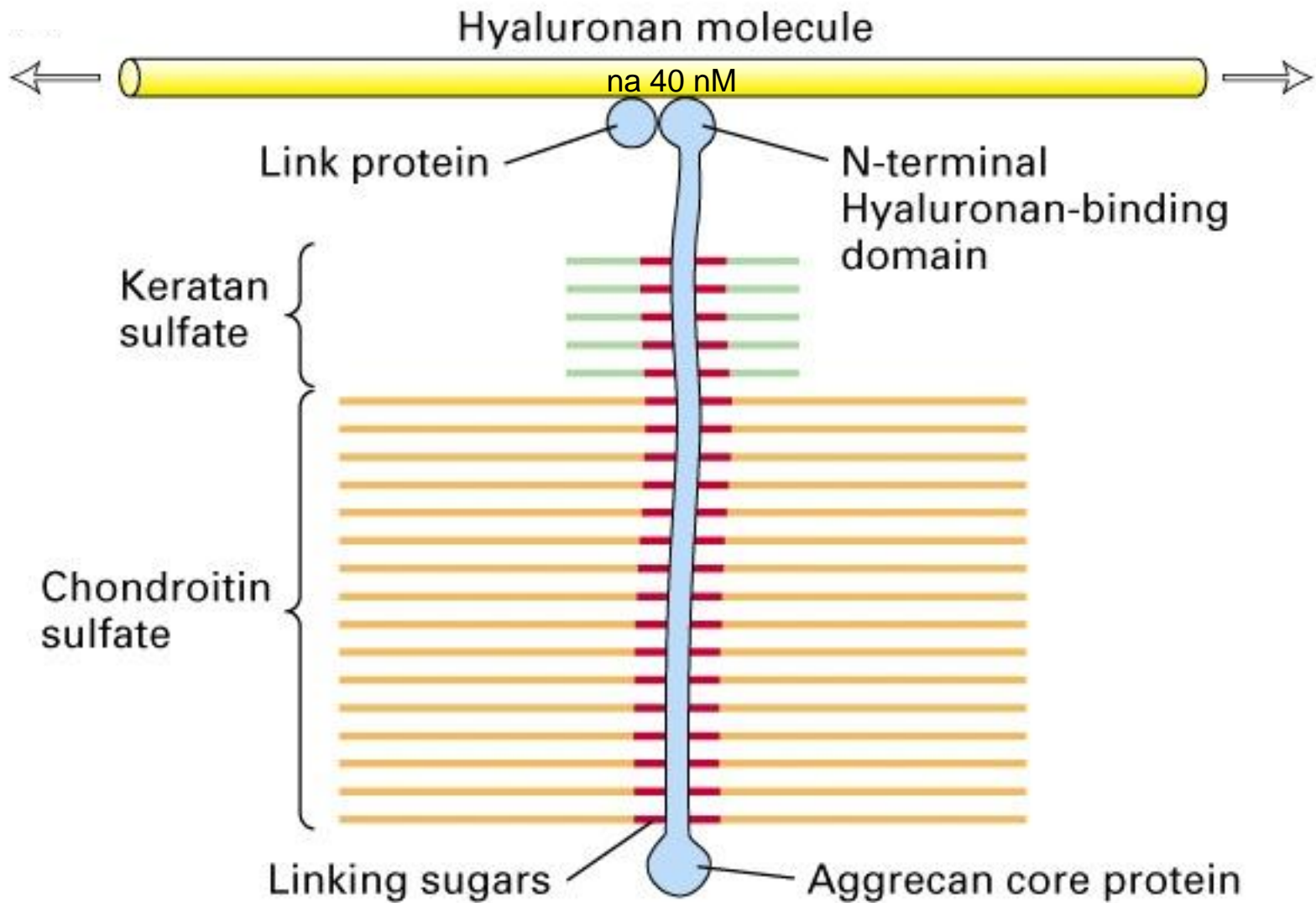
Agrekan



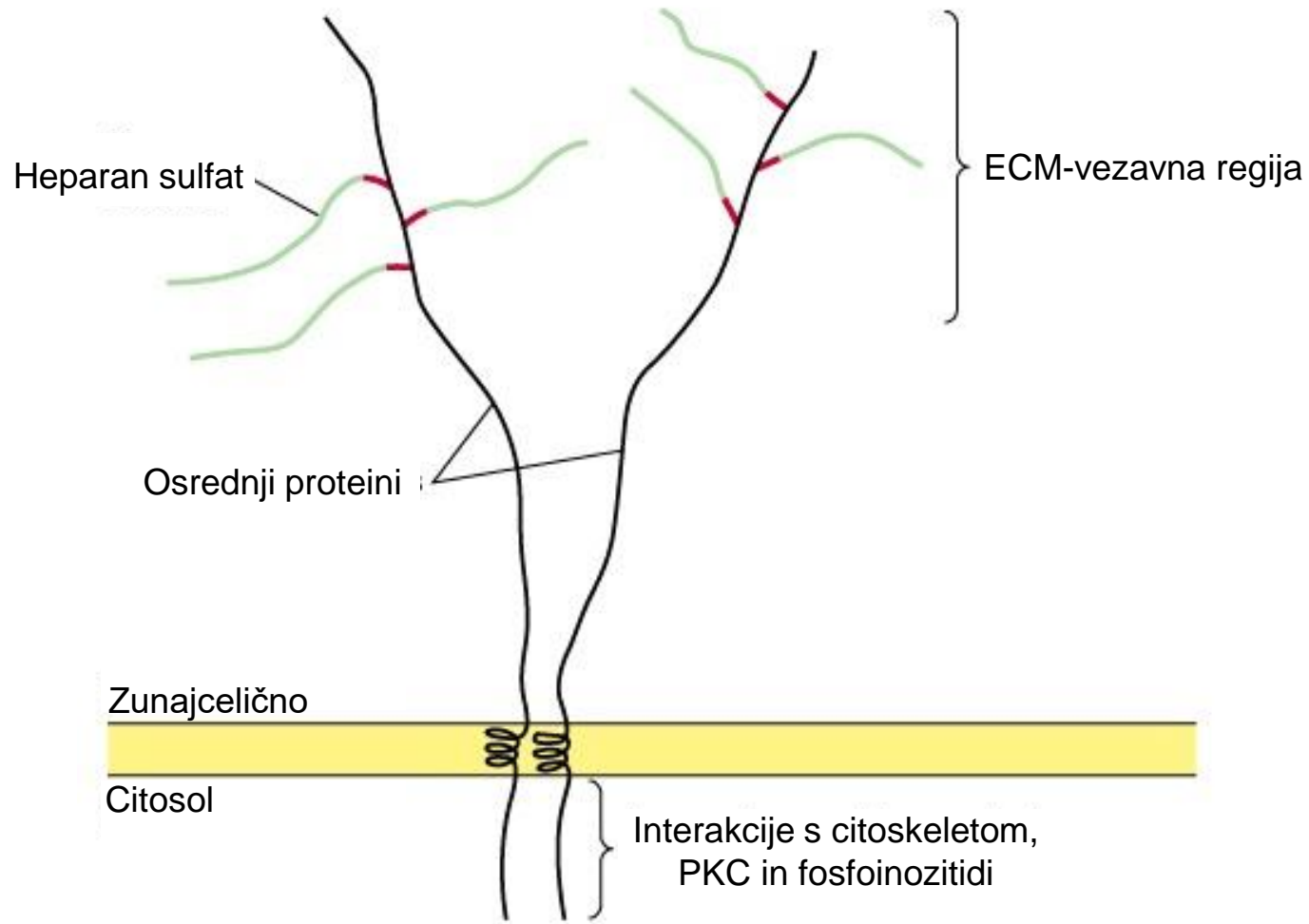
Poglavitna sestavina hrustanca. Proteoglikanski agregat: osnovne proteoglikanske enote se povezujejo v 40 nm intervalih na molekulo hialuronanana.

Osnovna enota (250 kDa + GAG) → 2 MDa, celoten agrekanski agregat >200 MDa.

Lastnosti gela ⇒ prožnost, amortizacija, odpornost proti deformaciji

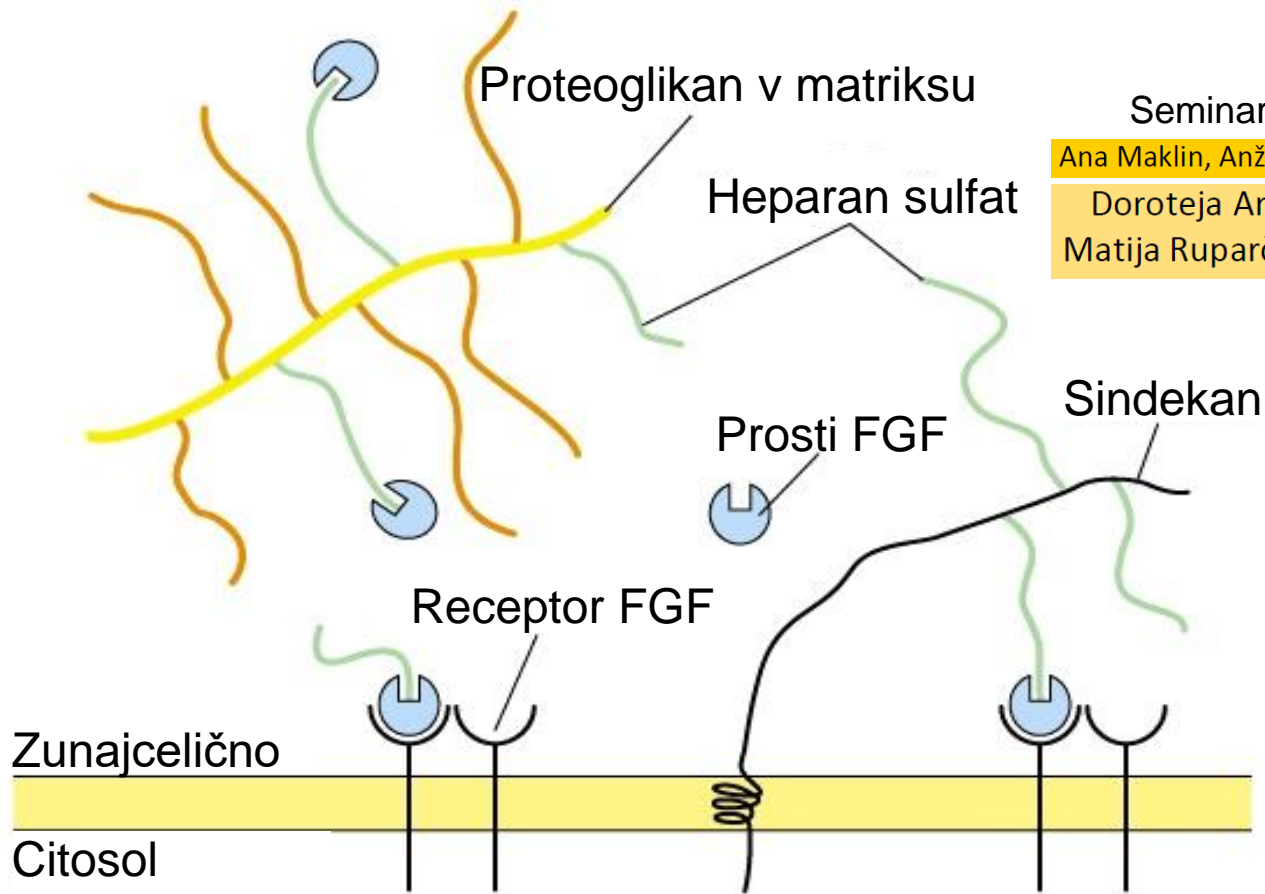


Sindekani



Proteoglikani na celični površini. Na Ser se vežejo GAG, heparan ali kondroitin sulfat.

Proteoglikani modulirajo hormonsko aktivnost



Seminar 13.1.2021

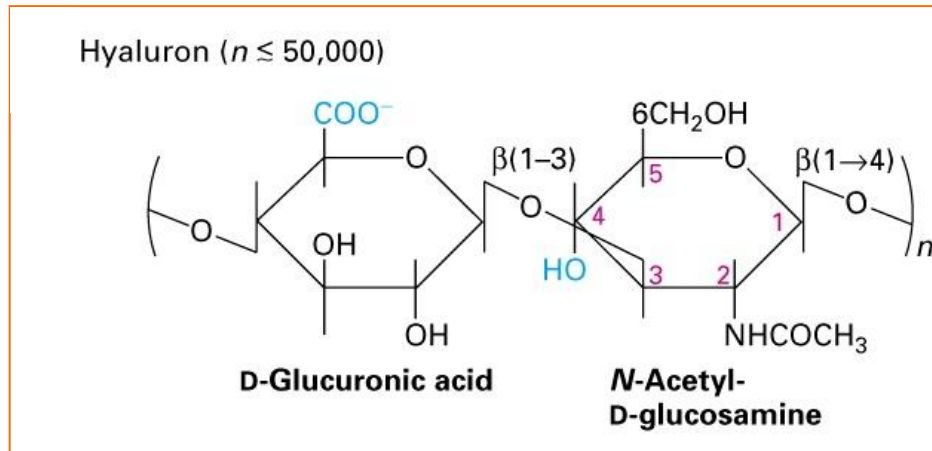
Ana Maklin, Anže Jenko, Primož Bembič

Doroteja Armič, Aljaž Bratina,
Matija Ruparčič, Anamarija Agnič

Moduliranje aktivnosti fibroblastnega rastnega faktorja (FRF):
Prosti FRF se ne more vezati na receptor, po vezavi na proteoglikan se pa lahko.
Proteoglikan-vezani FRF je zaščiteno pred razgradnjo s proteazami.
FRF se sprošča z razgradnjo proteoglikana.

Hialuronan = hialuronska kislina = hialuronat

Ena od glavnih komponent ECM



- edini zunajcelični oligosaharid, ki ni kovalentno vezan na protein (5 – 20.000 kDa)
- človek: ~15 g hialuronana, 2/3 se ga razgradi in ponovno tvori v 1 dnevu
- glavna sestavina sinovialne tekočine, kjer povečuje njeno viskoznost
- pomembna sestavina sklepnega hrustanca; obdaja hondroците
- pomembna sestavina kože
- veže veliko vode in tvori viskozen gel (1000-X poveča svoj volumen ⇒ turgorski tlak ⇒ odpor kompresijskim silam)
- veže se na c. receptor CD44 (tvori plašč ⇒ prepreči interakcije c.-c. c.-ECM ⇒ mogoča je migracija in proliferacija celic)
- biosinteza: membranske hialuronan-sintaze
- razgradnja: hialuronidaze
- osnova za nastanek agrekanskih agregatov ⇒ amortizacijski učinek hrustanca