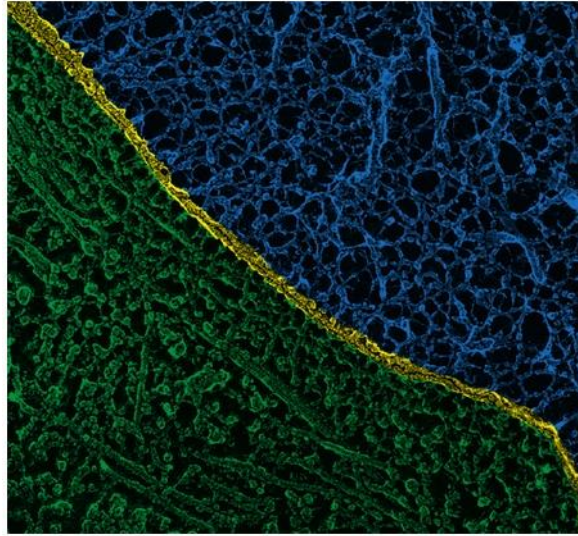




Povezovanje celic v tkiva

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

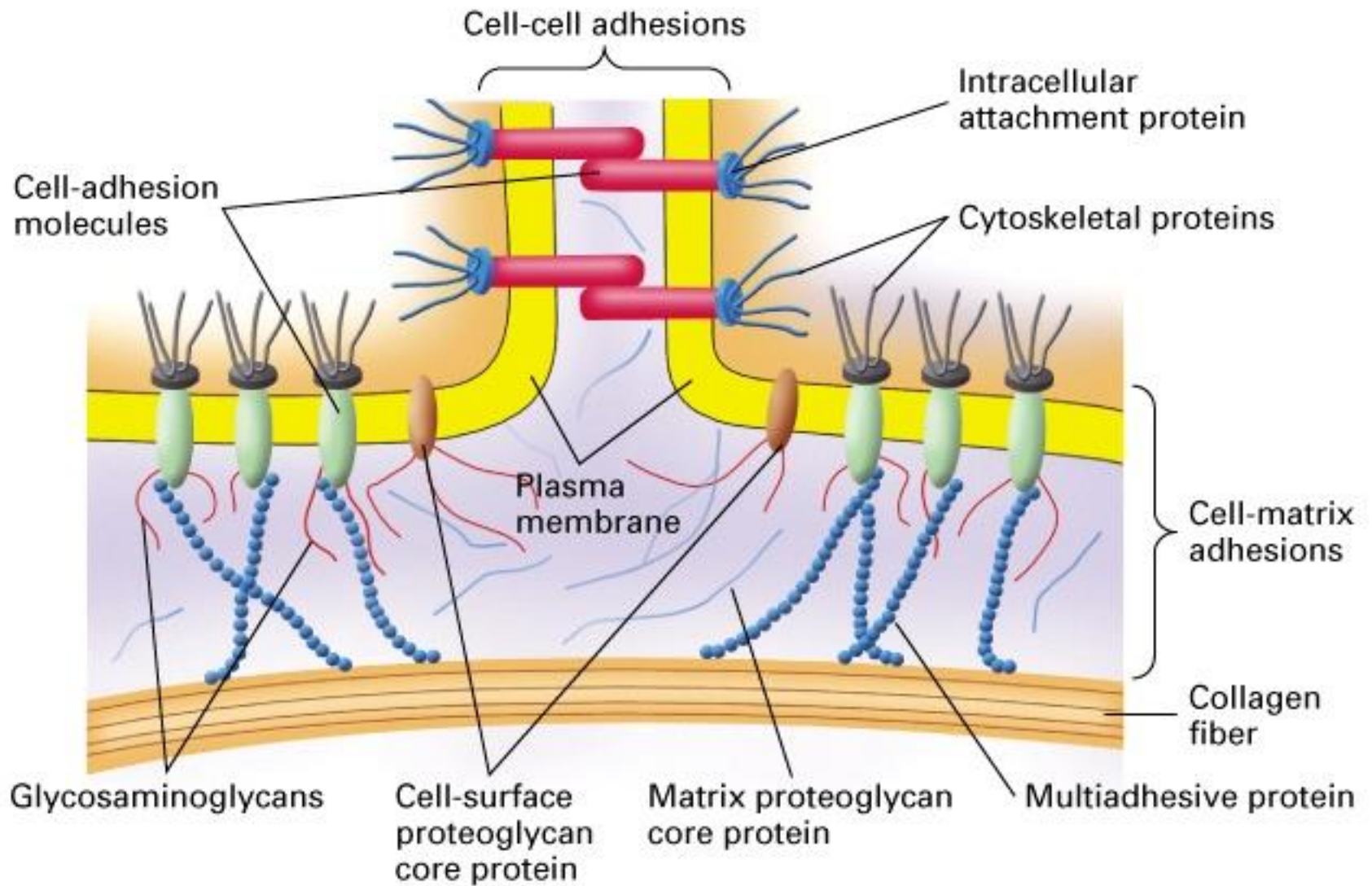
- Pritrjevanje celic in komuniciranje med njimi
- Pritrjevanje celic na medceličnino
- Kolageni v medceličnini
- Nekolagenske sestavine medceličnine

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 in migracija celic; zaloga hormonov, ki uravnavajo rast in razvoj

CAM = Cell-Adhesion Molecule

ECM = ExtraCellular Matrix

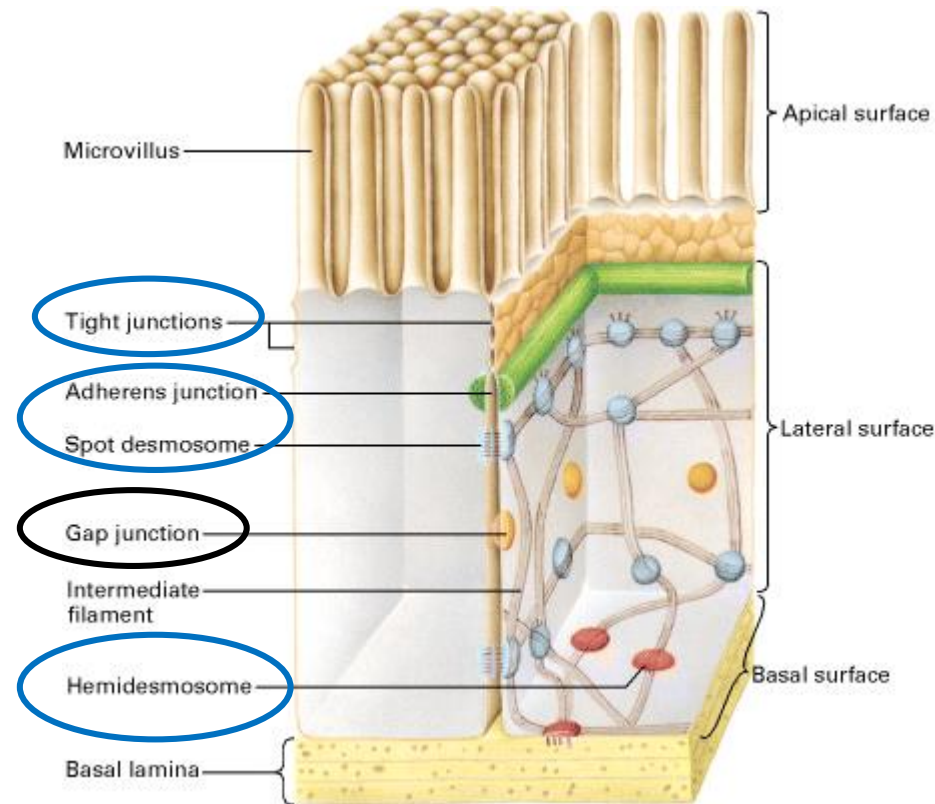


Za integrirano delovanje celic v tkivih so v glavnem odgovorni:

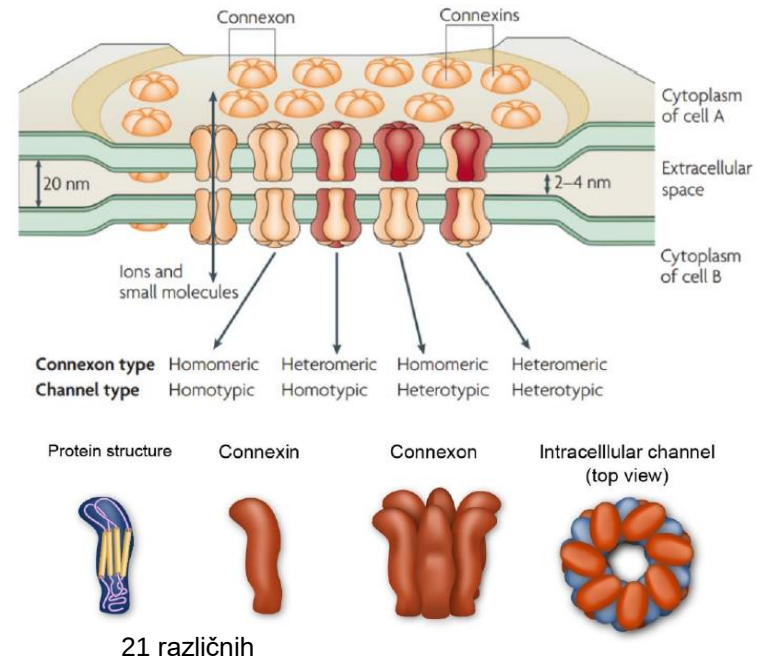
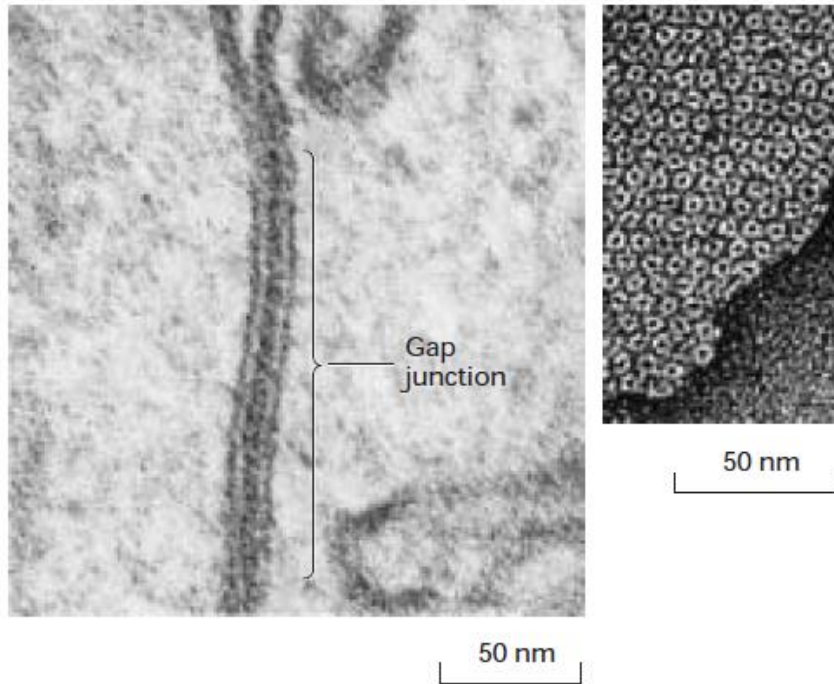
- presledkovni stiki
- tesni stiki
- stiki med CAM
- stiki z medceličnino



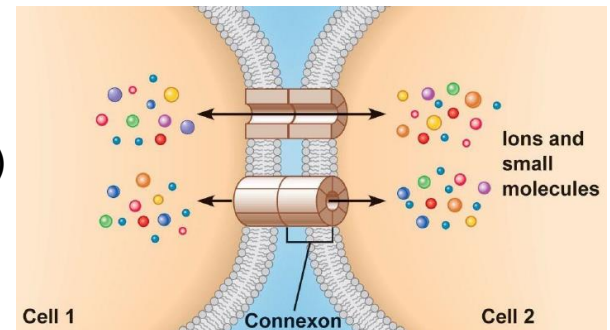
komunikacija s citoskeletom



Presledkovni stiki

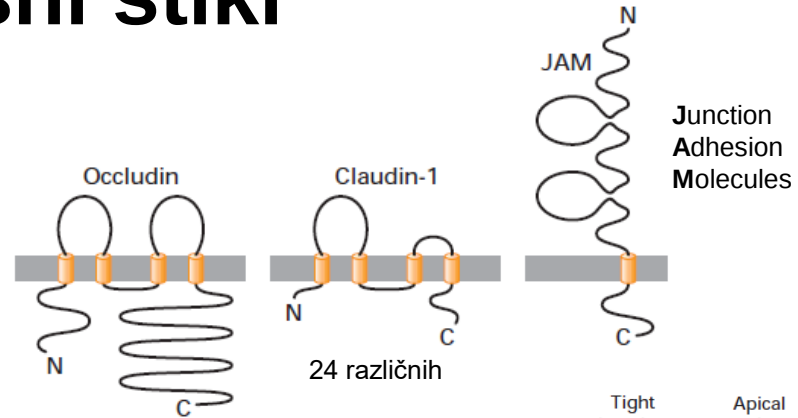
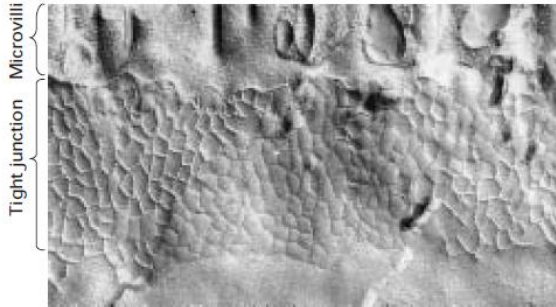


- Prehajanje ionov in molekul < 2 kDa (ak, ATP, cAMP, IP_3 ...)
- Električno in metabolno sporazumevanje med celicami
- Regulacija: dvig $[Ca^{2+}]$ in padec pH zapreta stike

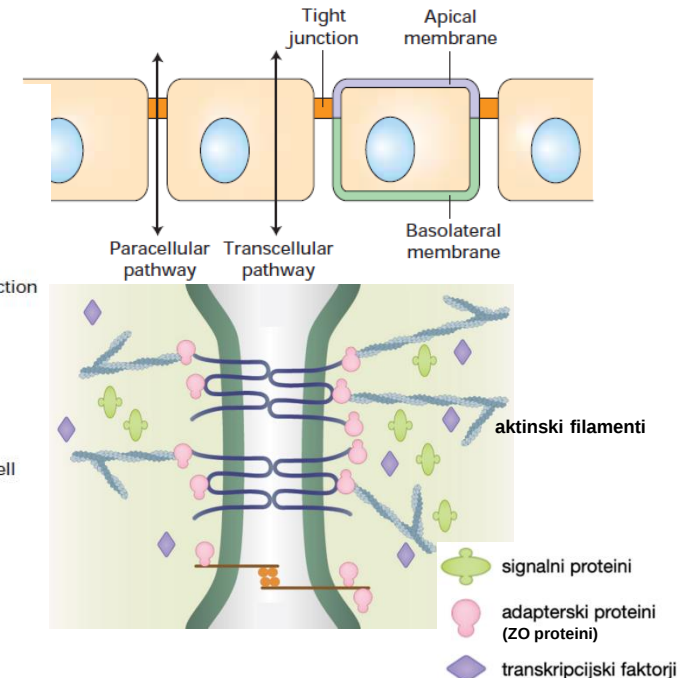
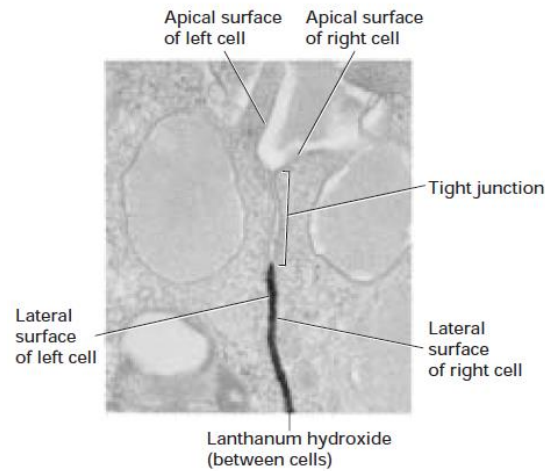
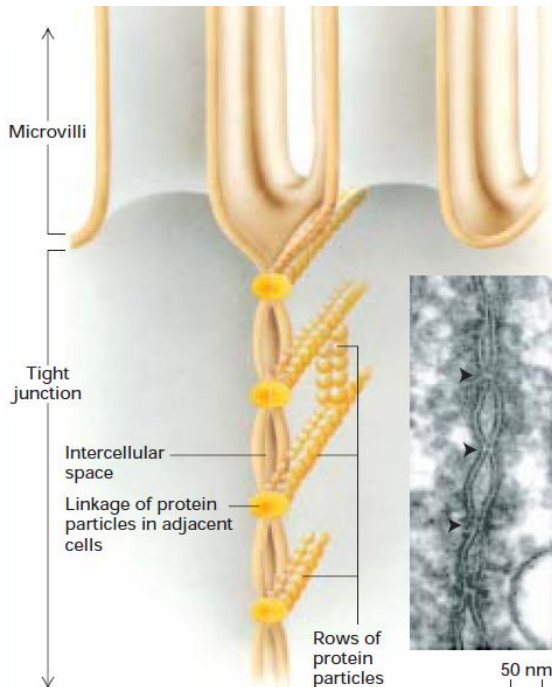


Tesni stiki

Epitelijske c. jeter



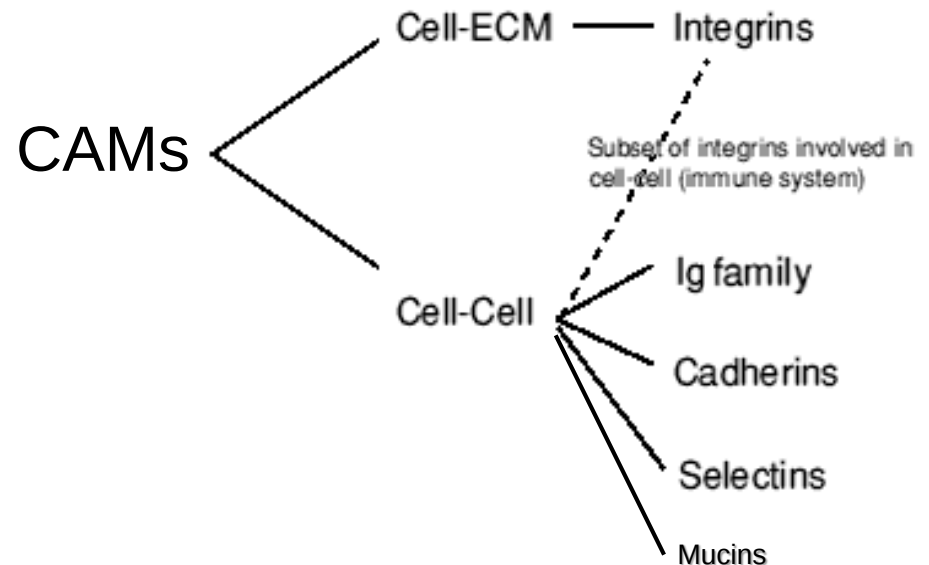
Acinarne c. pankreasa

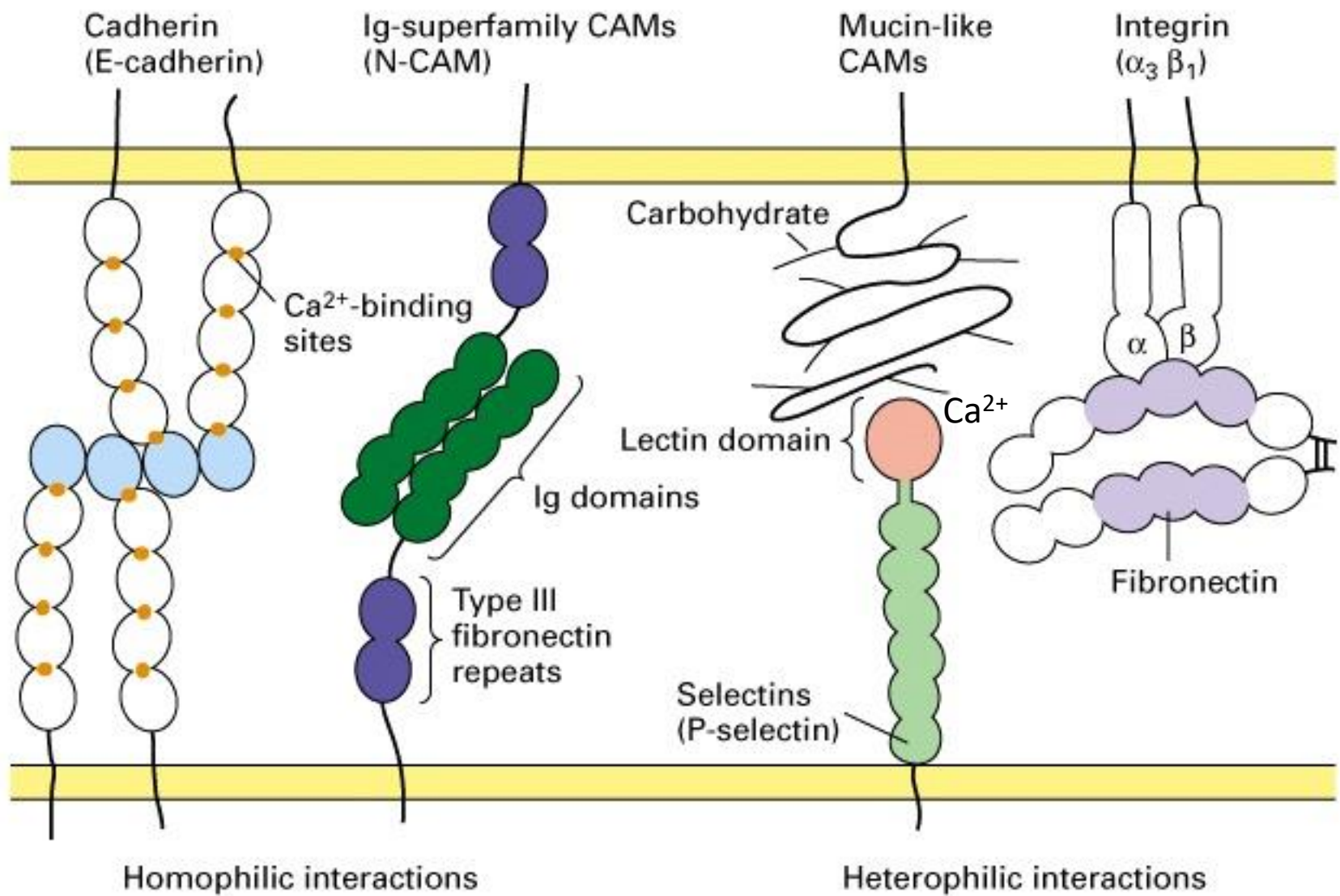


- Trdnost in odpornost tkiva na strižne sile
- Lahko so selektivno prepustni (paracelularni transport)
- Preprečujejo lateralno difuzijo proteinov in lipidov v eksoplazemskem sloju PM $\Rightarrow$ segregacija (apikalna in bazolateralna stran PM)

Adhezijske molekule (CAMs)

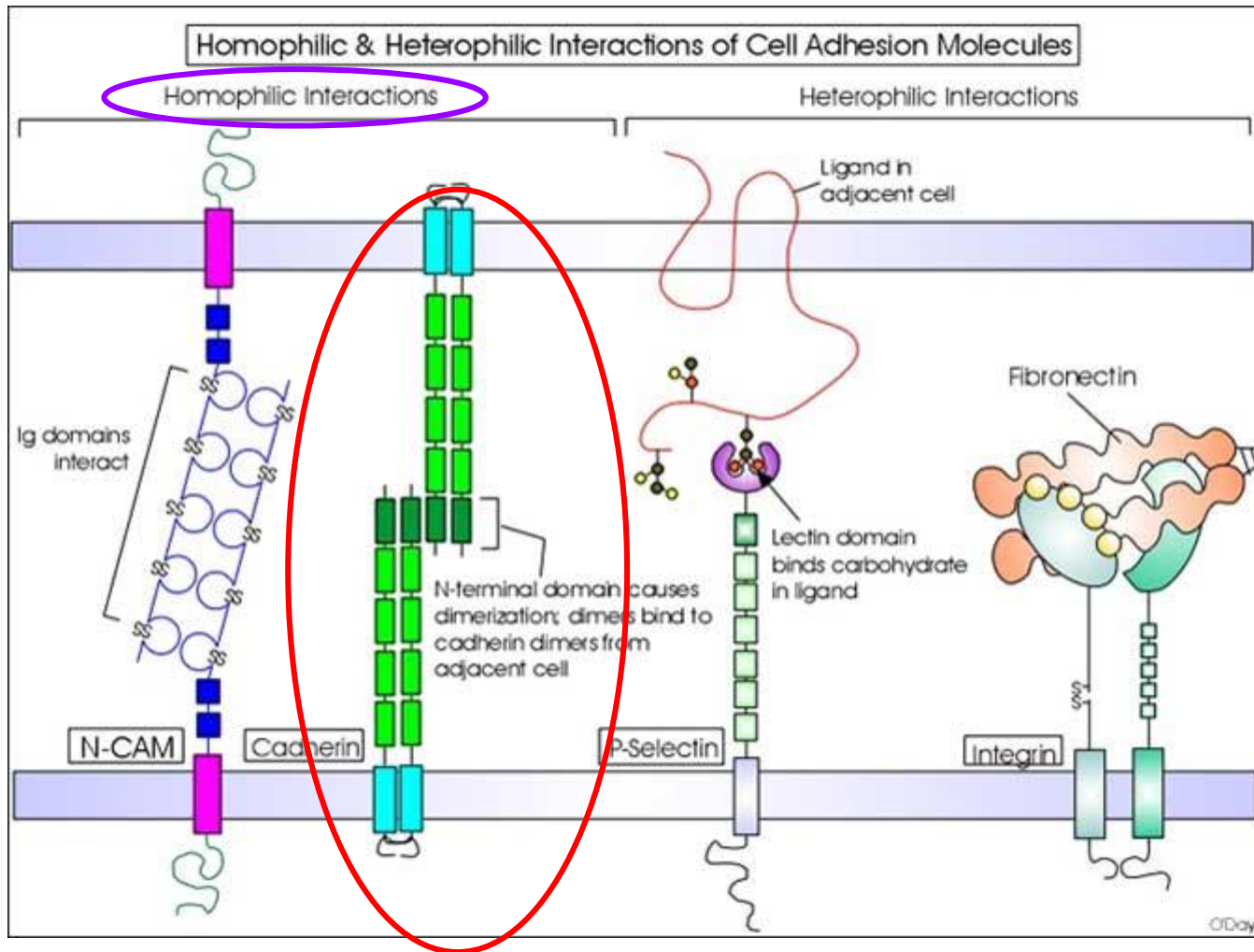
- Kadherini (Ca^{2+})
- CAM naddružine Ig
- Selektini (Ca^{2+})
- Mucini
- Integrini





Adhezijske molekule (CAMs)

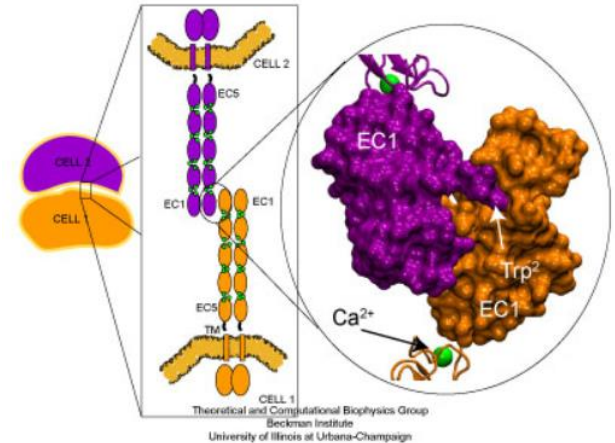
- kadherini: funkcija odvisna od Ca^{2+}
- naddružina imunoglobulinov
- selektini: funkcija odvisna od Ca^{2+}
- mucini
- integrini



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.

Kadherini:

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



kadherini (naddružina)

klasični

protokadherini

dezmosomalni
(dezmogleini+
dezmokolini)

nekonvencionalni/
nerazvrščeni

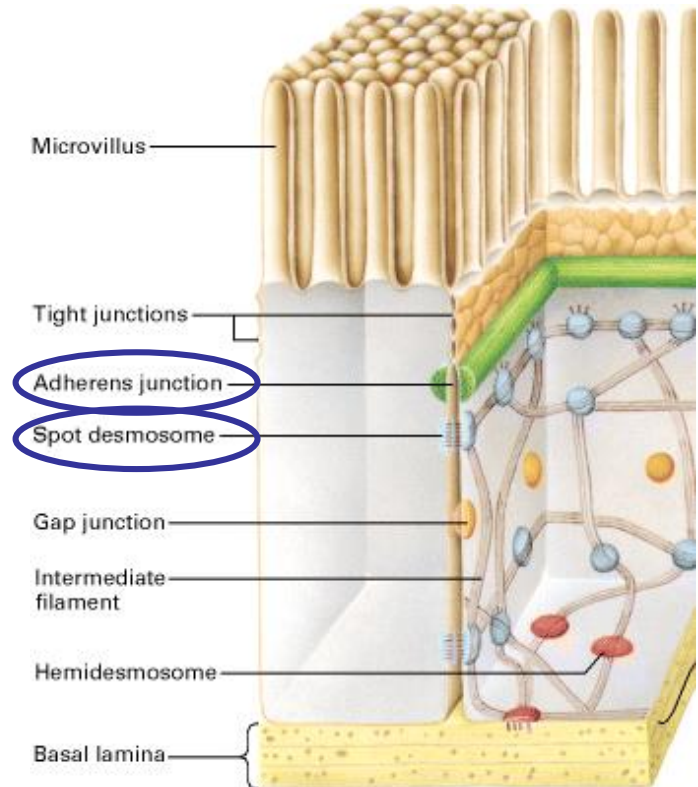
Glavne kadherinske molekule na sesalskih celicah

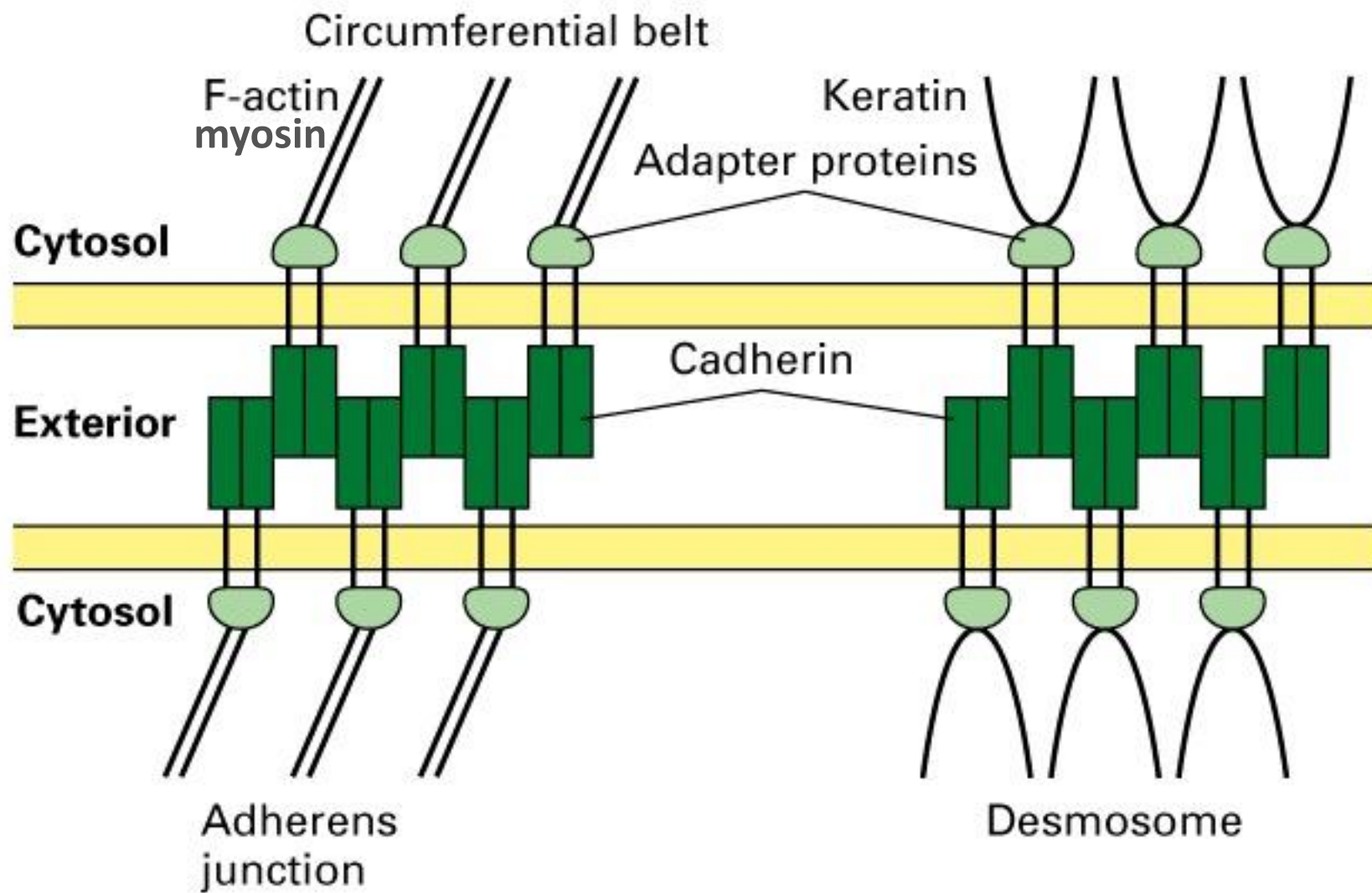
Molecule	Predominant Cellular Distribution
E-cadherin	Preimplantation embryos, non-neural epithelial tissue
P-cadherin	Trophoblast
N-cadherin	Nervous system, lens, cardiac and skeletal muscle

- > 40 vrst kadherinov. Pomembna vloga pri diferenciaciji tkiv, vzpostavljanju povezav med nevroni ...
- Izguba kadherinov na površini celic ⇨ metastaziranje; rak
- E: epitelijski, P: placentalni, N: nevronski, V: vaskularni, T: brez citoplazemske domene ...

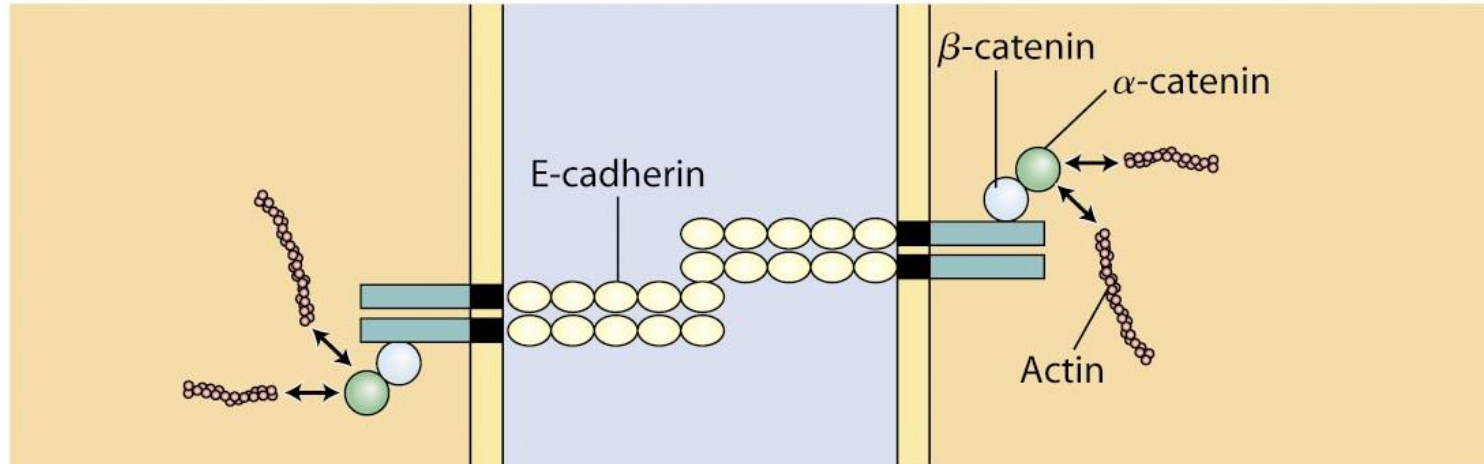
Medcelične povezave s kadherini

- **Adherenčni stiki** (tudi pasovni desmosomi): pri epitelijских celicah stiki, ki jih tvorijo E-kadherini. Katenini pa povezujejo E-kadherine z obročem iz aktina in miozina.
- **Dezmosomi** (tudi točkovni desmosomi): so medcelični stiki, ki jih tvorita kadherina dezmosteglin in dezmosteglin. Kadherine povezujeta s keratinskimi (intermediarnimi) filamenti v citosolu plakoglobulin in plakofilin.

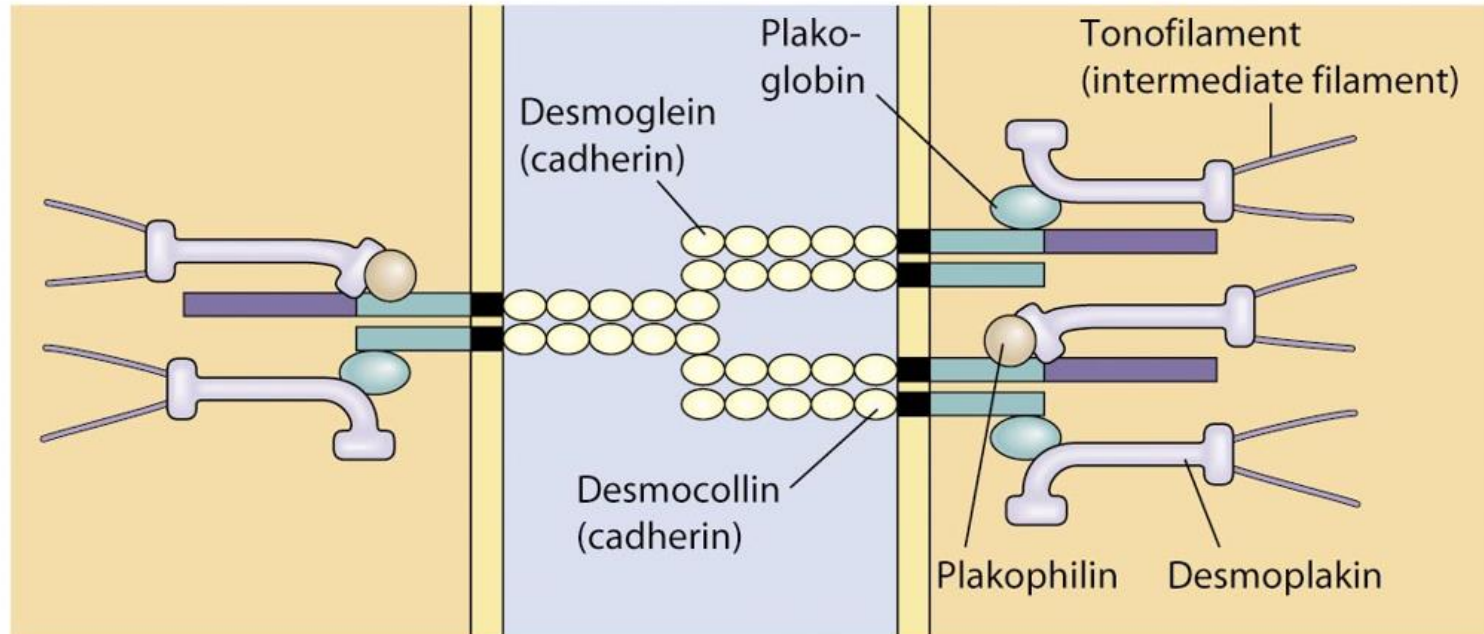




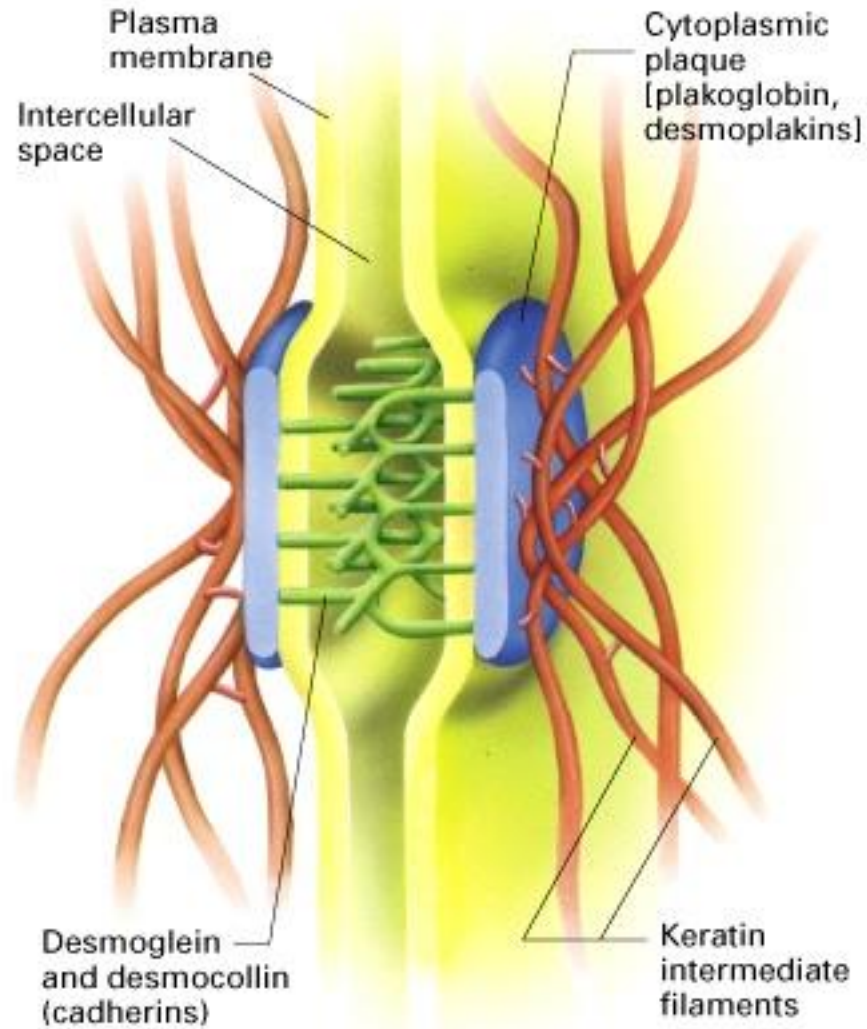
Adherenčni stik



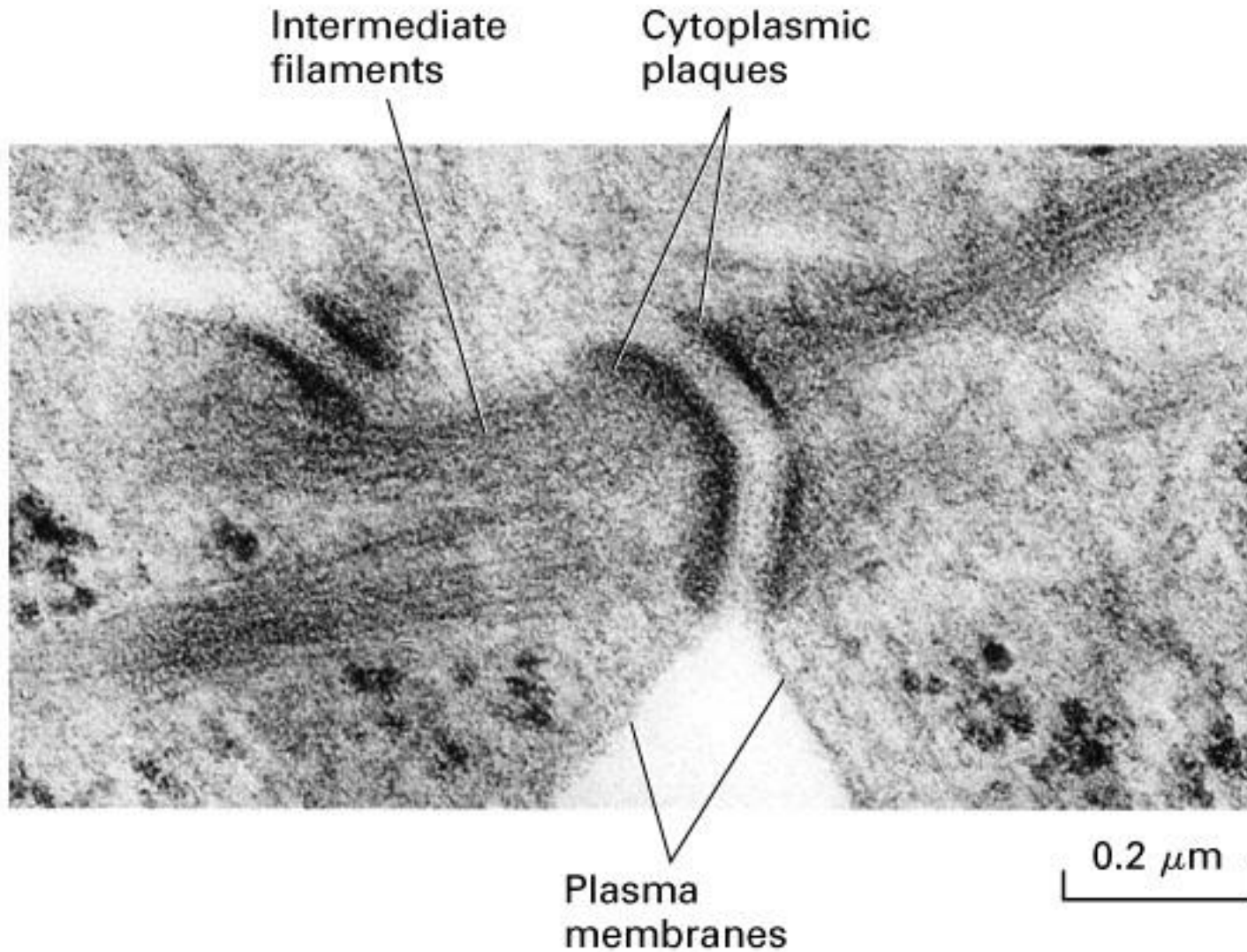
Dezmosom



Dezmosom

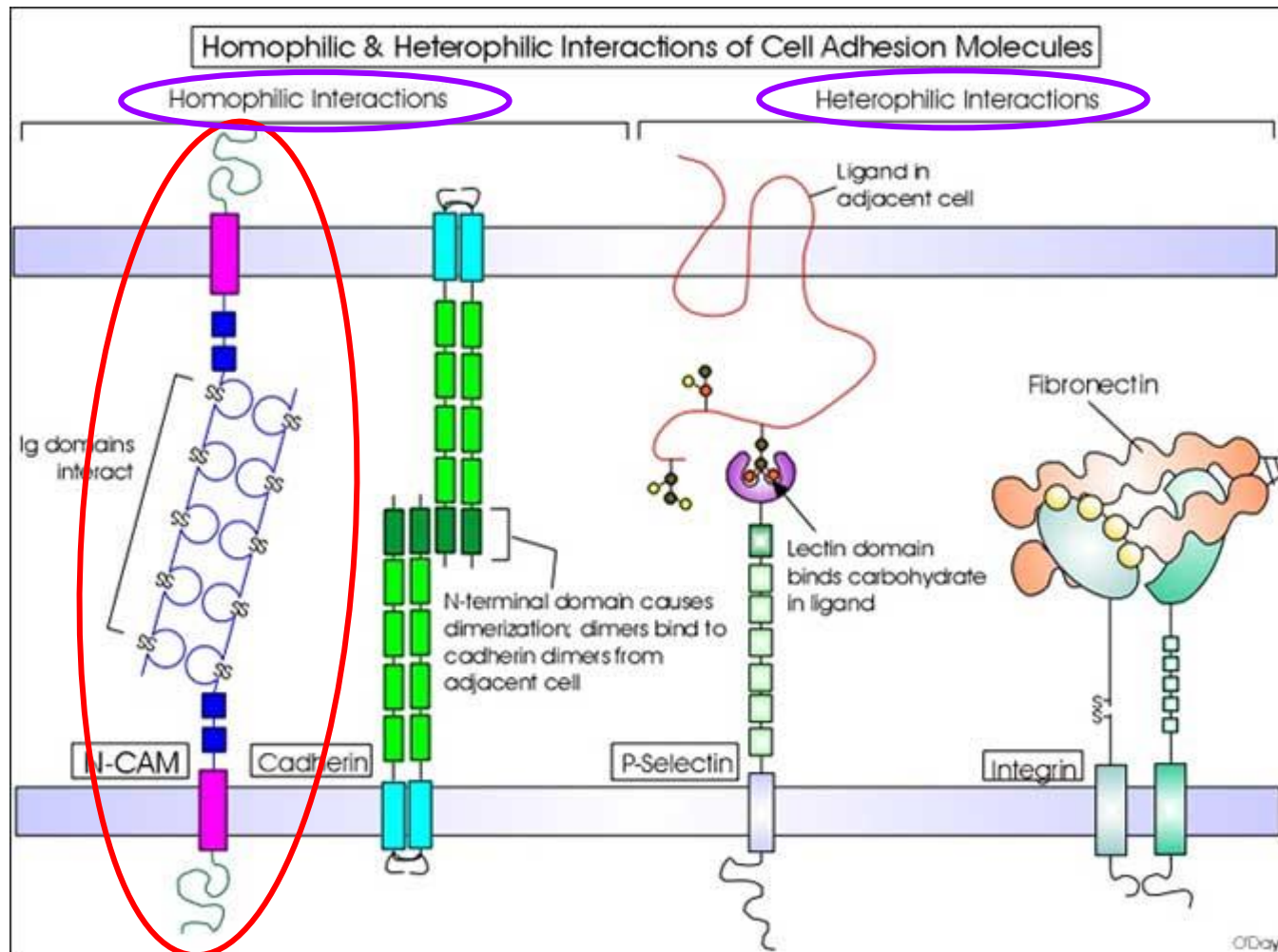


Z desmosomom povezana keratinocita

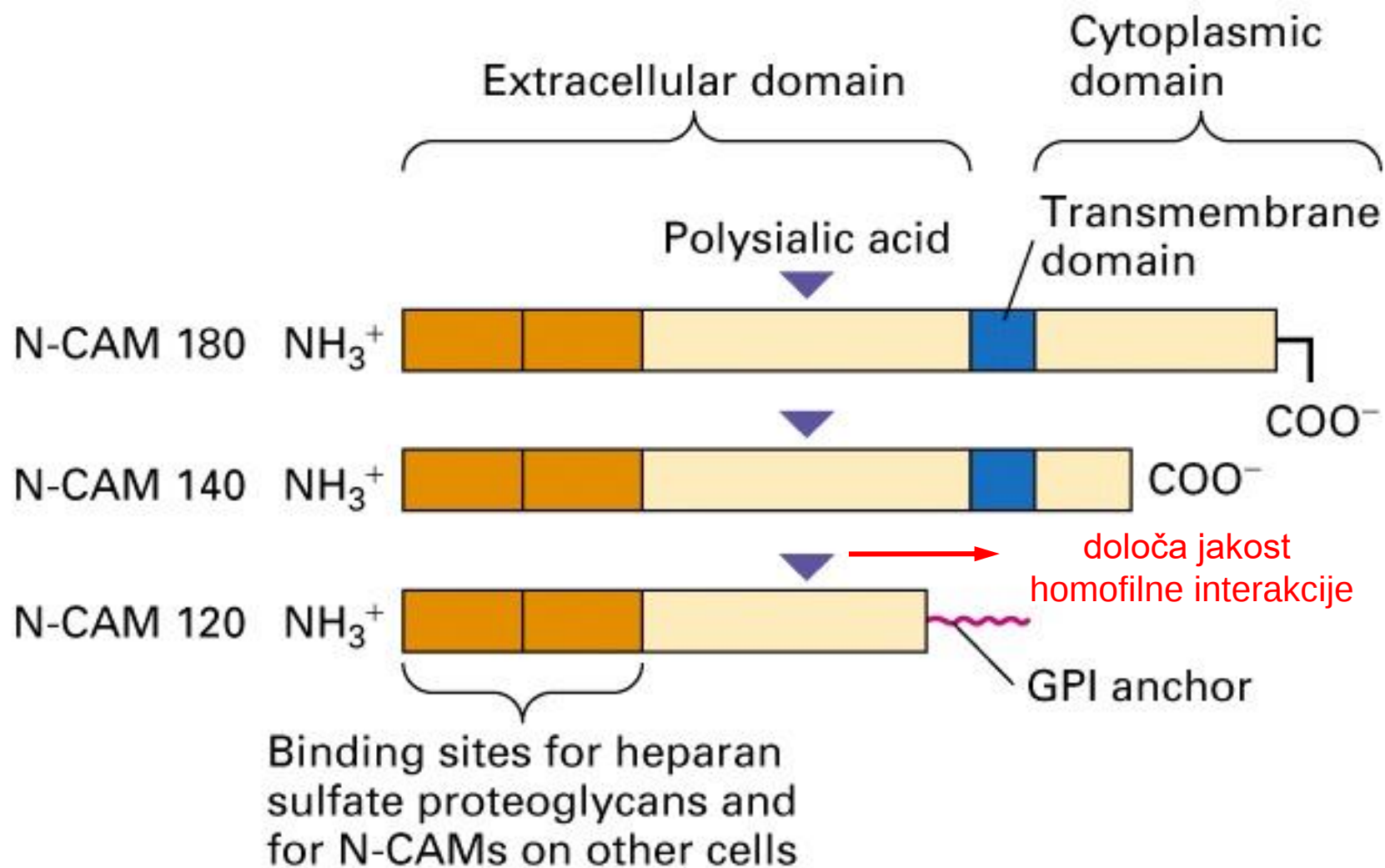


Adhezijske molekule (CAMs)

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

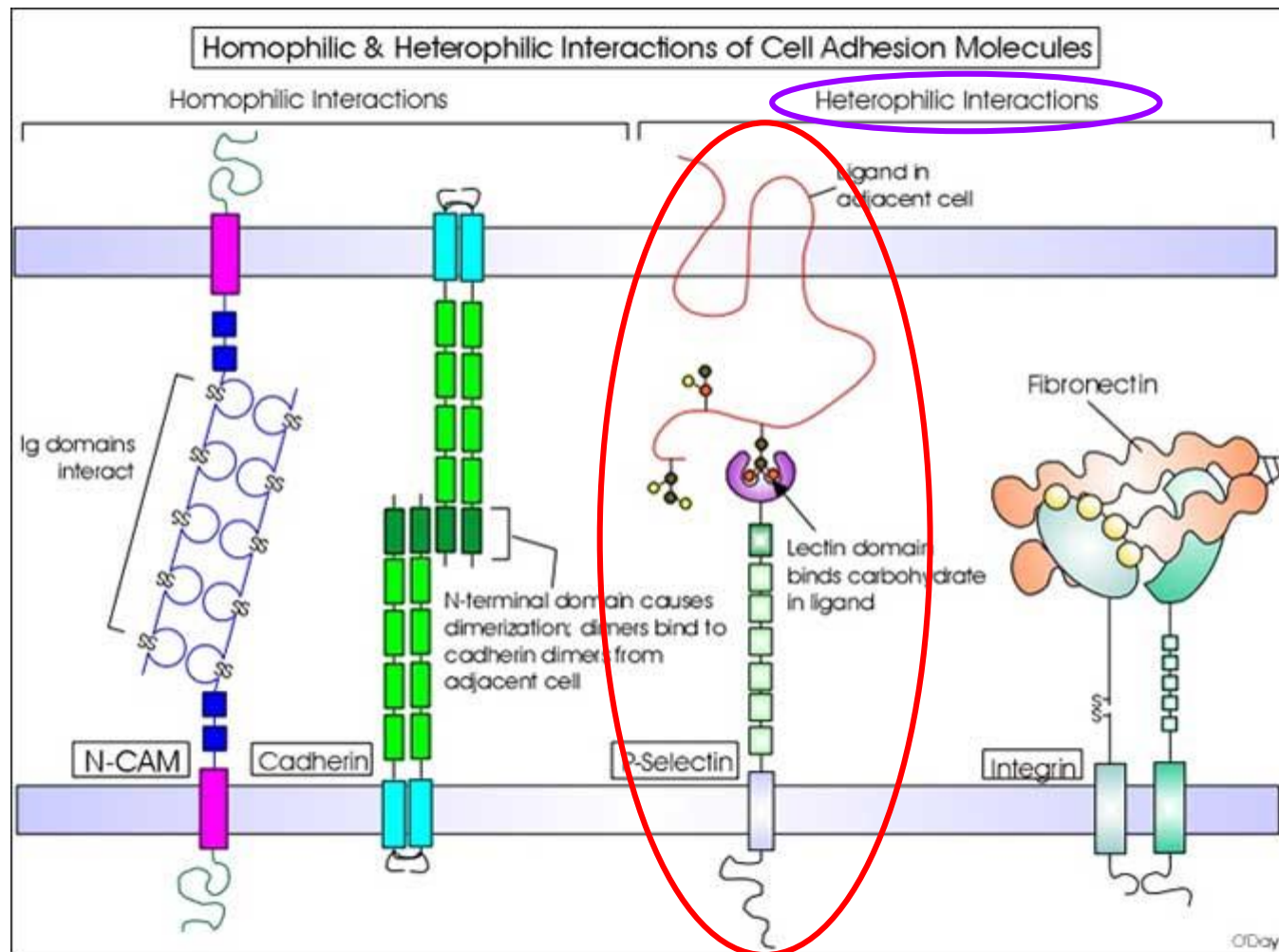


Neural-CAM (N-CAM; adhezijske molekule v nevronih), Vascular-CAM, Inter-CAM
 Neodvisno od Ca^{2+} tvorijo homo-, pa tudi heterofilne interakcije (npr. I-CAM z integrini).
 Kodira jih en gen. Variante so posledica alternativnega izrezovanja in razlik v glikozilaciji.
 Pomembni pri morfogenezi, diferenciaciji mišičnih, živčnih in glialnih tkiv ...



Adhezijske molekule (CAMs)

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

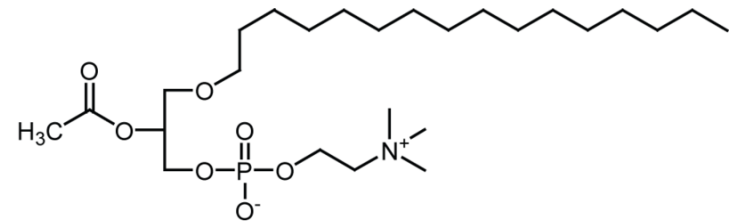


Selektini sodelujejo pri vezavi levkocitov (monociti, nevtrofilci, limfociti T in B) na endotelijske celice v žilah, pri interakciji celic z elementi ECM ...

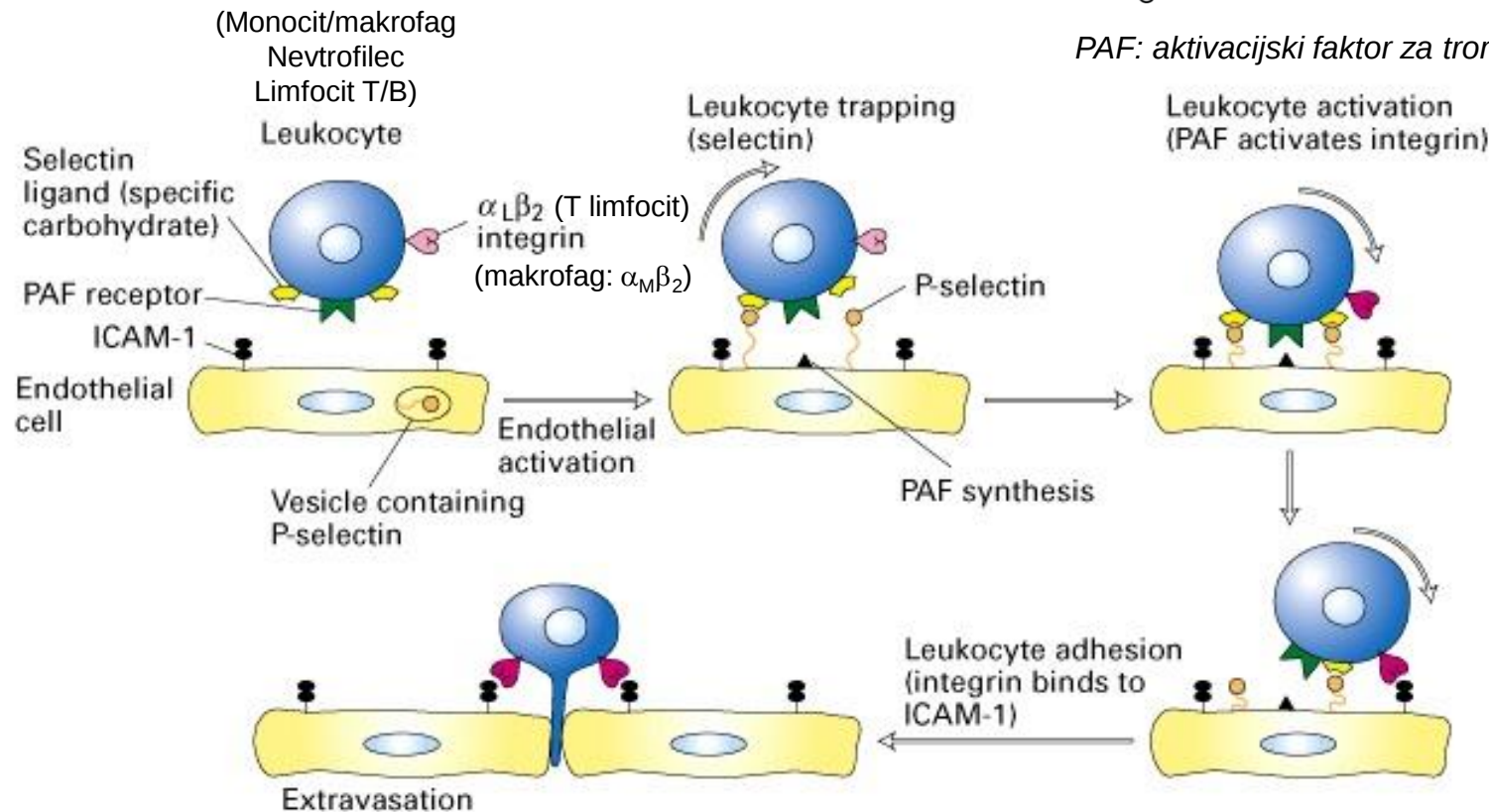
Spadajo med lektine (vežejo ogljikove hidrate).

Za vezavo potrebujejo Ca^{2+} ione.

Ključna vloga selektinov pri ekstravazaciji levkocitov



PAF: aktivacijski faktor za trombocite



P-selektin se po aktivaciji endotelijske celice s citokini (vnetje, infekcija) z eksocitozo založnih mešičkov izpostavi na površini. Vezava med levkocitom in endotelijsko celico je šibka. Levkocit se 'kotali' po endotelijski celici. Vezava PAF na PAFR sproži aktivacijo integrinov na levkocitu in njihovo vezavo na endotelijski I-CAM (Inter-CAM), CAM iz naddružine Ig, kar učvrsti vezavo med celicama.

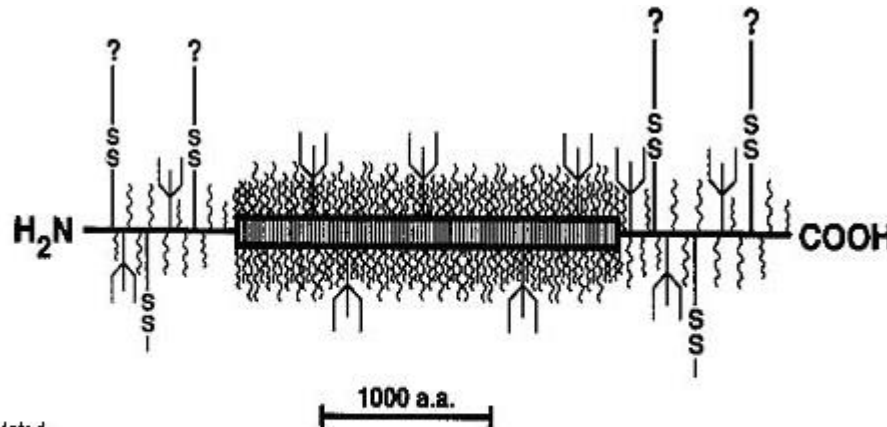
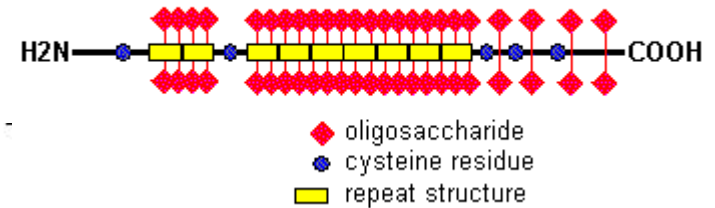
Adhezijske molekule (CAMs)

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

Osnovne lastnosti mucinov:

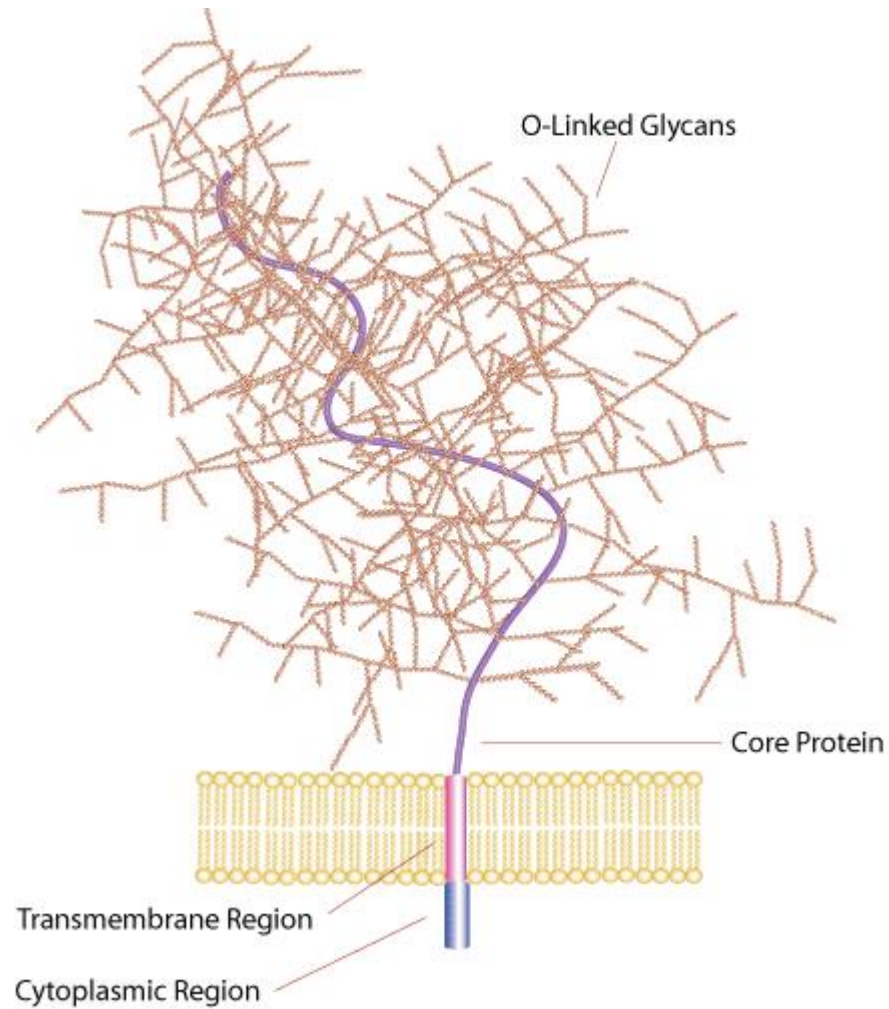
- visoko glikozilirani, predvsem v osrednjem delu strukture
- N- in C-konec je bogat s Cys
- osrednji del (50% Ser in Thr) vsebuje >100 O-vezanih sladkornih verig
- združujejo se v agregate z 10^6 – 10^7 Da (nekovalentne interakcije in S–S)
- so pomembna sestavina sluzi
- predstavljajo bariero za proteaze

Generic structure of a mucin monomer



■ Glycosylated
 ■ O-linked Oligosaccharides
 Ψ N-linked Oligosaccharides
 —S—S— 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)

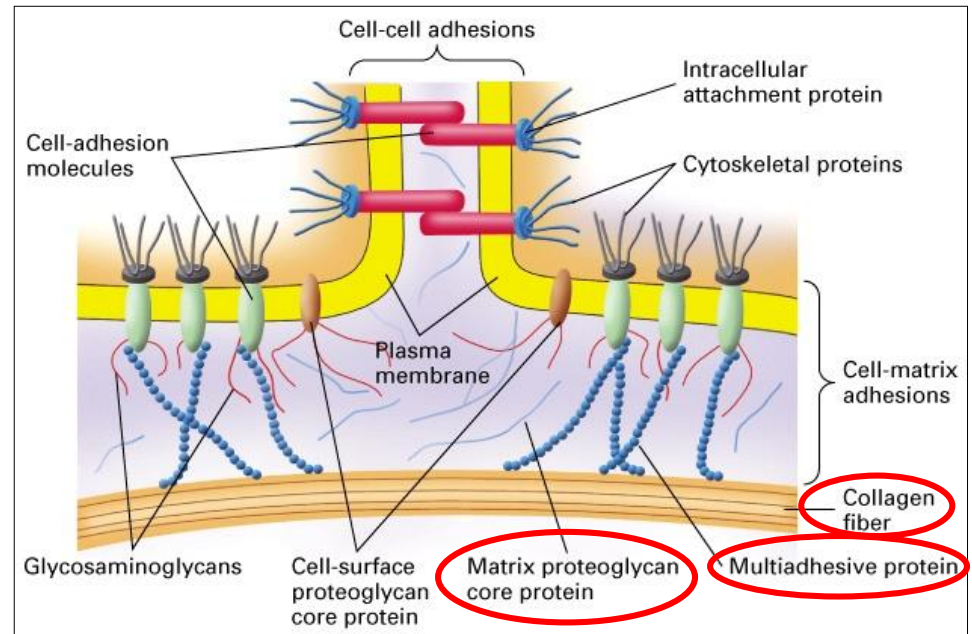
- Organizacija celic v tkiva
- Koordinacija celičnih funkcij
- Platforma za migracijo celic
- Aktivacija signalnih poti za diferenciacijo in delitev celic ter izražanja genov

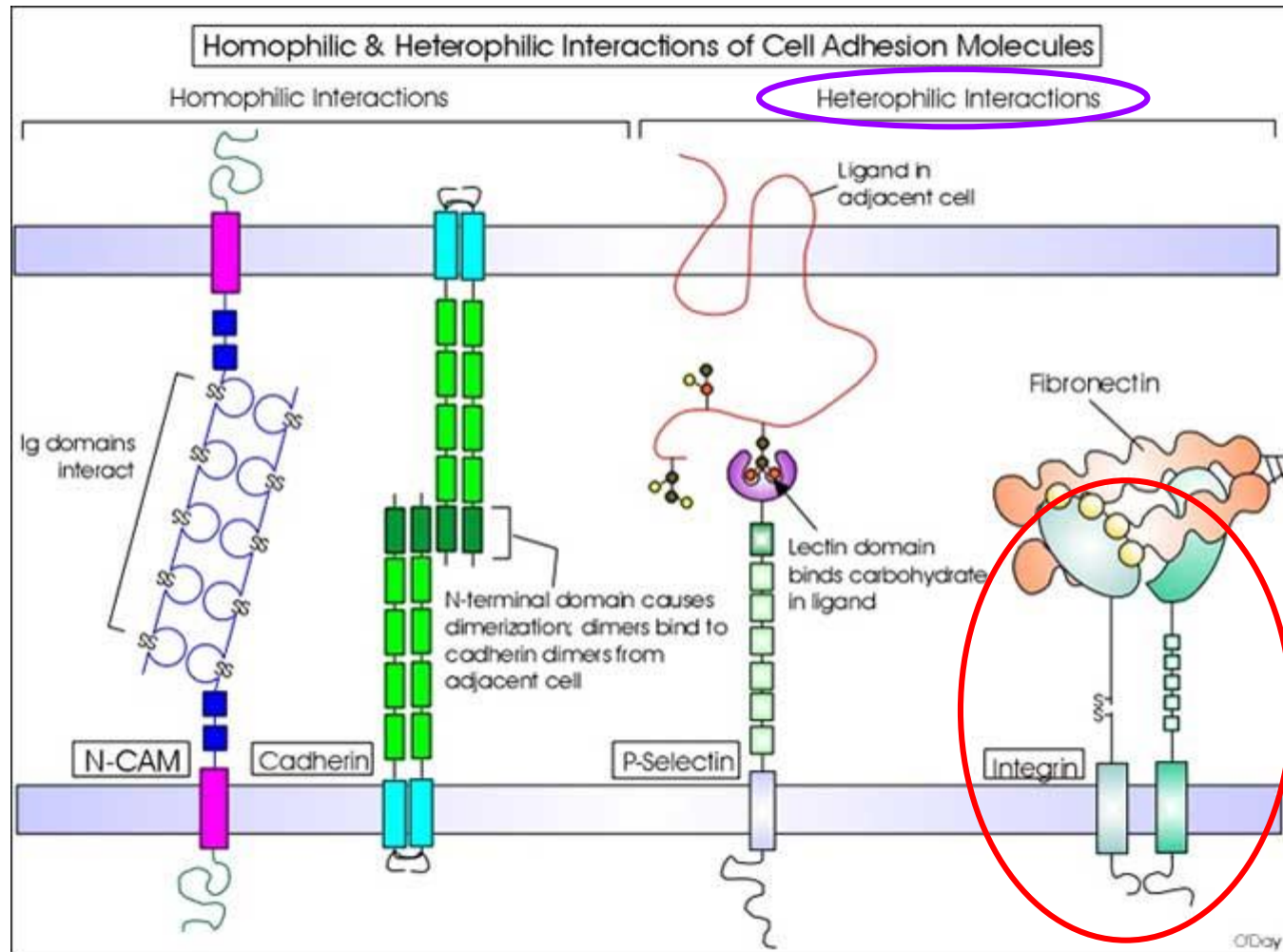
Proteinske sestavine medceličnine

- proteoglikani: viskoznost, varovanje celic
- kolagenska vlakna: čvrstost
- multiadhezijski proteini: povezava elementov ECM z receptorji na površini celic

Prijemališča na celicah:

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

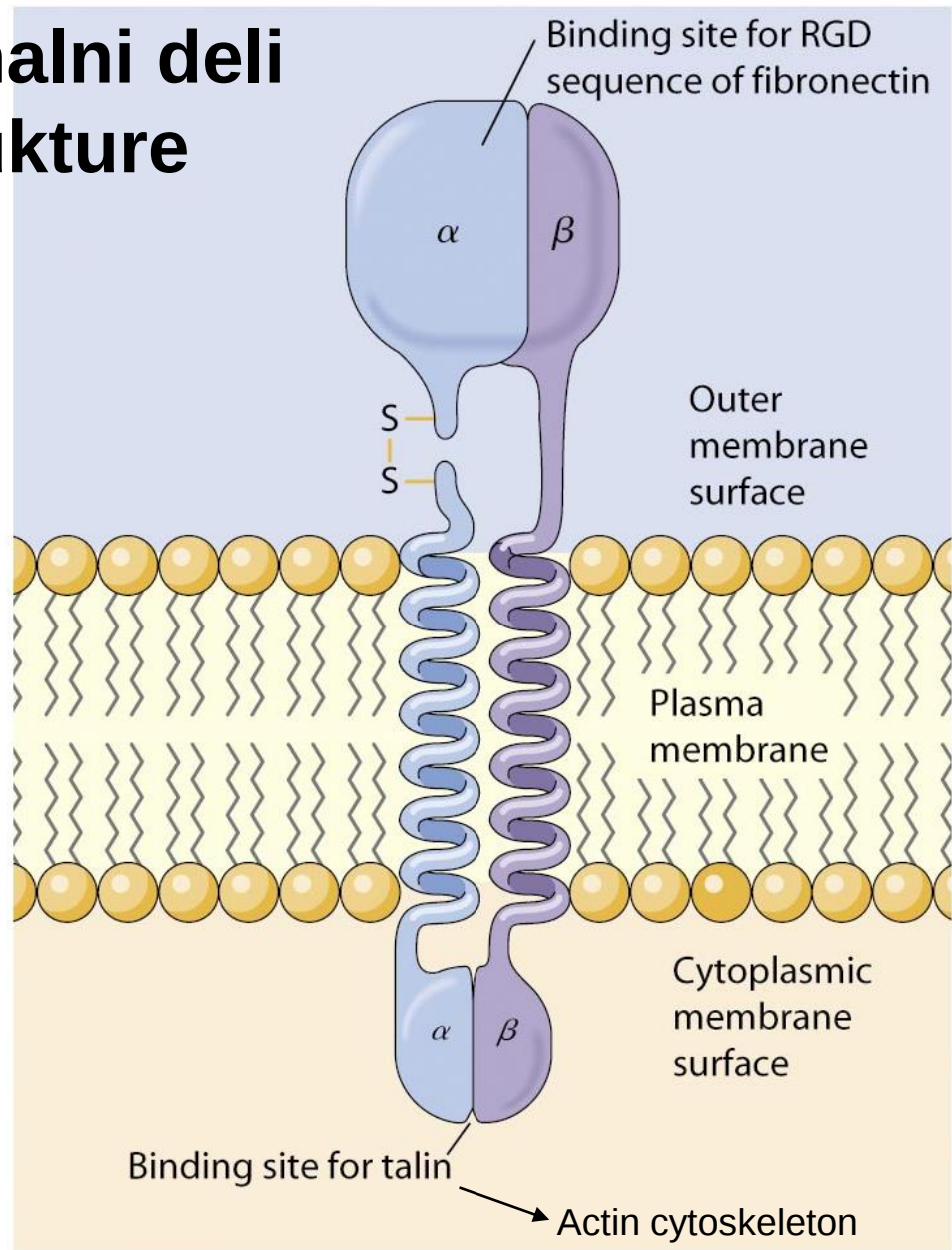
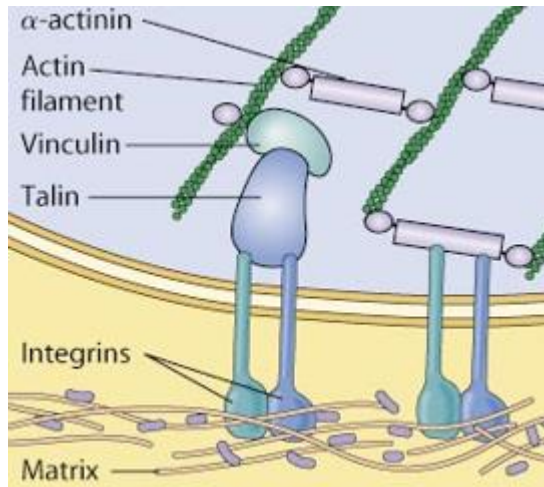




Integrini: $\alpha\beta$ heterodimeri (sesalci: ~24 različnih kombinacij ene od 18 α in ene od 8 β podenot).

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
$\beta_1^{\dagger}$	α_1	Collagens, laminin
	α_2	Collagens, laminin
	$\alpha_3^{\dagger}$	Fibronectin, laminin
	α_4	Fibronectin; VCAM-1
	α_5	Fibronectin
	$\alpha_6^{\dagger}$	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
$\beta_3^{\dagger}$	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)



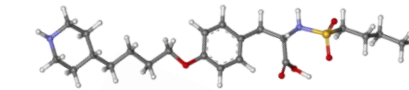
Puščavska pursa ali **efa** (*Echis carinatus*)

Echistatin (RGD-Dis)

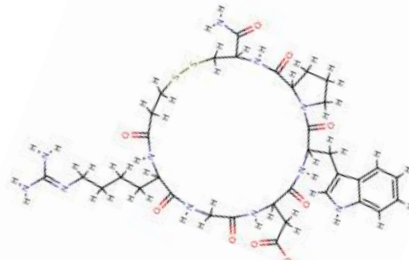


Floridska talna klopotača (*Sistrurus miliarius barbouri*)

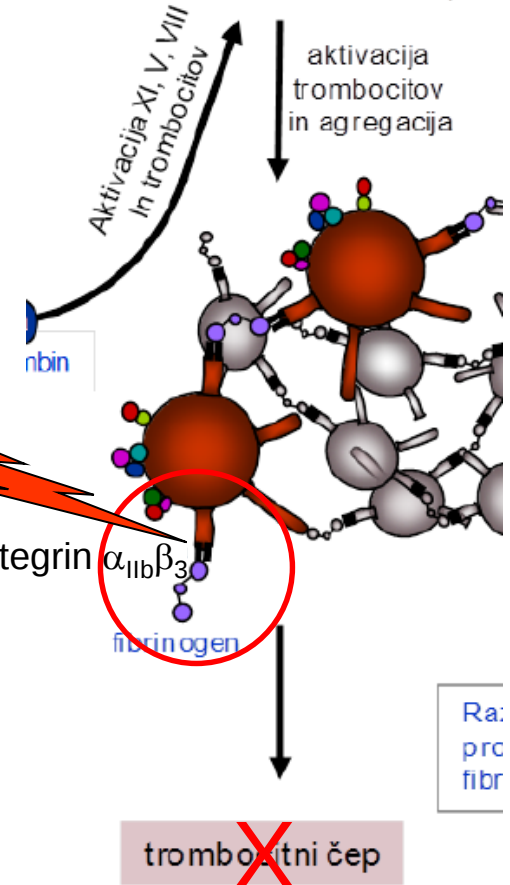
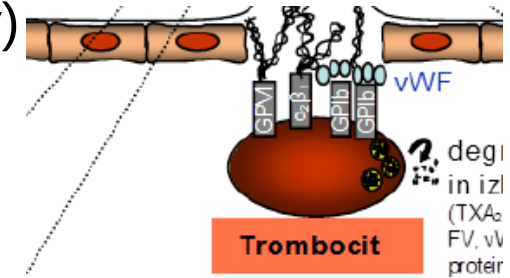
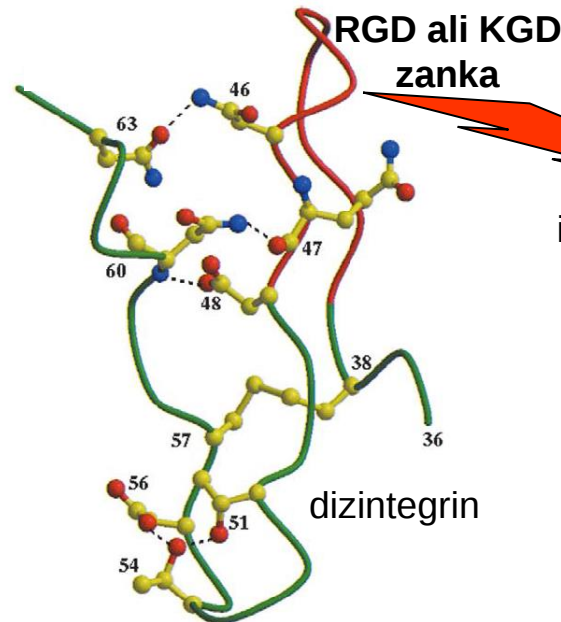
Barbourin (KGD-Dis)



Tirofiban (FDA; Aggrastat®)

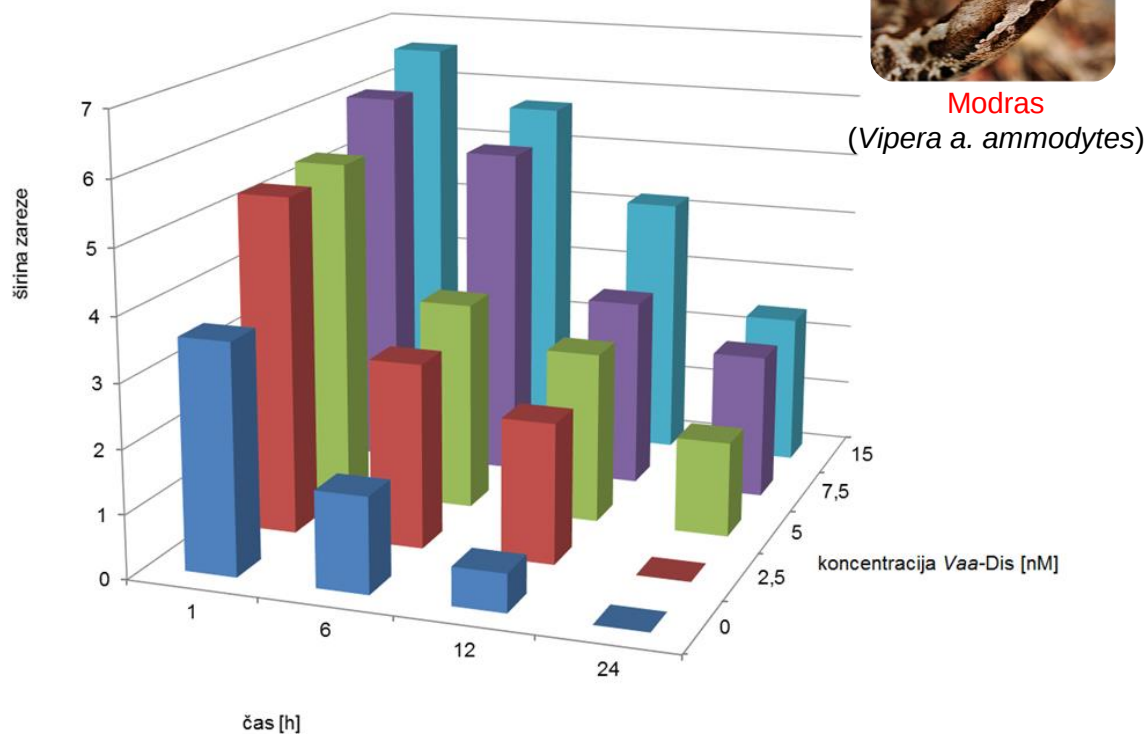
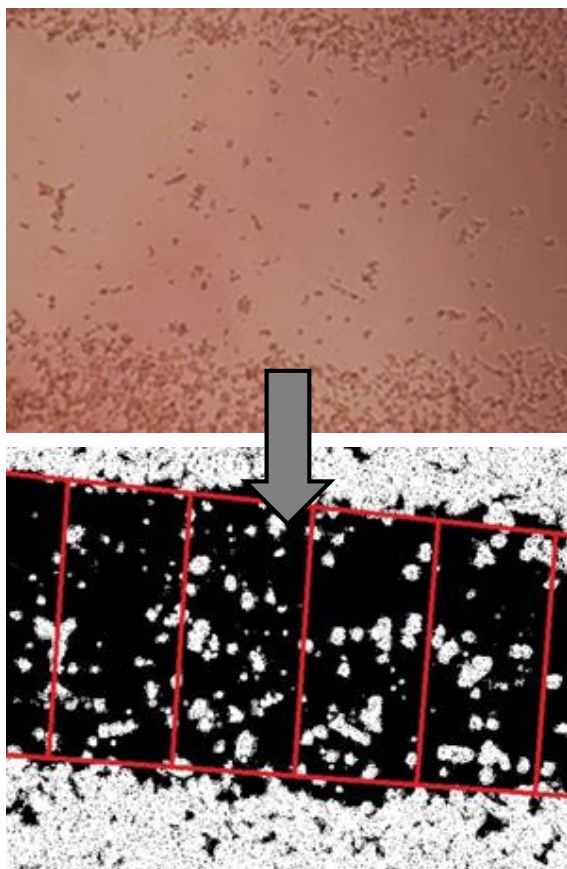


Eptifibatide (FDA, Integrilin®)



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

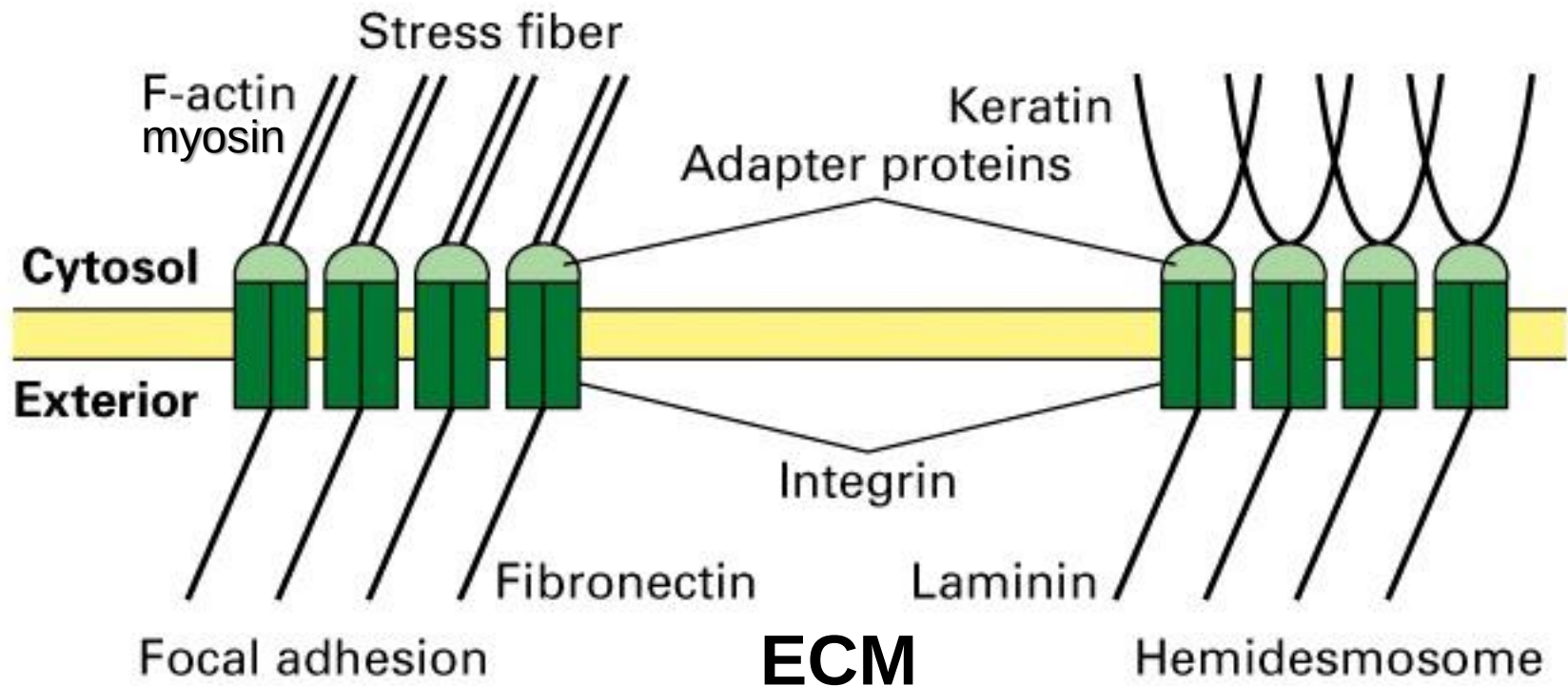
Ocena antimetastatskega potenciala Vaa-Dis na celicah raka dojke
MDA-MB-231 s testom celične rane



Modras
(*Vipera a. ammodytes*)

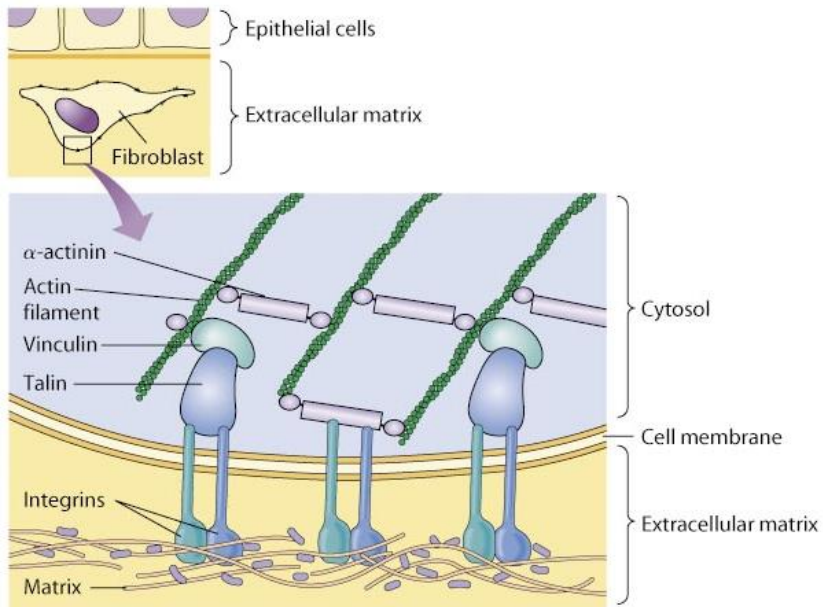
Latinović et al. (2017): Disintegrins from the venom of *Vipera a. ammodytes* efficiently inhibit migration of breast cancer cells. *Acta Chimica Slovenica* 64, 555-559.

Povezave celic z ECM preko integrinov

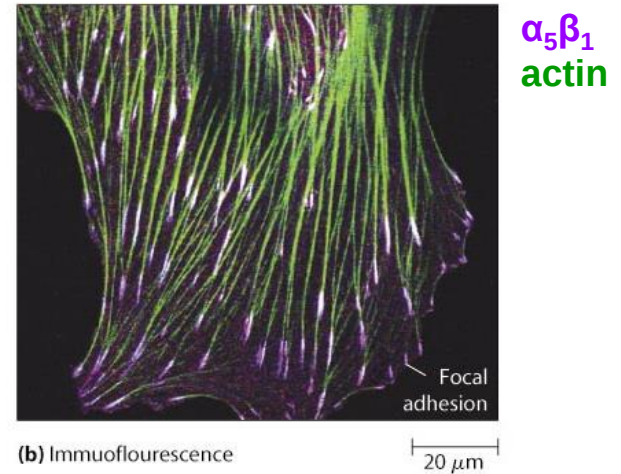


Npr. pri fibroblastih, kožnih keratinocitih in epiteljskih celicah

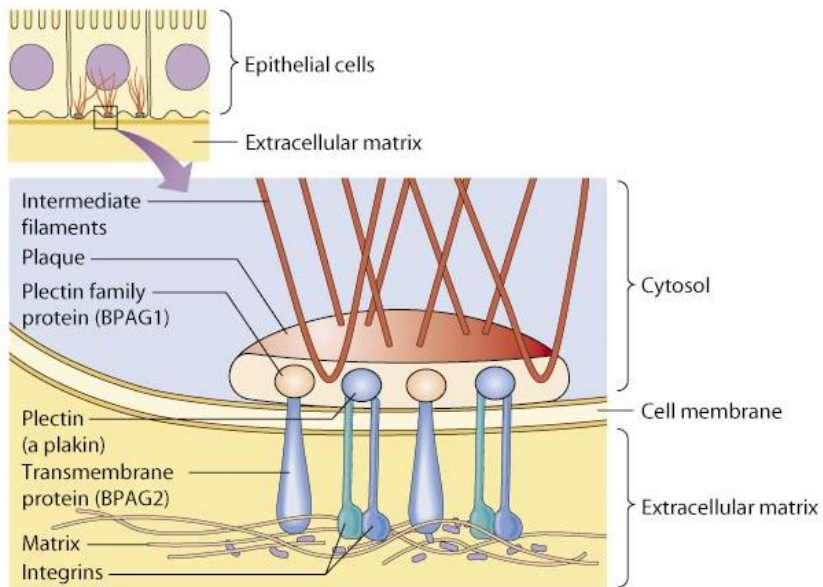
- **Fokalne adhezije:** vzdržujejo obliko celice, prenašajo mehanske in druge regulatorne signale (za rast, migracijo) z ECM na celico
- **Hemidezmosomi:** povečujejo rigidnost epitelnega tkiva



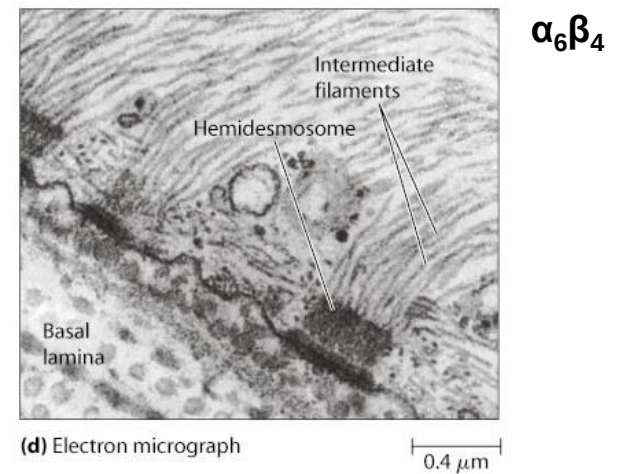
(a) Focal adhesion



(b) Immunofluorescence



(c) Hemidesmosome



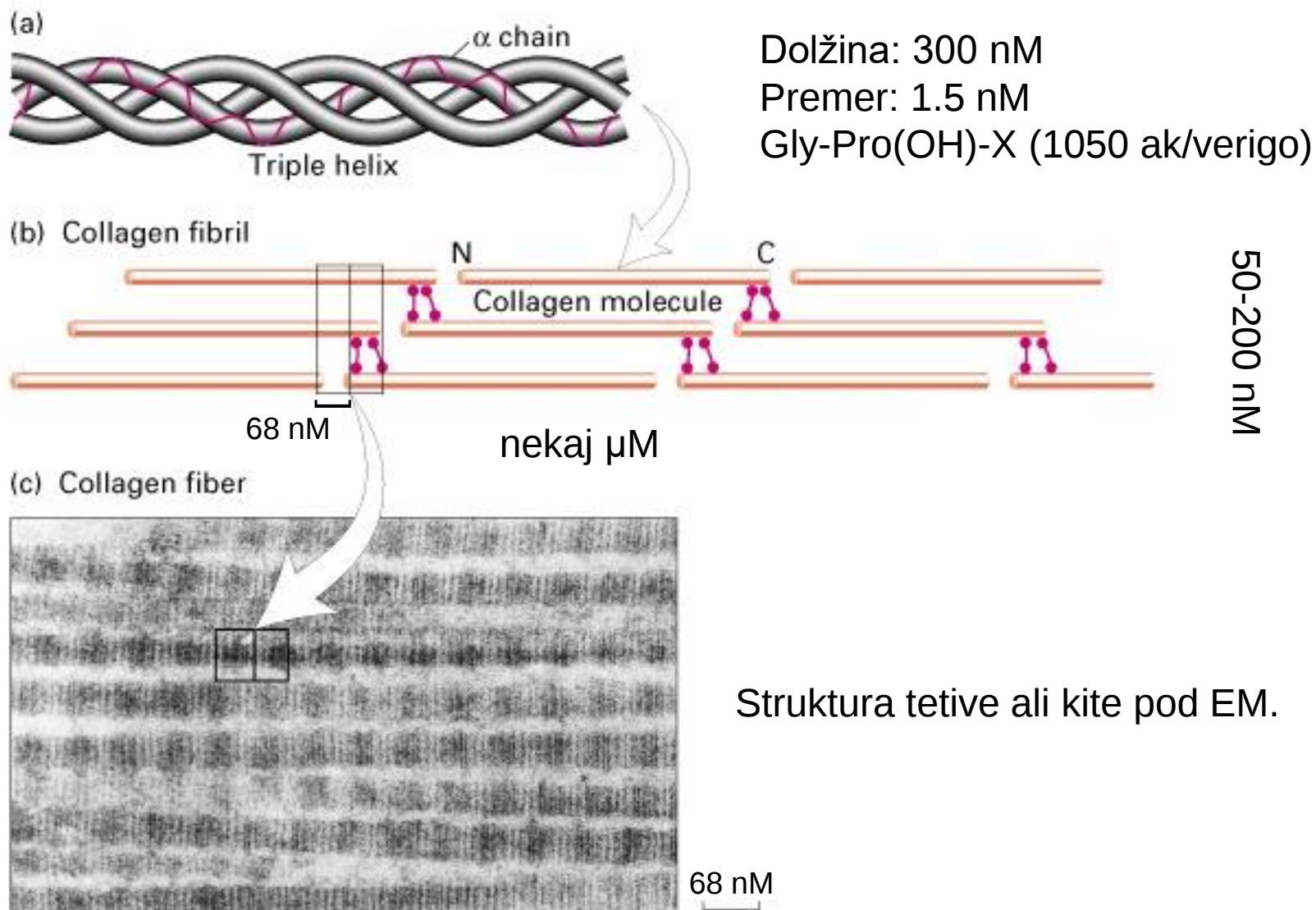
(d) Electron micrograph

Razdelitev poglavja

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

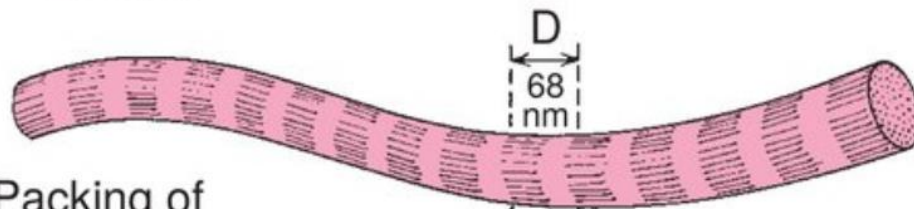
Kolageni

- najpogostejši proteini v živalskem svetu
- izločajo jih fibroblasti in epitelijske 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

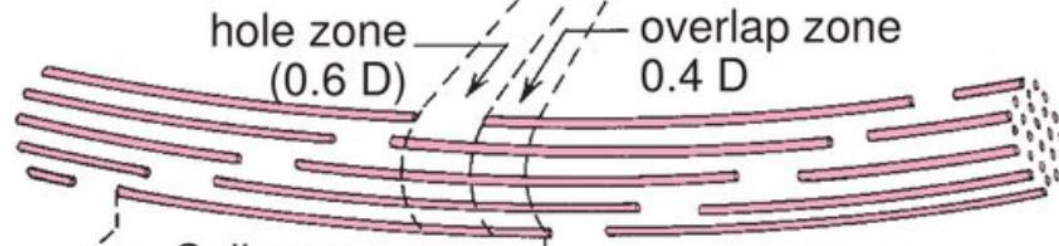


Na mg je kolagensko vlakno tipa I močnejše od jeklenega vlakna!

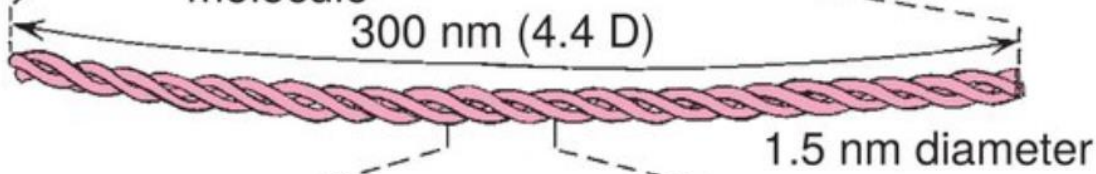
a. Fibril



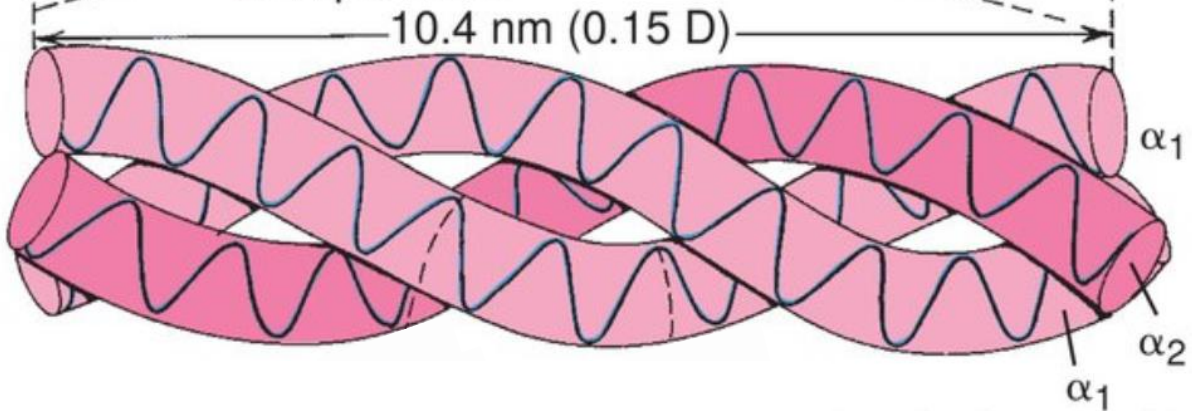
b. Packing of molecules

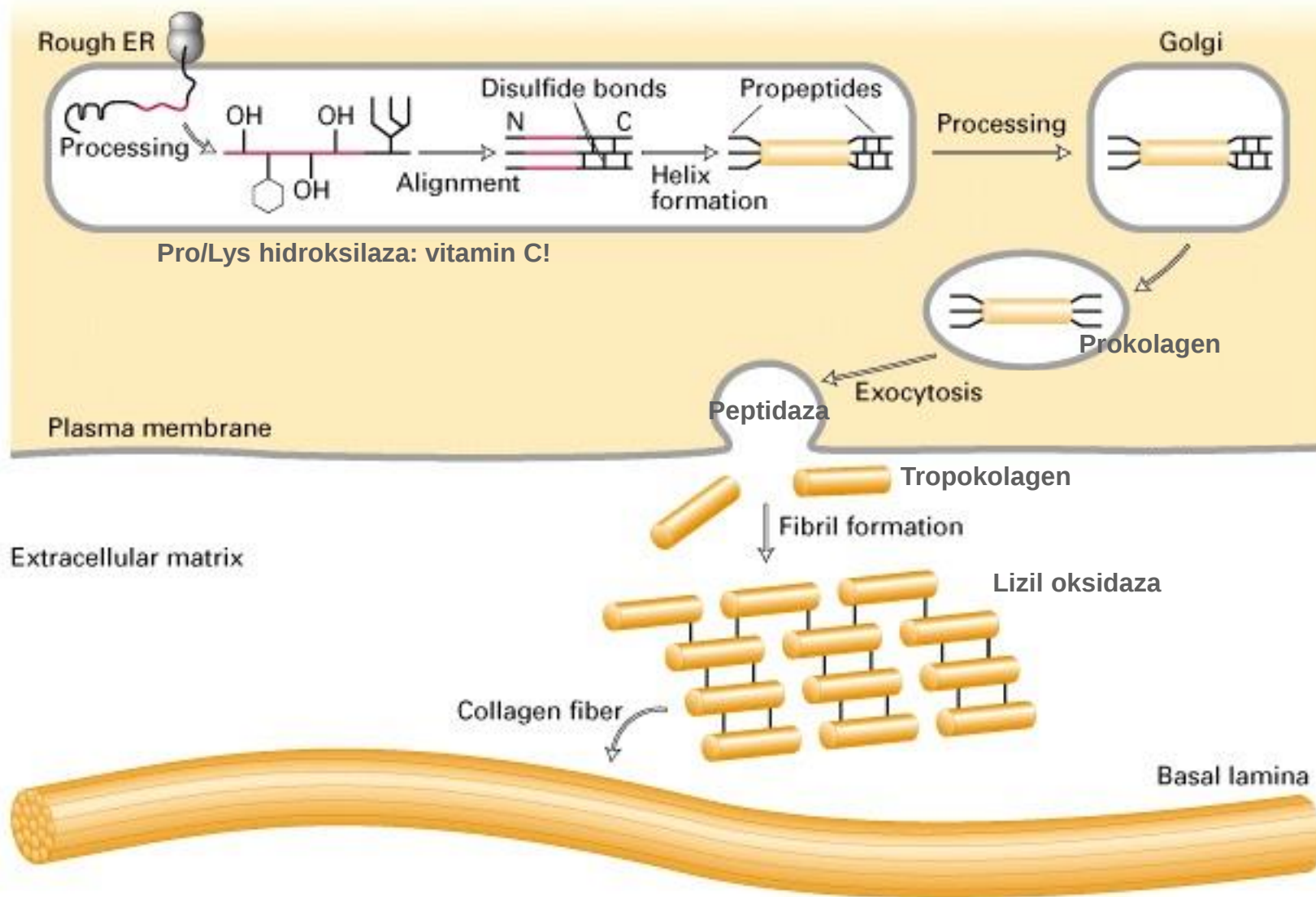


c. Collagen molecule

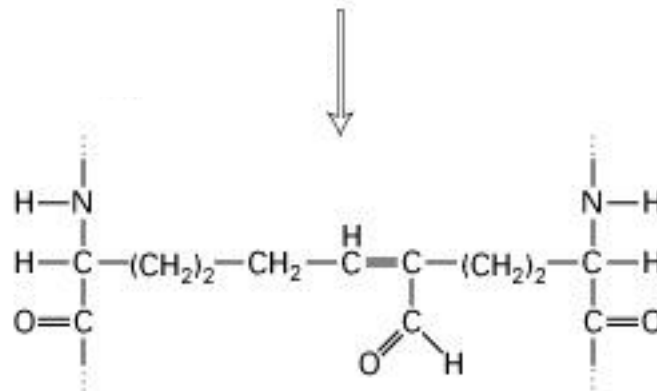
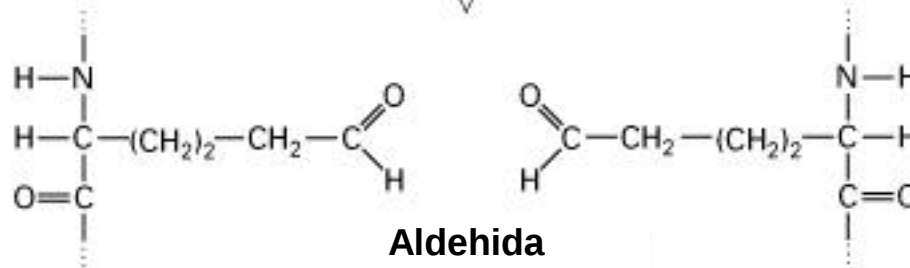
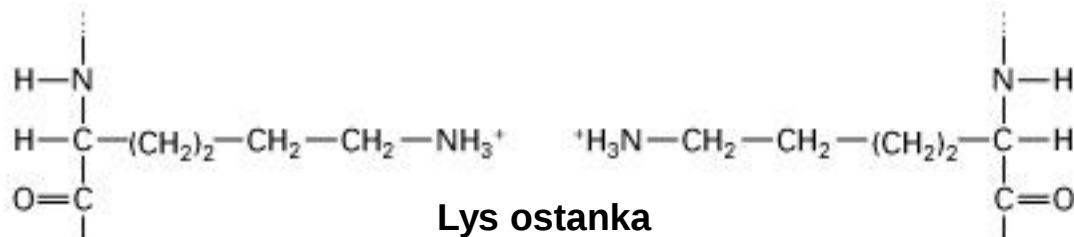


d. Triple helix





Prečno povezovanje kolagenskih molekul

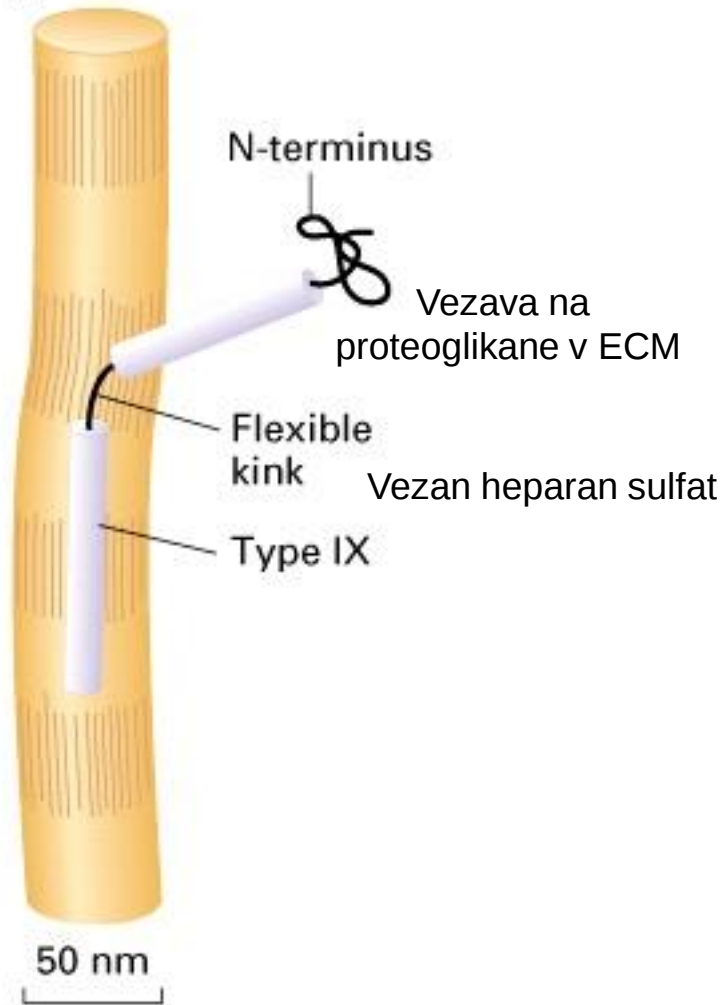


Produkt aldolne
kondenzacije

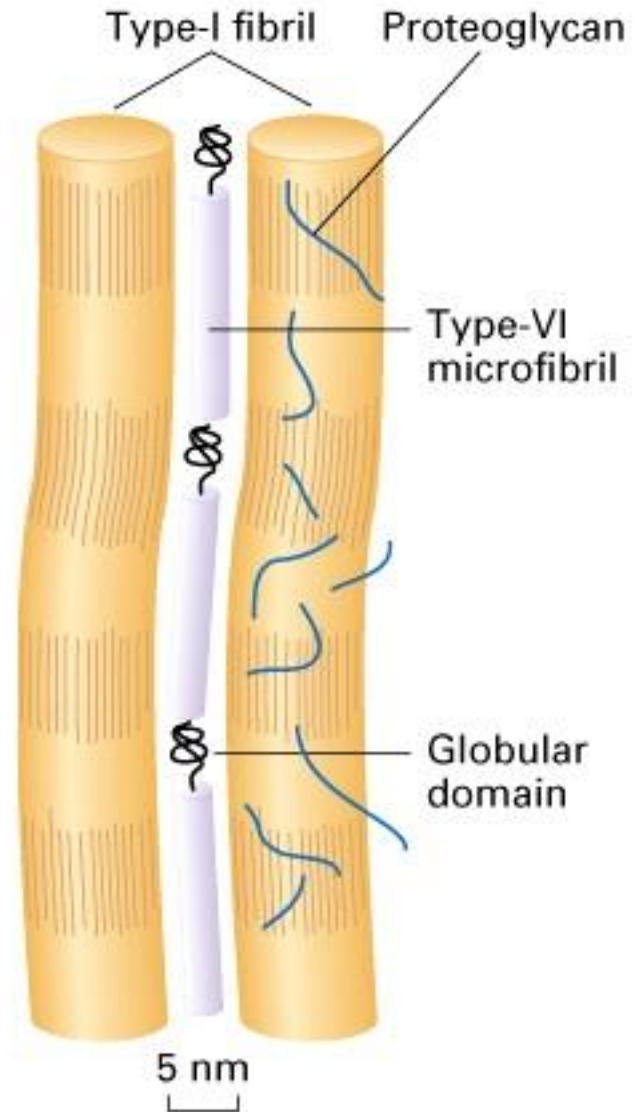
Glavne kolagenske molekule

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

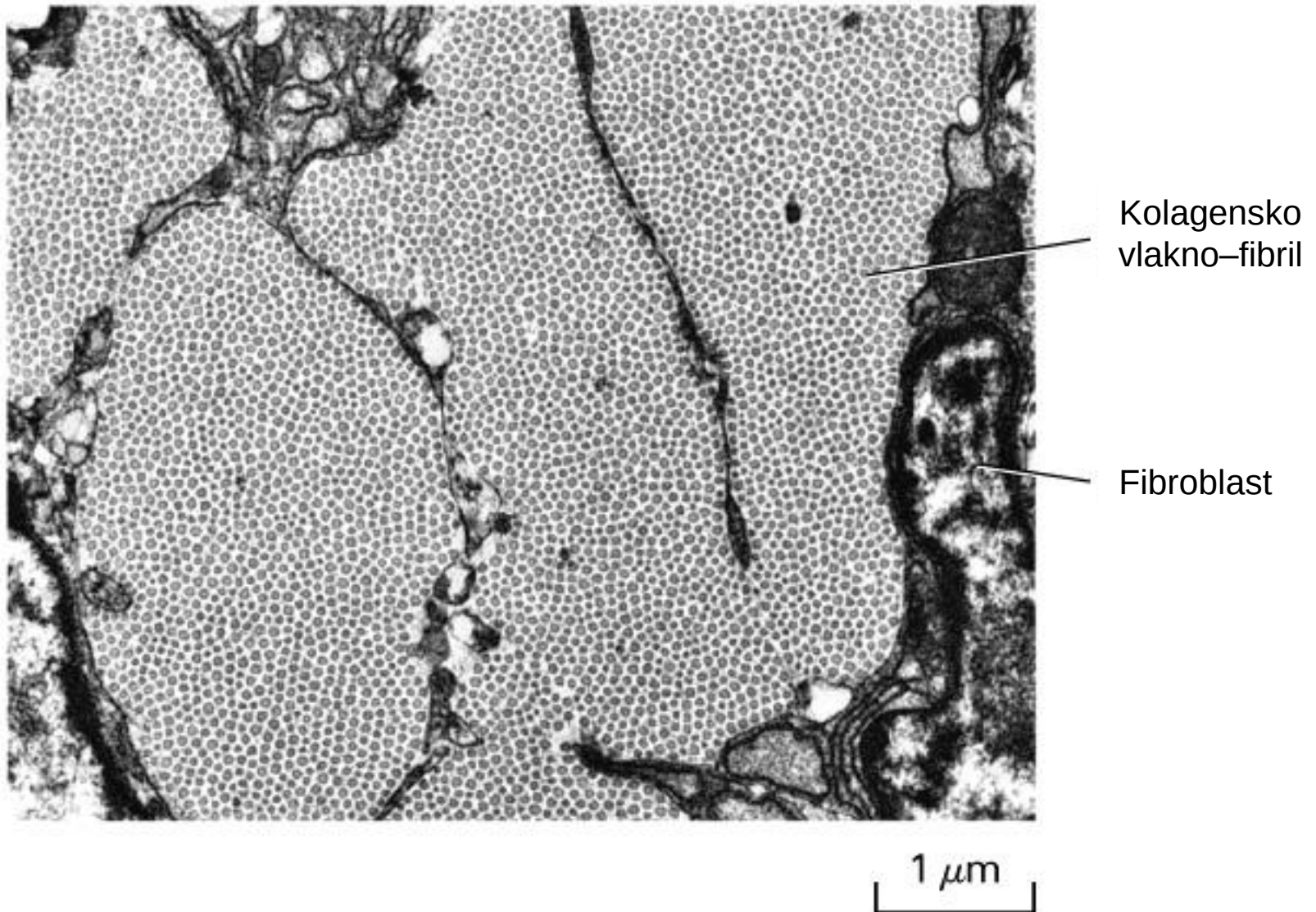
Type-II fibril



Glavna kolagenska sestavina hrustanca.
Odpornost proti večjim deformacijam oblike.

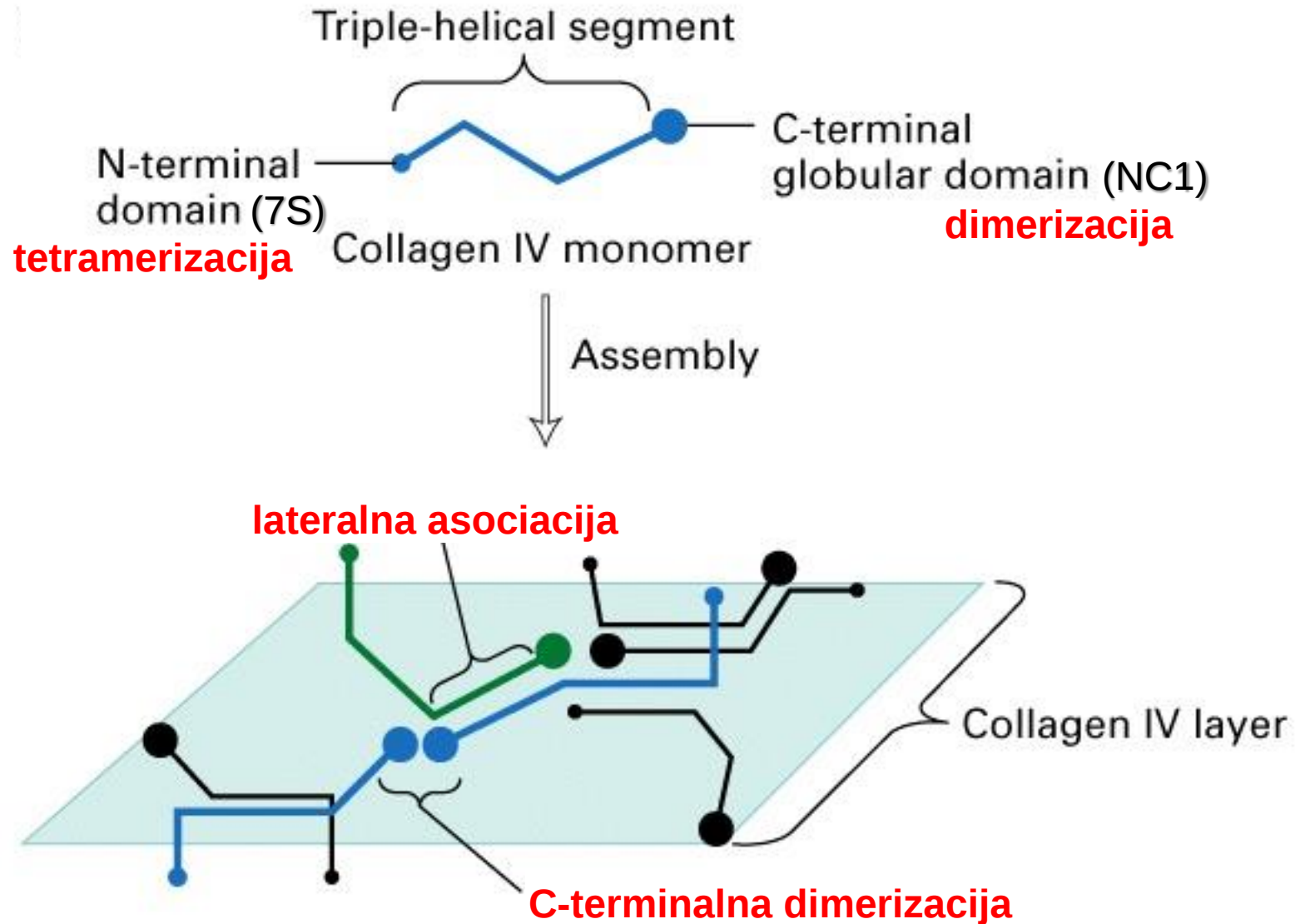


Bolj debela kolagenska vlakna
v tetivi oz. kiti.

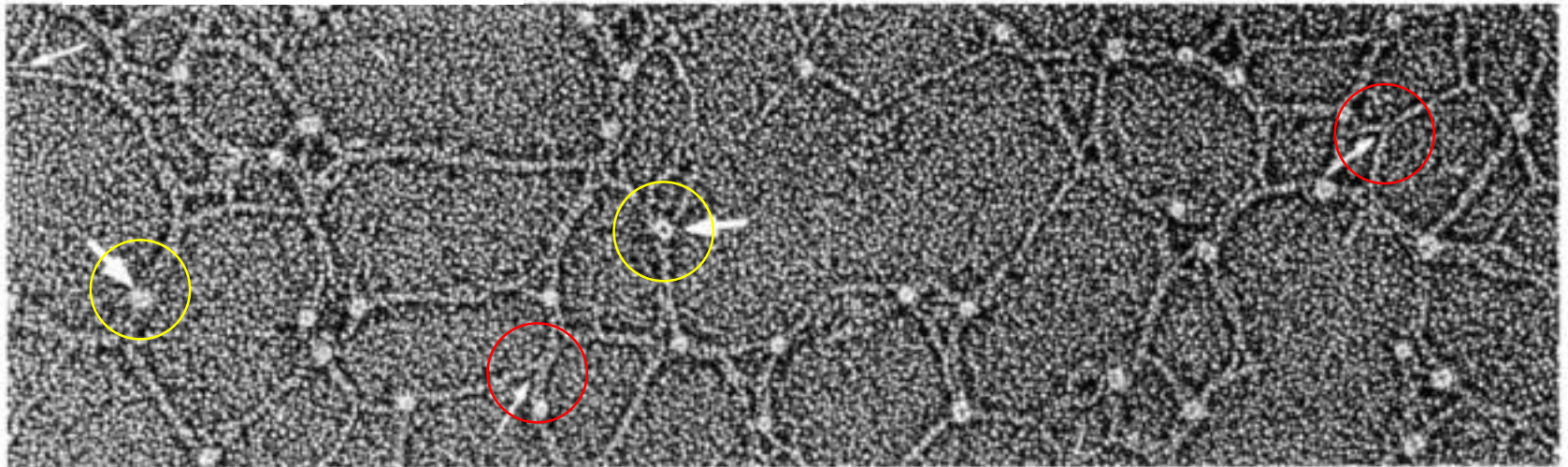


Prerez skozi kito: zgrajena je pretežno iz kolagenskih vlaken (fibrilov), ki jih sestavljajo molekule kolagena tipa I.

prekinitve v Gly-Pro(OH)-X ponovitvah $\Rightarrow$ **fleksibilnost**



Dvodimenzionalna mreža kolagena tipa IV ...

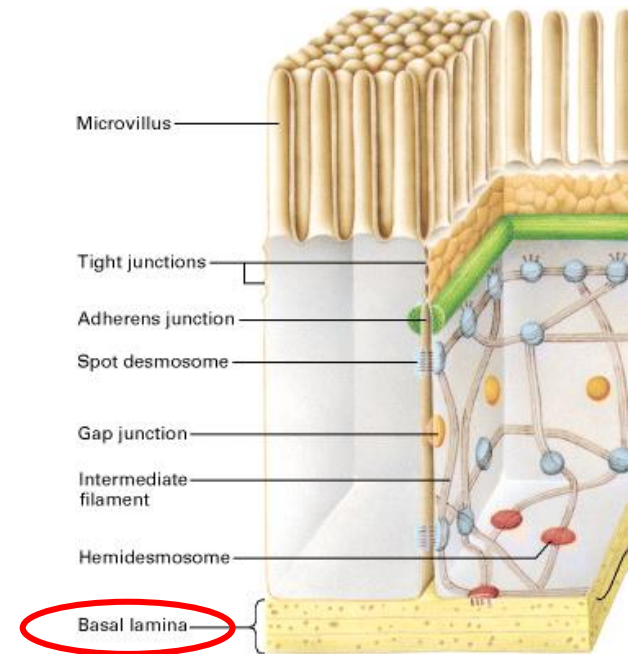


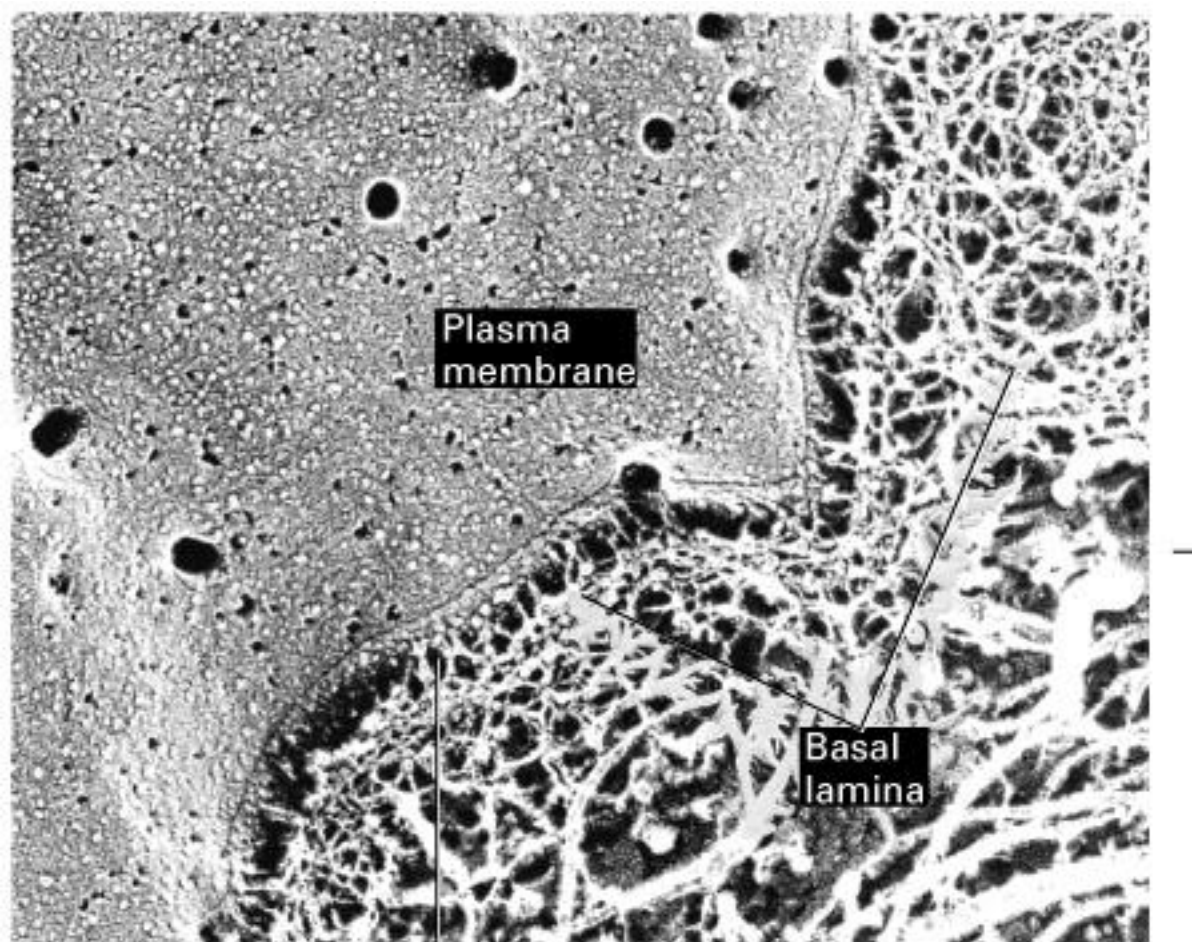
250 nm

... je osnova za tvorbo strukture – BAZALNE LAMINE

Bazalna lamina

- 60–100 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)



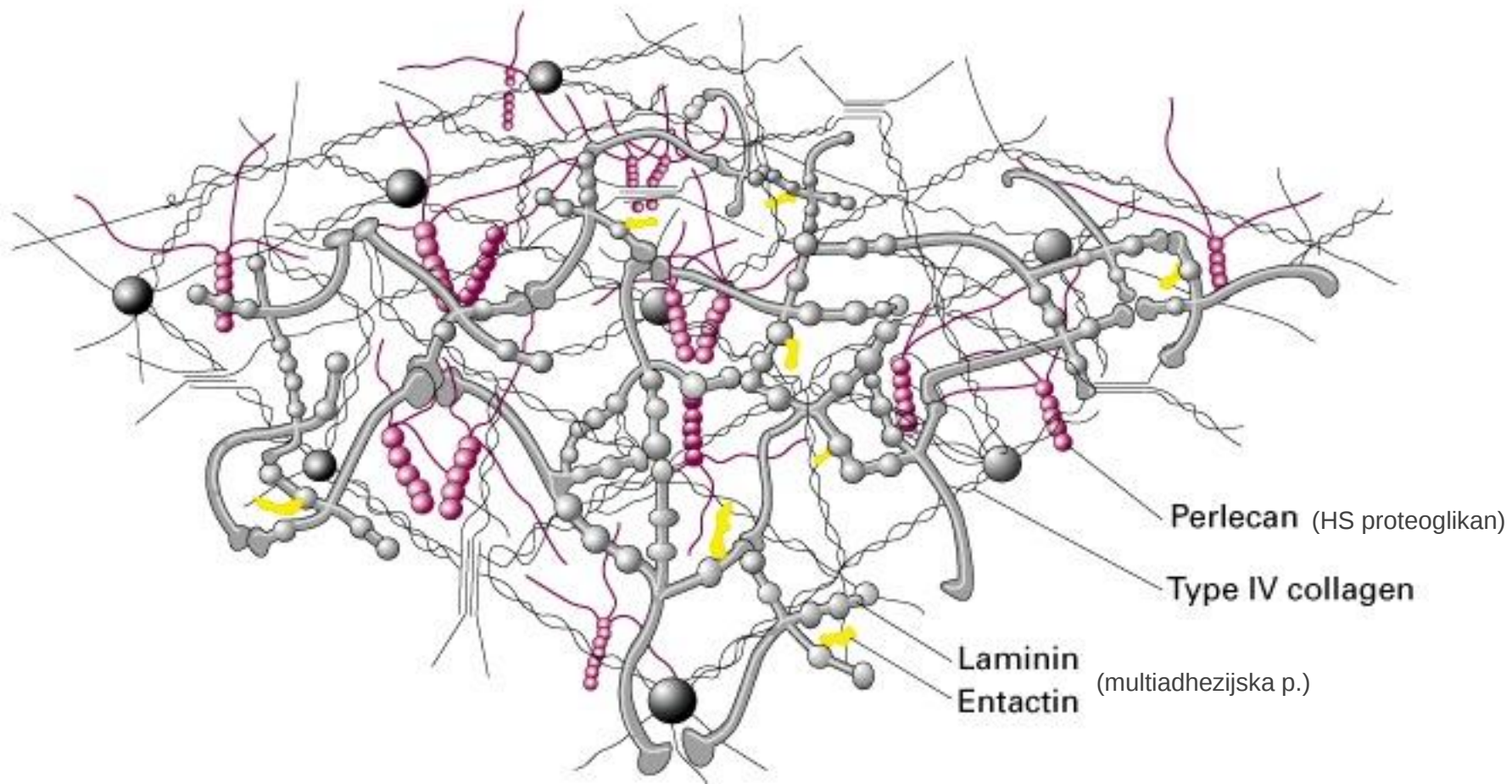


Plasma
membrane

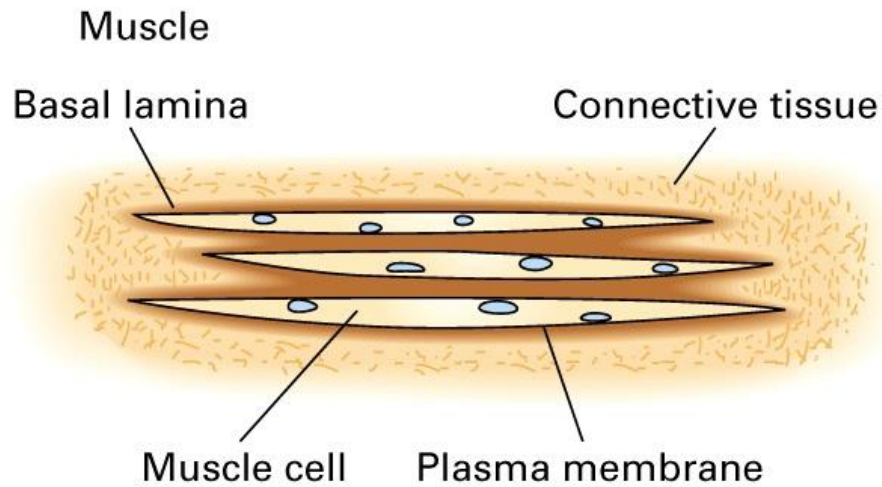
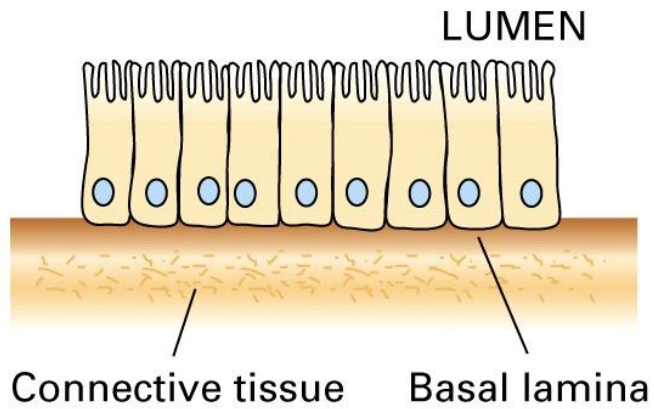
Basal
lamina

Cell-surface
receptor proteins

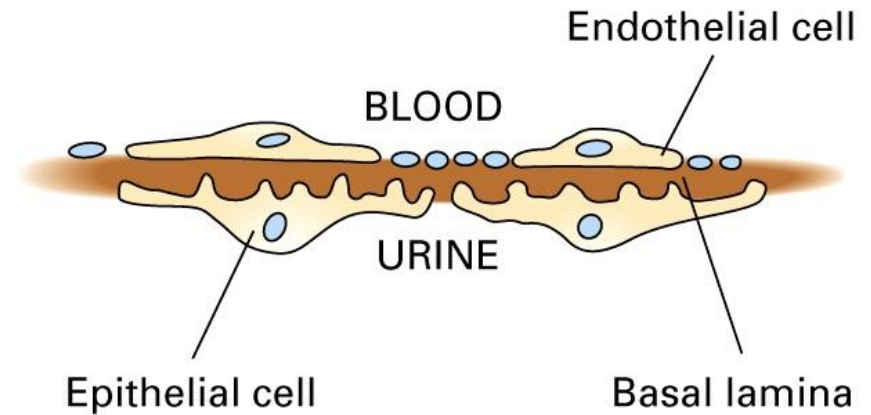
Collagen
fibers



Epithelial sheet



Kidney glomerulus



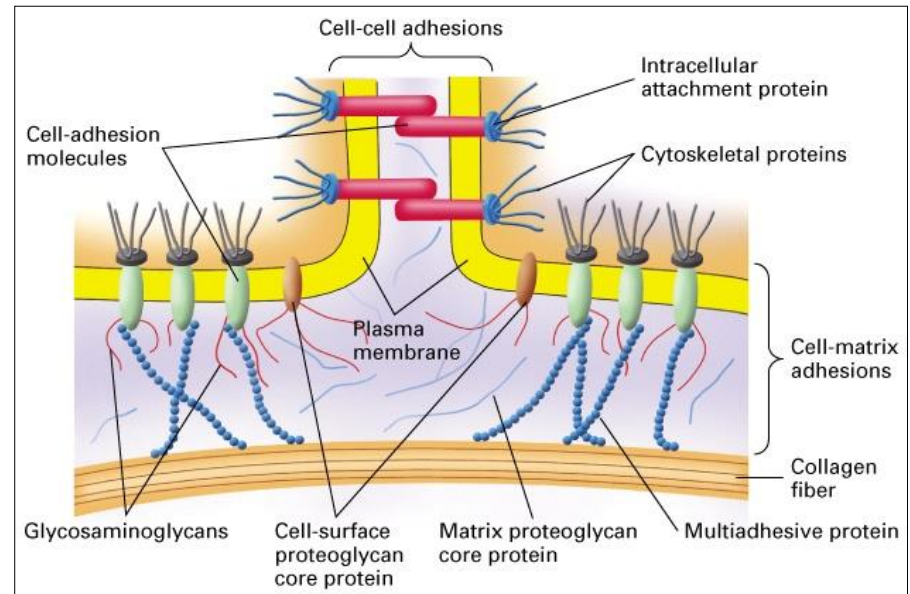
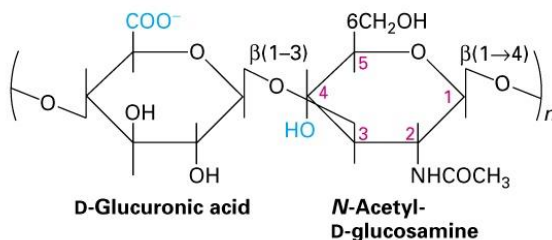
Razdelitev poglavja

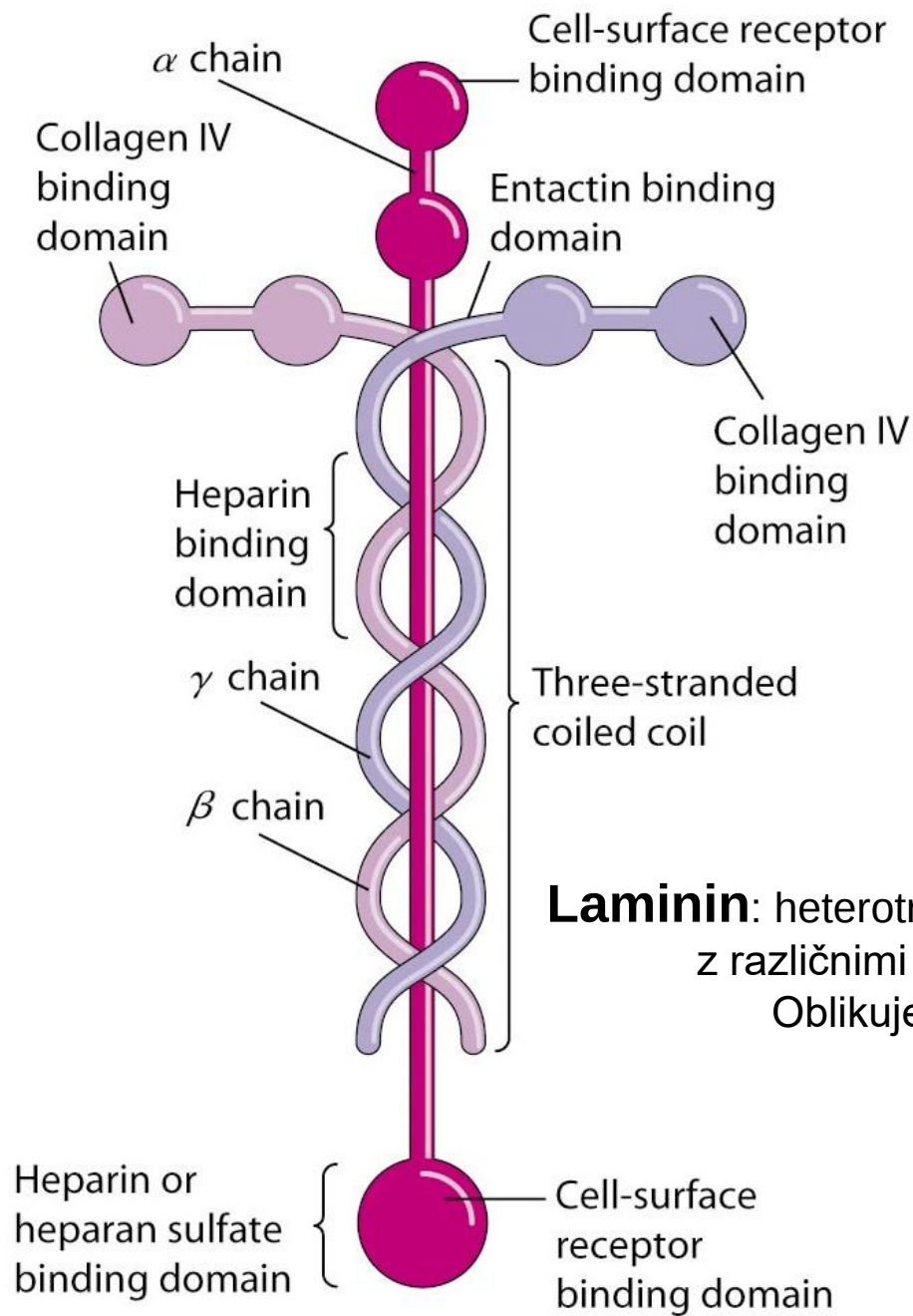
- Pritrjevanje celic in komuniciranje med njimi
- Pritrjevanje celic na medceličnino
- Kolageni v medceličnini
- **Nekolagenske sestavine medceličnine**

Nekolagenske sestavine medceličnine

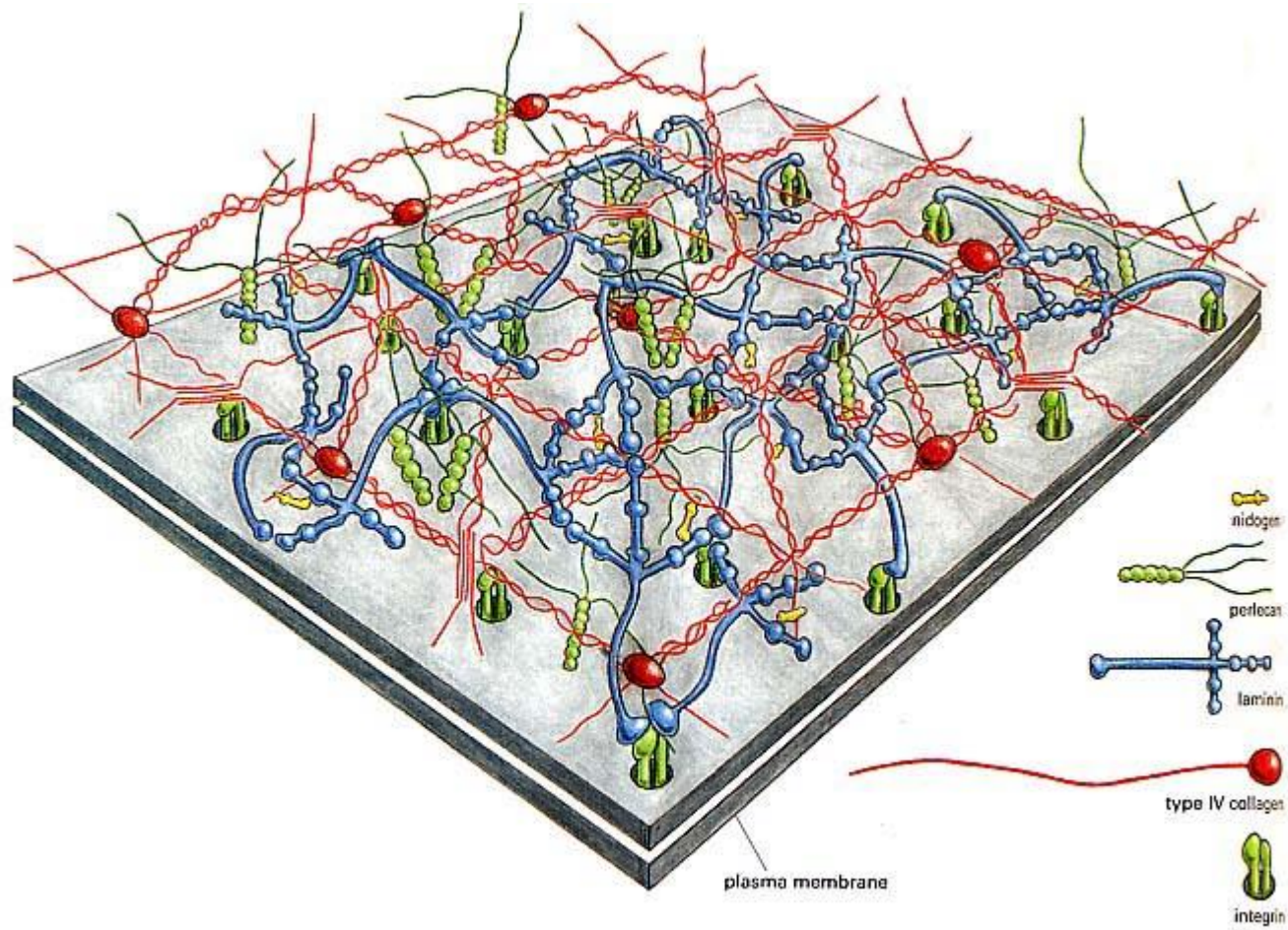
- **Multiadhezijski proteini:** povezujejo komponente ECM, ECM in celice (preko CAM) ter vežejo različne molekule (hormone, rastne faktorje, hranila).
- **Proteoglikani:** viskozni, varujejo celice, ustvarjajo volumen.
- **Hialuronan:** polisaharid, ki se hidratizira v gel (prožnost, amortizacija, odpornost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

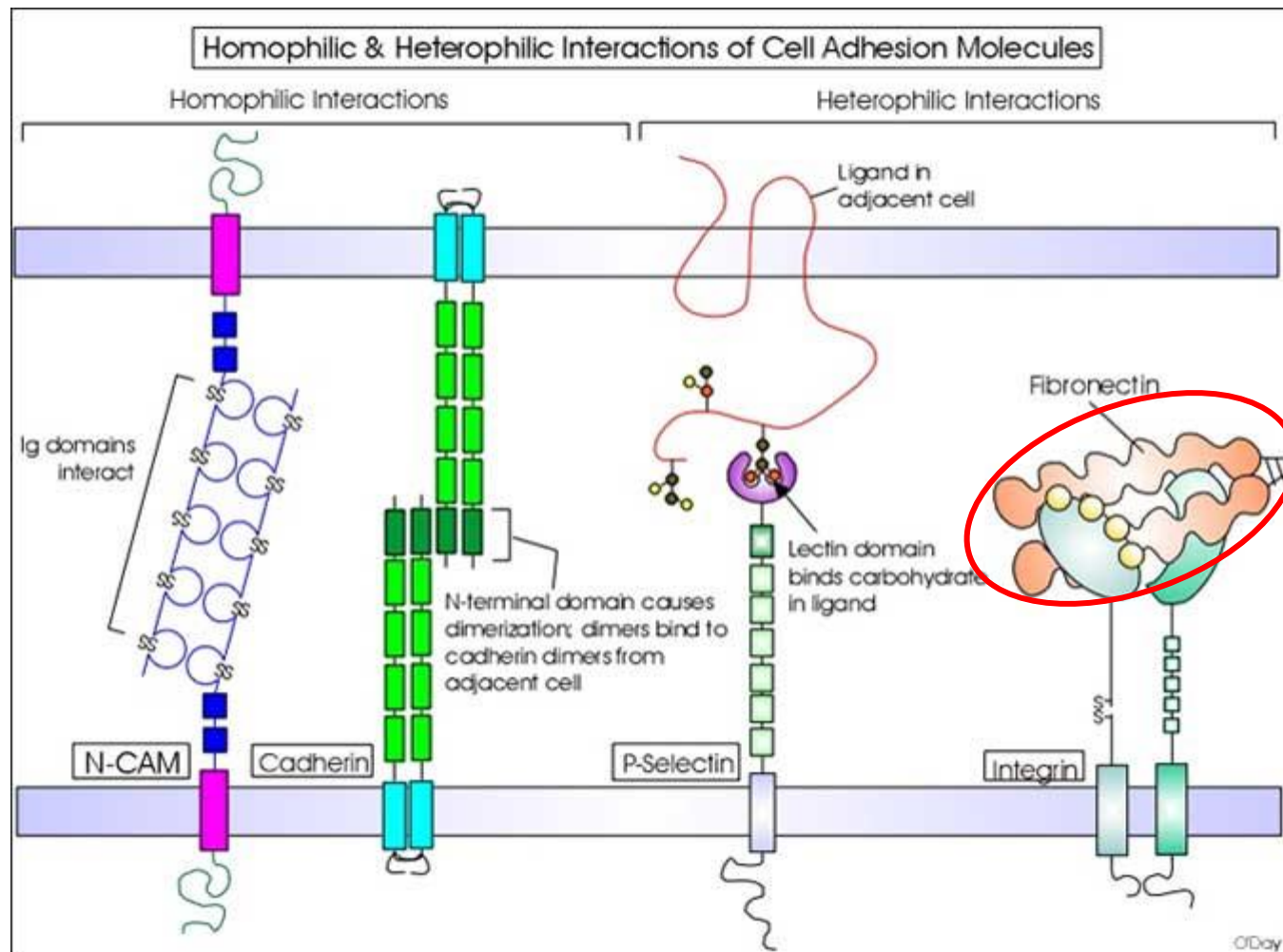
(a) Hyaluron ($n \leq 50,000$)





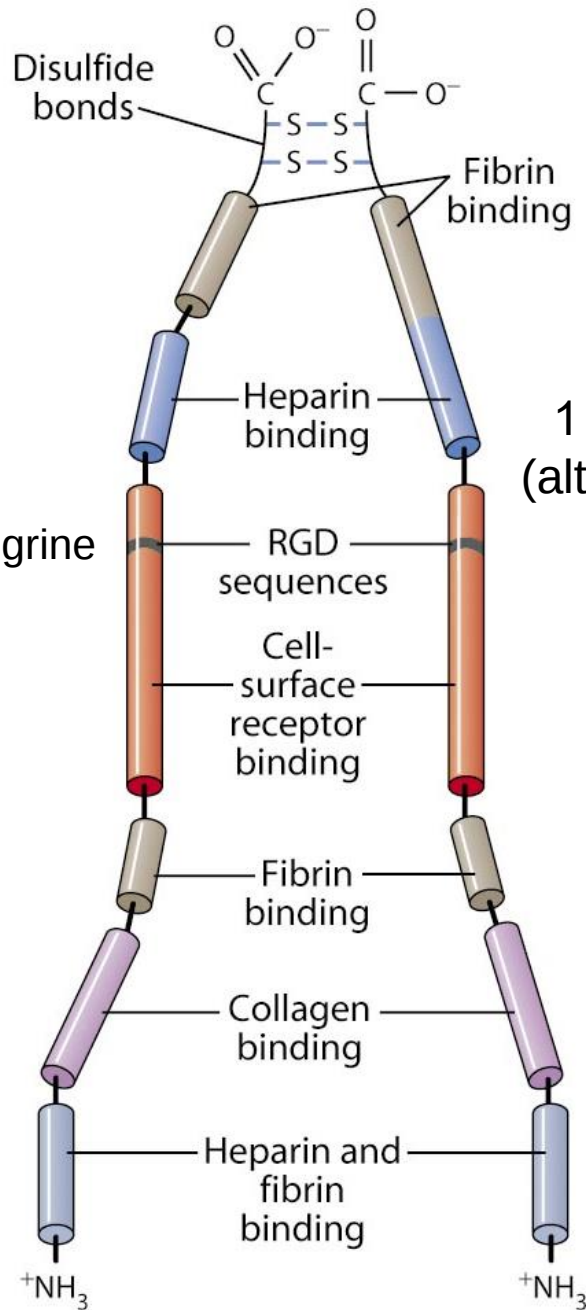
Laminin: heterotrimer, M~820 kDa; izo-oblike z različnimi verigami α (A), β (B) in γ (C). Oblikujejo mrežast preplet z drugimi sestavinami bazalne lamine.





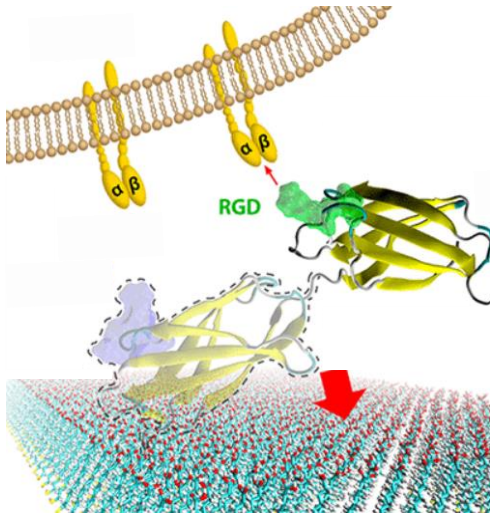
Fibronektin: multiadhezijski protein, s primarno funkcijo povezovanja celic z vlaknastimi kolageni (I, II, III, V). Uravnava organiziranost celičnega skeleta (oblika celice), migracijo in diferenciacijo celic (npr. potovanje imunskih celic na mesto poškodbe, embriogenezo), ...

Fibronektin



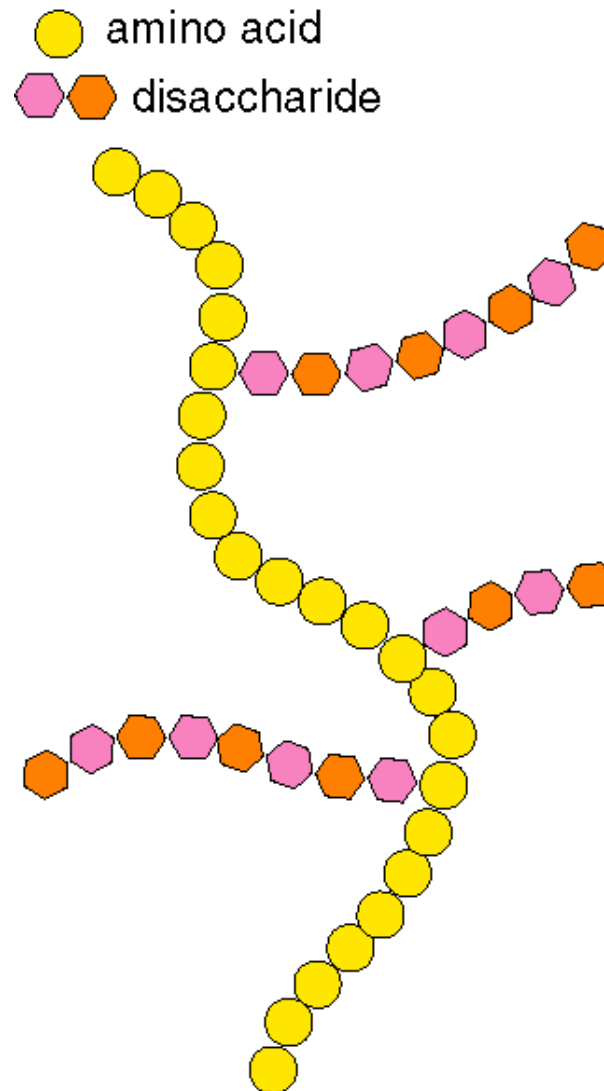
1 gen, vsaj 20 različnih produktov
(alternativno izrezovanje pre-mRNA)

vezava na integrine



Proteoglikani

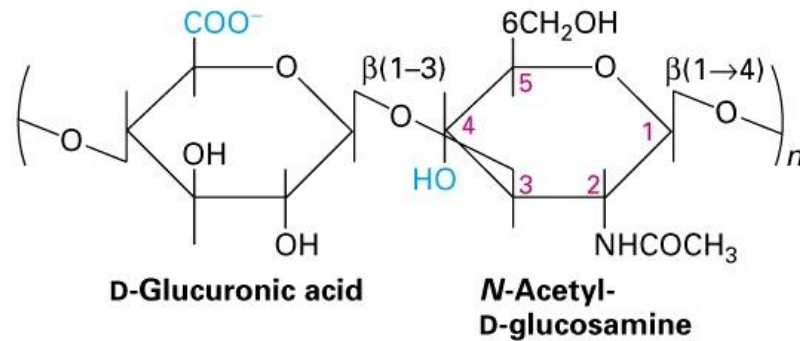
perlecan
agrekan
sindekan



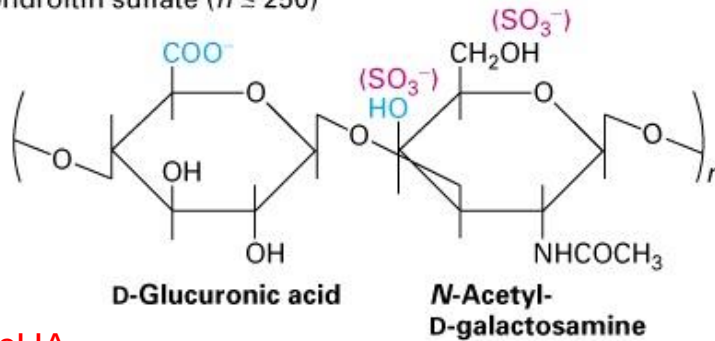
Zgradba proteoglikanov: delež aminokislin je majhen, prevladujejo linearni polimeri disaharidov – glikozaminoglikani (GAG).

Štirje razredi GAG

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

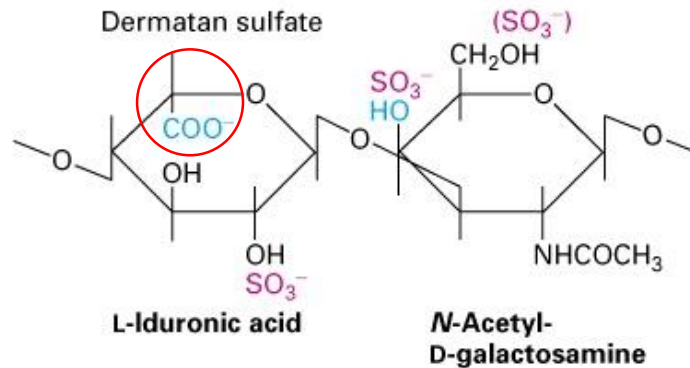


(b) Chondroitin sulfate ($n \leq 250$)

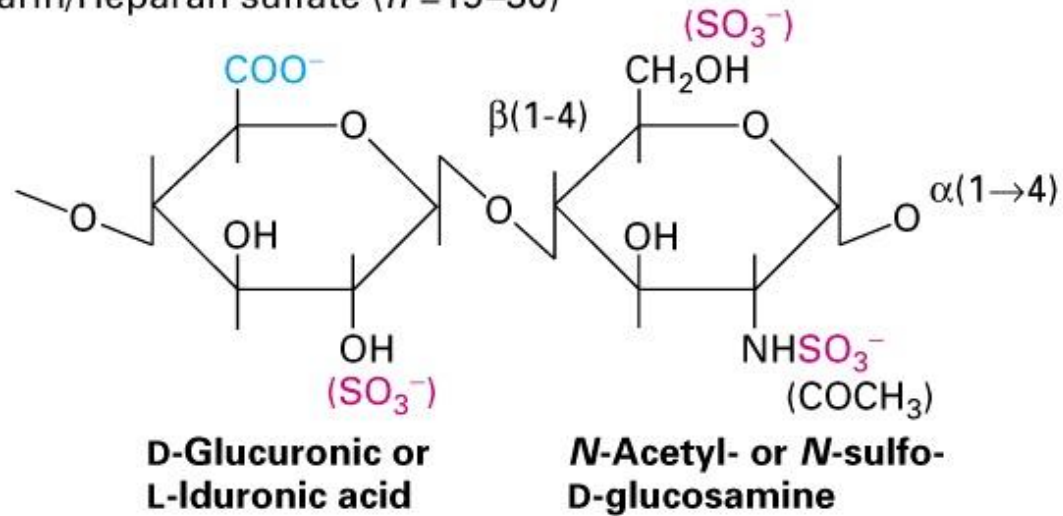


5-epimer D-GlcUA

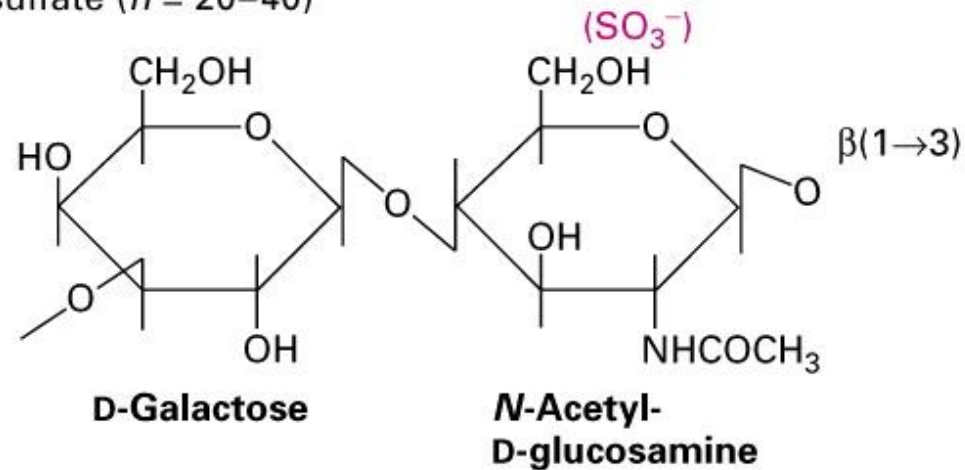
Dermatan sulfate



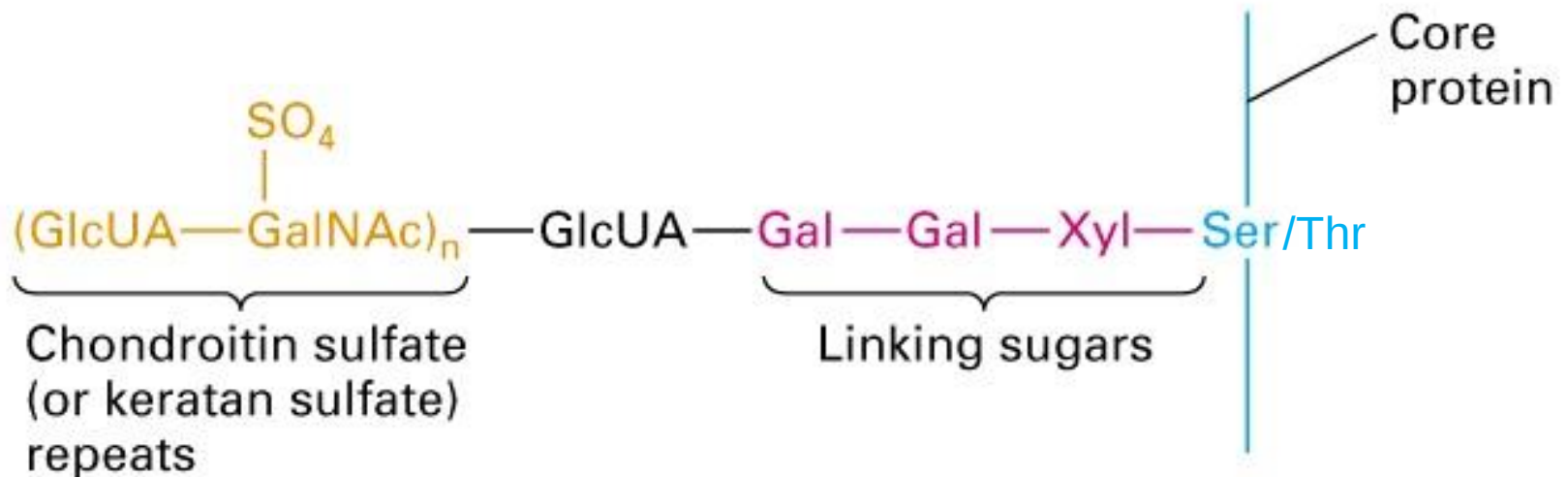
(c) Heparin/Heparan sulfate ($n = 15-30$)



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



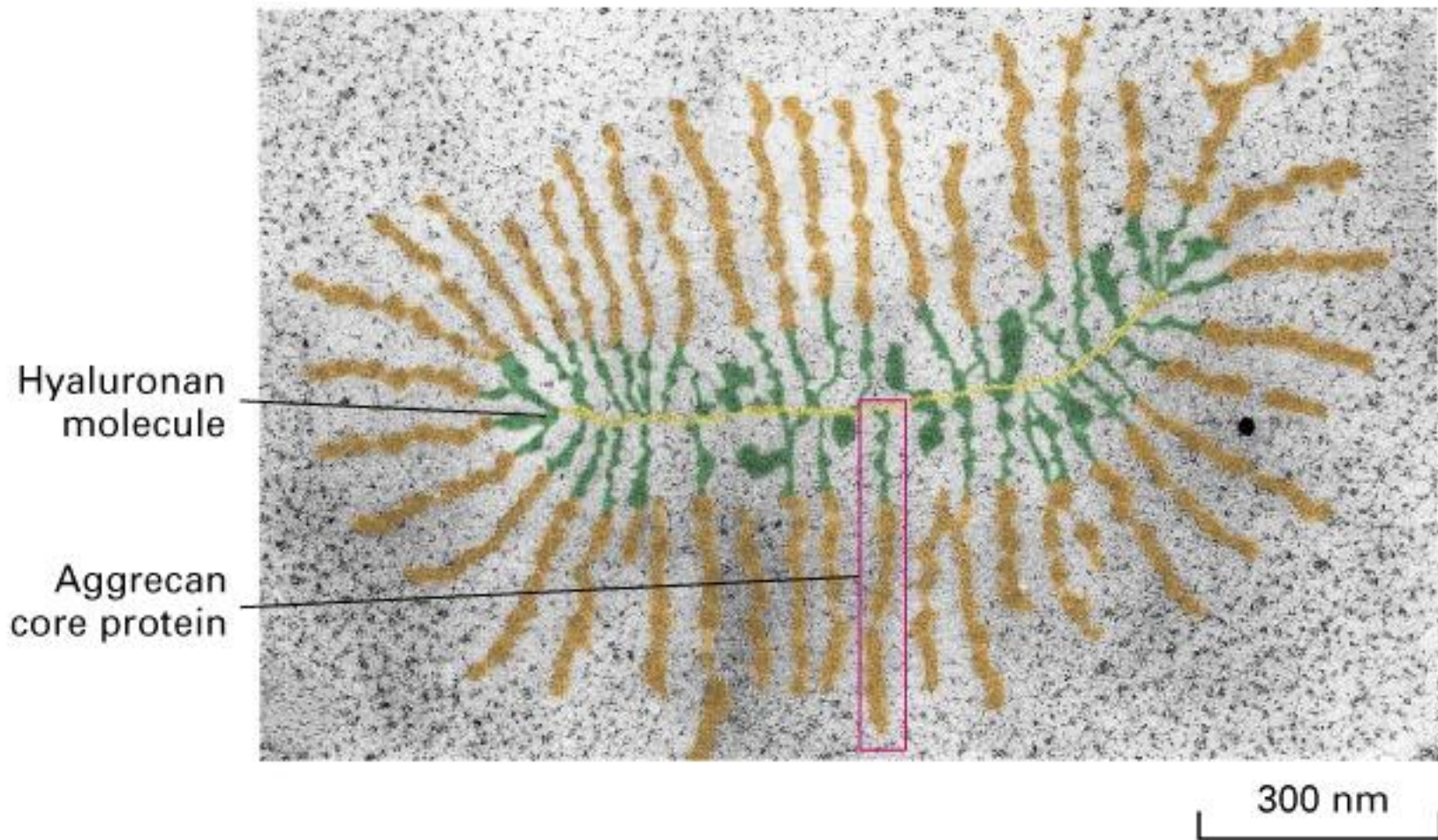
Glikozilacija in sulfatacija proteoglikanov poteka v Golgijevem aparatu



Gal = galactose
GalNAc = *N*-acetylgalactosamine

GlcUA = glucuronic acid
Xyl = xylose

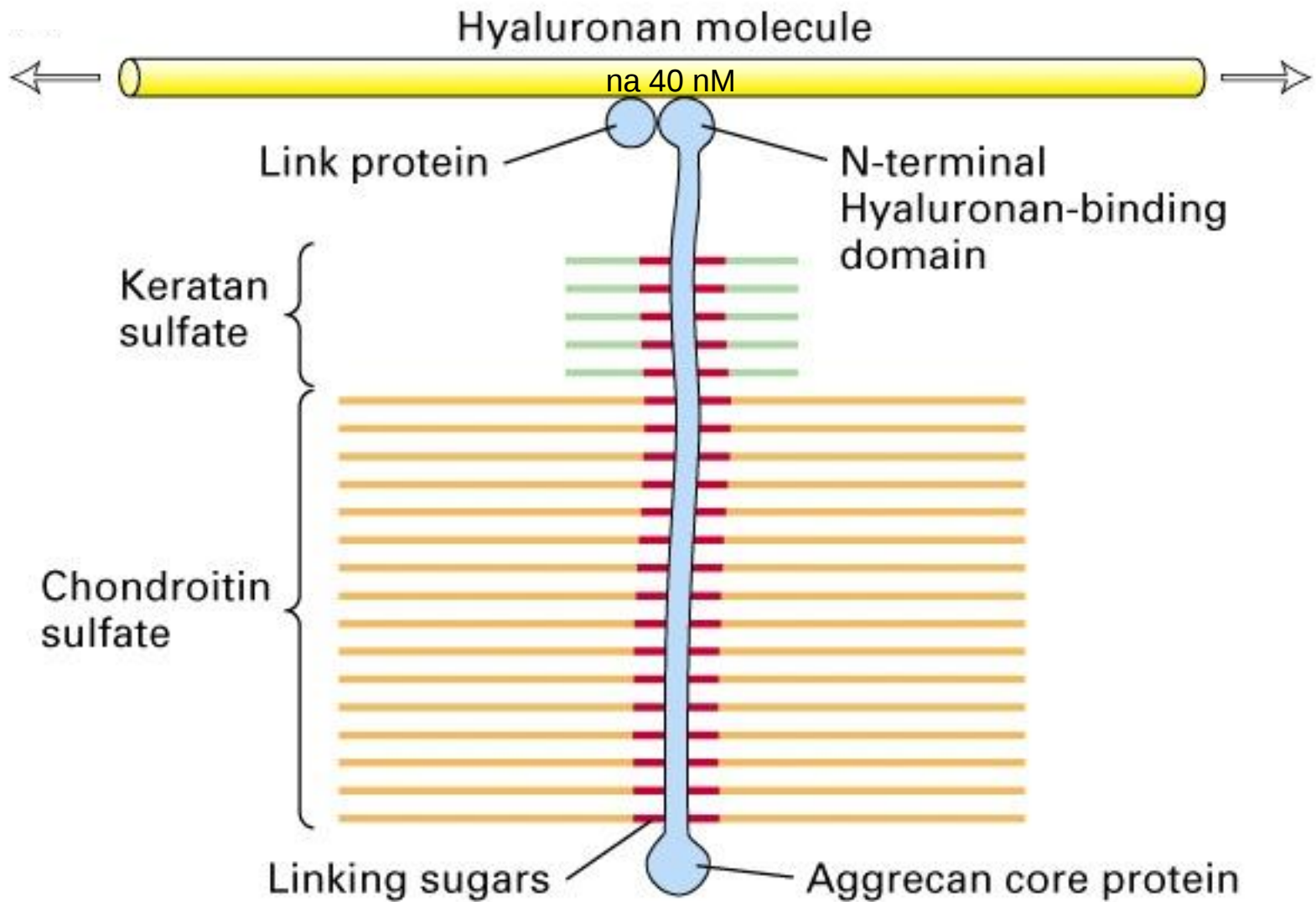
Agrekan



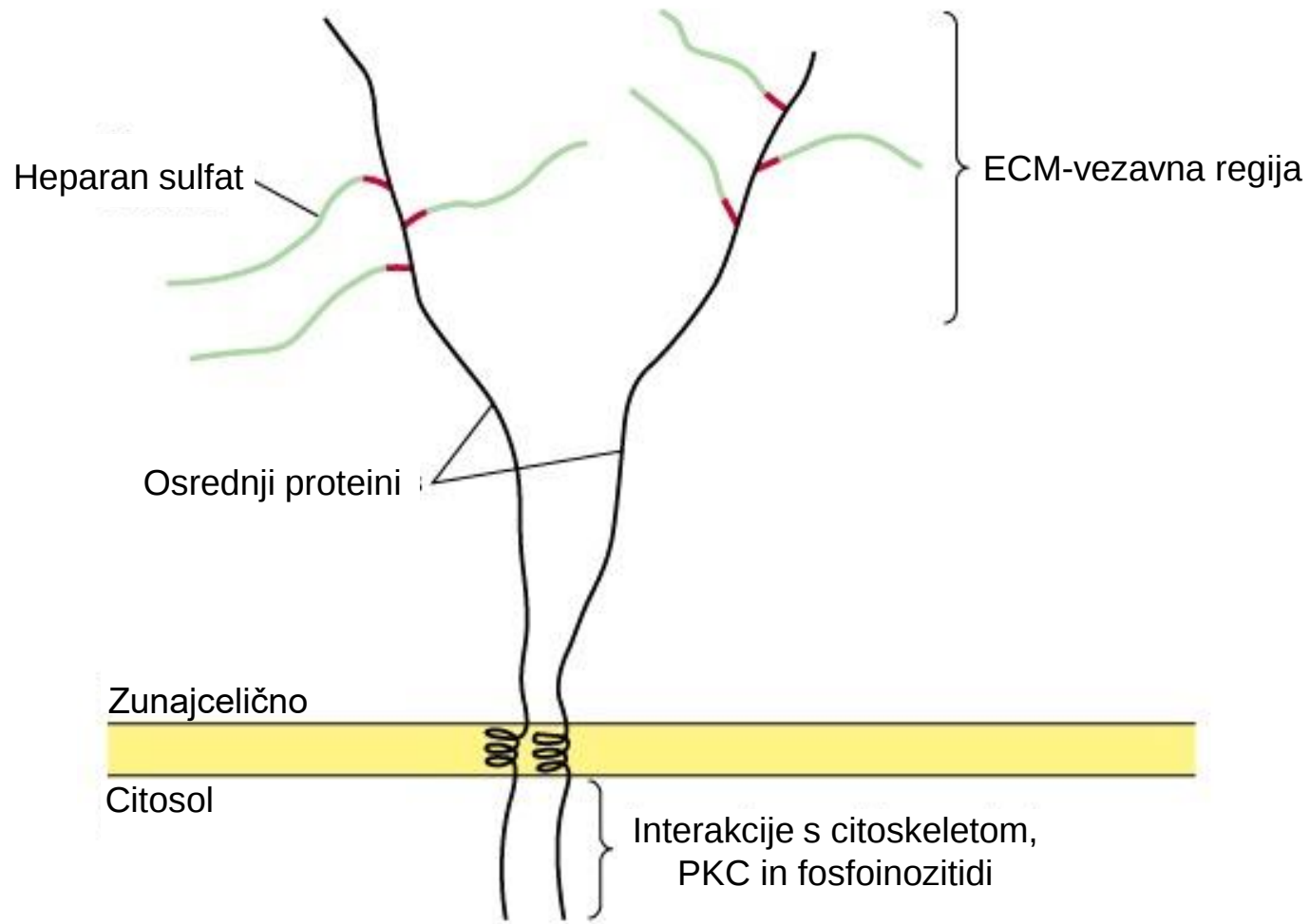
Poglavitna sestavina hrustanca. Proteoglikanski agregat: osnovne proteoglikanske enote se povezujejo v 40 nm intervalih na molekulo hialuronanana.

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

Lastnosti gela $\Rightarrow$ prožnost, amortizacija, odpornost proti deformaciji.

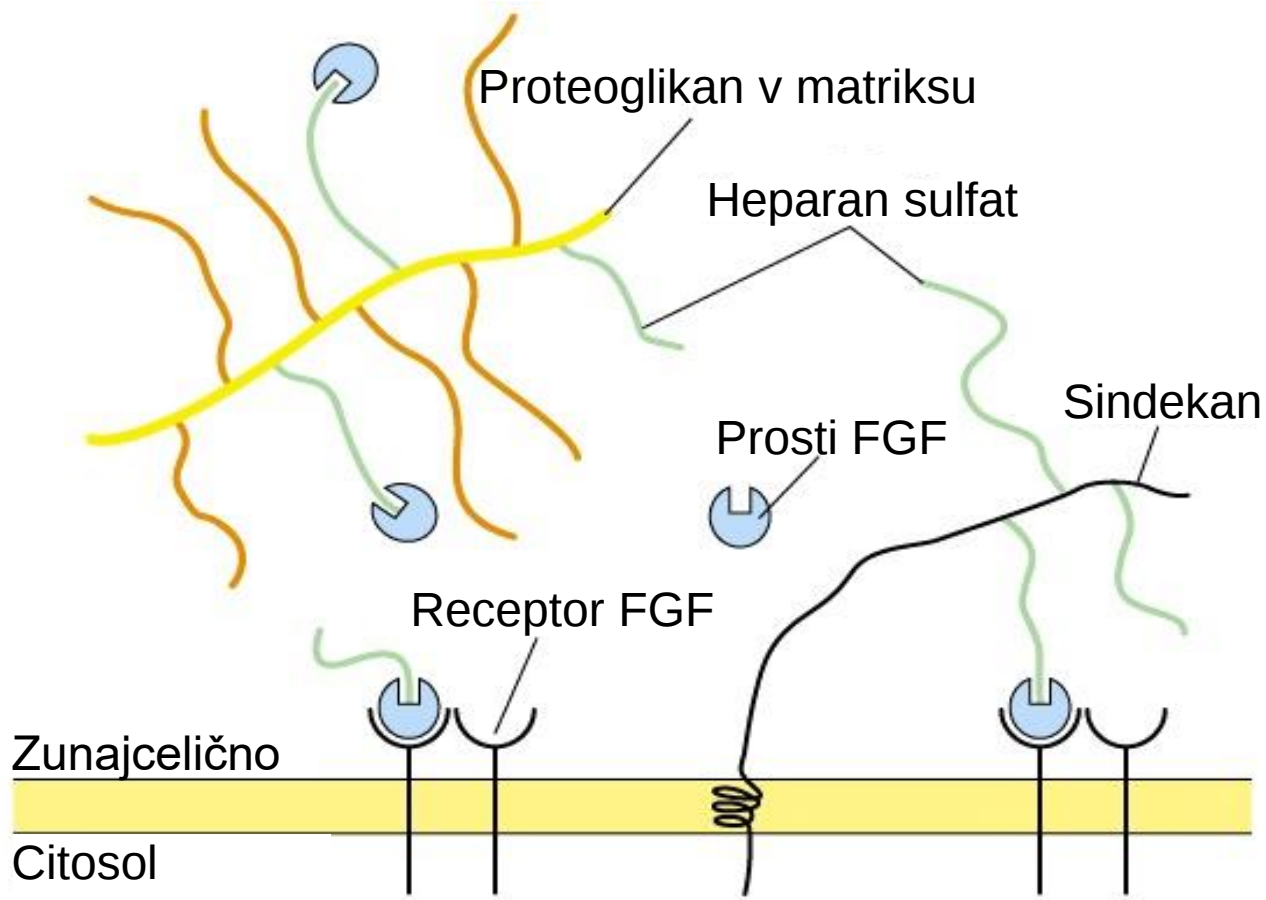


Sindekani



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

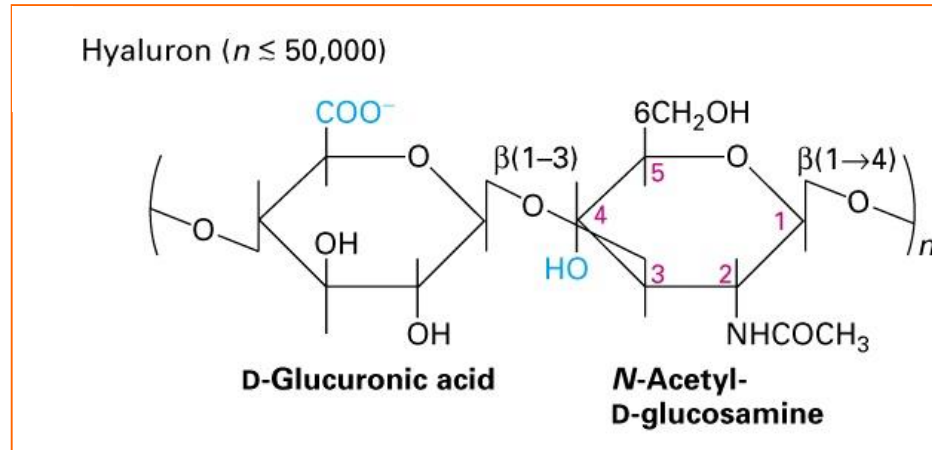
Proteoglikani modulirajo hormonsko aktivnost



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 (~1–10 Mio Da)
- 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 $\Rightarrow$ turgorski tlak $\Rightarrow$ odpor kompresijskim silam)
- veže se na c. receptor CD44 (tvori plašč $\Rightarrow$ prepreči interakcije c.-c. c.-ECM $\Rightarrow$ mogoča je migracija in proliferacija celic)
- biosinteza: membranske hialuronan-sintaze
- razgradnja: hialuronidaze
- osnova za nastanek agrekanskih agregatov $\Rightarrow$ amortizacijski učinek hrustanca