

Biokemija večceličnih sistemov

prof. dr. Brigita Lenarčič

brigita.lenarcic@fkkt.uni-lj.si

tel.: 01 2419 484

doc. dr. Marko Novinec

marko.novinec@fkkt.uni-lj.si

tel.: 01 2419 48?

Pogoji dela

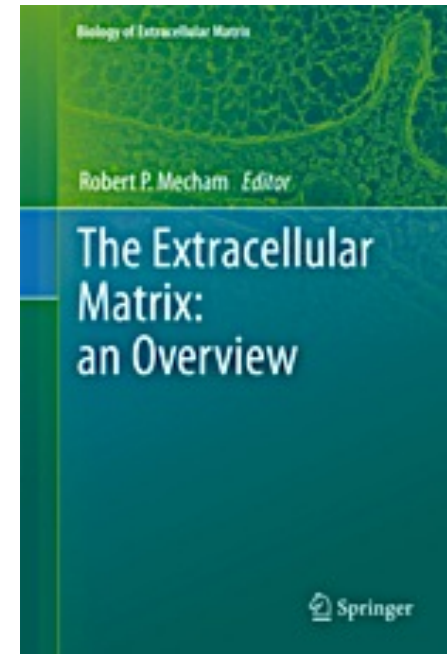
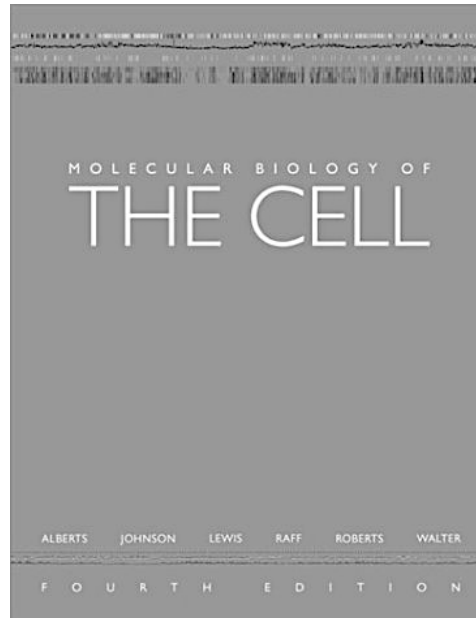
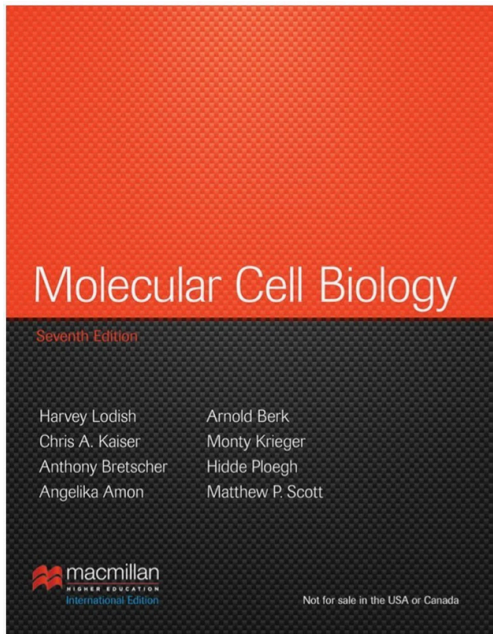
- 30 ur predavanj (50 % ocene)
- 15 ur seminarji (20 % ocene)
- 30 ur vaj (30 % ocene)

Seminarji/projekt :

- predstavitev ozadja
- obravnavani problem (hipoteza)
- projekt dela (za 2 leti)
- metodologija
- pričakovani rezultati

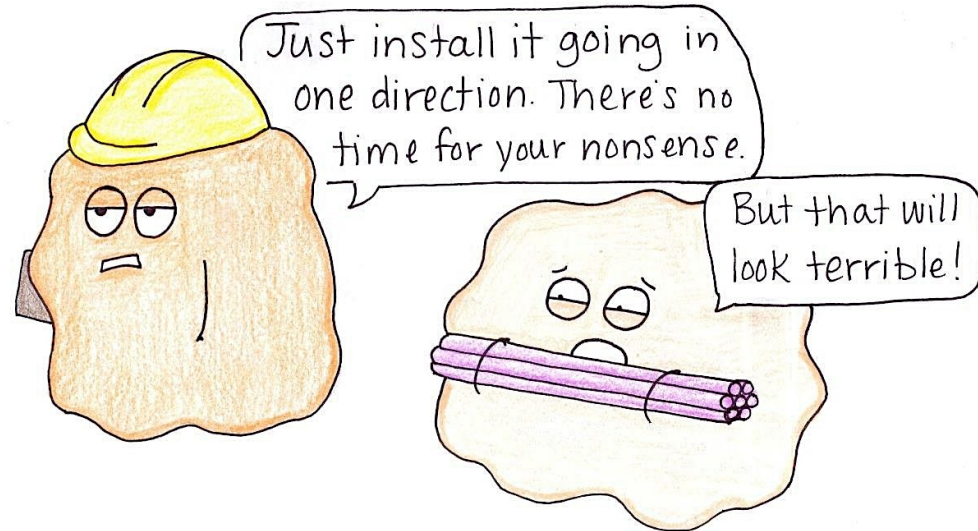
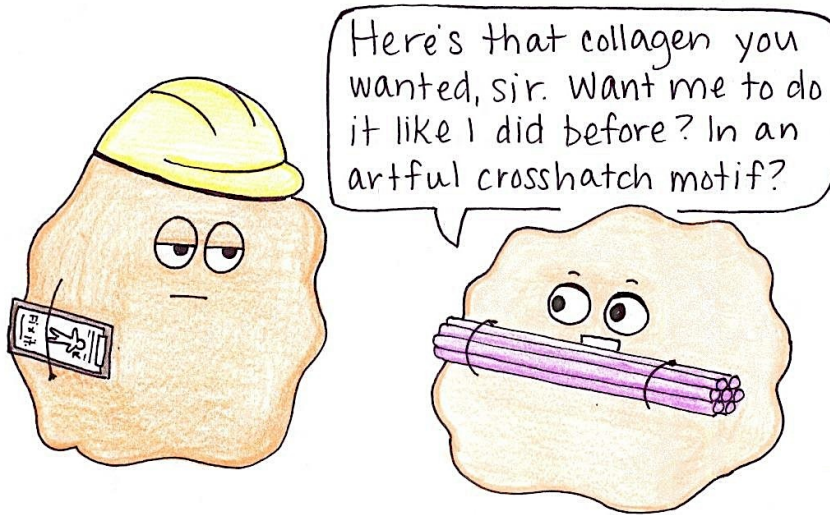
Vaje:

Literatura



Biokemija večceličnih sistemov

How scar tissue is made.



Zakaj proučevati ECM

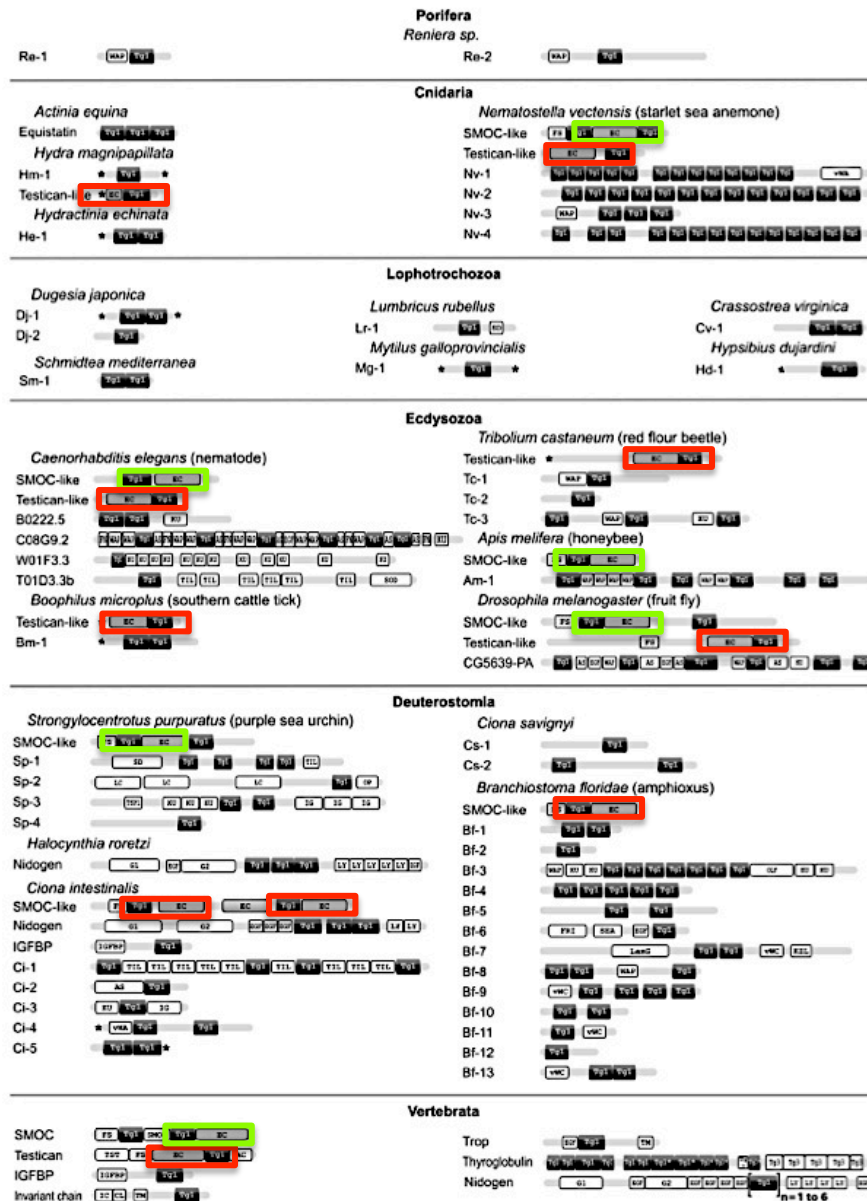
- ECM je dinamični biomaterial, ki omogoča:
 - trdnost/elastičnost tkiva
 - interakcijo molekul s površinskimi receptorji
 - kontrolo in razpoložljivost različnih rastnih faktorjev
- ECM je pomemben dejavnik celične biologije saj omogoča razumevanje:
 - celične diferenciacije
 - razvoja tkiva
 - preoblikovanja/regeneracije tkiva
 - staranja

Razvoj večceličnih organizmov

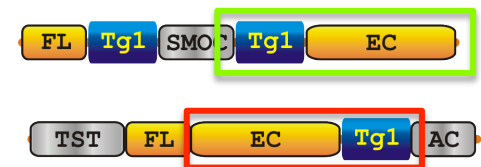
- normalne, izvorne in zarodne celice
- višje razviti organizmi → posamezne celice samostojno ne preživijo
- novonastali organizmi so se rodili, razvijali in umrli
- prvi večcelični speciesi → primitivne zelene alge z ECM in s somatskimi celicami okoli zarodnih

Raznolikost in evolucija naddružine Tg-1

170 zaporedij proteinov
300 zaporedij Tg-1



- ❖ Tg-1 domene najdene le pri živalih
- ❖ pojavijo se zgodaj v razvoju živali
- ❖ gre za "živahne" domene
- ❖ domenski pari ali naddomene



Razvoj večceličnih organizmov

- normalne, izvorne in zarodne celice
- višje razviti organizmi → posamezne celice samostojno ne preživijo
- novonastali organizmi so se rodili, razvijali in umrli
- prvi večcelični speciji → primitivne zelene alge z ECM in s somatskimi celicami okoli zarodnih
- rastline in živali → dva precej različna ECM
- rastlinski ECM uniformen, dolgi polisaharidi in nekaj proteinov
- razvoj živalske vrste → gibljivost → kompleksnost ECM → genske družine
 - medcelična komunikacija
 - adhezija
 - razvoj
- genske mreže → boljša kontrola
 - pri razvoju in preoblikovanju
 - vzdrževanju lastnosti ECM različnih tkiv
- ECM vretenčarjev je precej ohranjen in je sestavljen iz molekul istega razreda
 - kolageni, glikoproteini in proteoglikani
 - lahko imajo lastnosti mehkega steklastega gela (oči)
 - fibrile iz polimerov (vezi in ligamenti)
 - trdne lastnosti (kosti)
- ECM tvori spekter lastnosti za ohranjanje oblike (mehanski stres med gibanjem)
- omogočeno konstantno in kontrolirano preoblikovanje ECM (embrionalni razvoj, preoblikovanje tkiva)

Razvrstitev proteinov ECM

- glikoproteini
- proteoglikani
- kolageni

Osnovne lastnosti proteinov ECM

- edinstveni v strukturi sestavi in funkciji
- večina proteinov so velike molekule 100-1.000 kDa
- obsežna glikozilacija ~35%, GAG
- asimetrični proteini
- več domenski proteini
- multifunkcionalnost
- homo/hetero polimeri
- tvorba fibril in makromolekulskih skupkov
- daljša življenjska doba
- netopni v zreli obliki

Globularne domene v proteinih ECM

Table 1.1 Domains occurring in ECM Proteins

Letter code	Full name	Size (aa)	ECM proteins with homologues	Frequent function
CA	Cadherin domain	110–130	E-cadherin, N-cadherin, desmoglein, many other adhesion proteins	Homo association
C4	Collagen IV carboxy terminal domain	Trimer (3 × 110)	Collagen IV	Hexamer formation
CUB	CUB	About 110	BMP-1, Tolloid, neuropilin, many complement components	
EGF	Epidermal growth factor domain	About 50	Aggrin, BMP-1, CASP, CMP, TSP-1 to -5, tenascins, many others	One of the most abundant domains with many functions
EF	EF-hand domain	12 Flanked by α -helices	BM-40/SPARC and very many cytosolic proteins	Binds Ca^{2+} and other divalent ions
KU	Kunitz inhibitor domain	About 60	$\alpha 3$ chain collagen VI, $\alpha 1$ chain collagen VII and many protease inhibitors	No protease inhibition in the collagens
F1	Fibronectin type 1 domain	About 40	Fibronectin and many coagulation factors	
F2	Fibronectin type 2 domain	About 60	Fibronectin and many coagulation factors	Involved in collagen binding
F3	Fibronectin type 3 domain	About 90	Fibronectin, tenascin, $\alpha 1$ -chain of collagen I	RGD-loop binds to several integrins
FBG	Fibrinogen C-terminal domain	About 225	Tenascin, ficolin, angiopoitin, fibrinogen	
Ig	Ig-like domain	70–100	NCAM, FGFR most abundant in IgGs and MHC	
LE	Laminin-type EGF-like domain	About 60	Laminin α -, β -, γ -chain, agrin, perlecan, unc-52, netrin	Specialized domains bind entactin/nidogen
LN	Laminin N-terminal domain		Laminin α -, β -, γ -chain, netrin	Involved in basement membrane assembly
LG	Laminin G-like domain	About 190	Laminin α -chain, agrin, neurexin, slit protein	In some cases binding to integrin $\alpha 6 \beta 1$
TB	TGF-beta binding domain		TGF-beta binding protein, fibrillin-1,-2,-3, follistatin	

PROSITE (Database of protein domains, families and functional sites)

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)

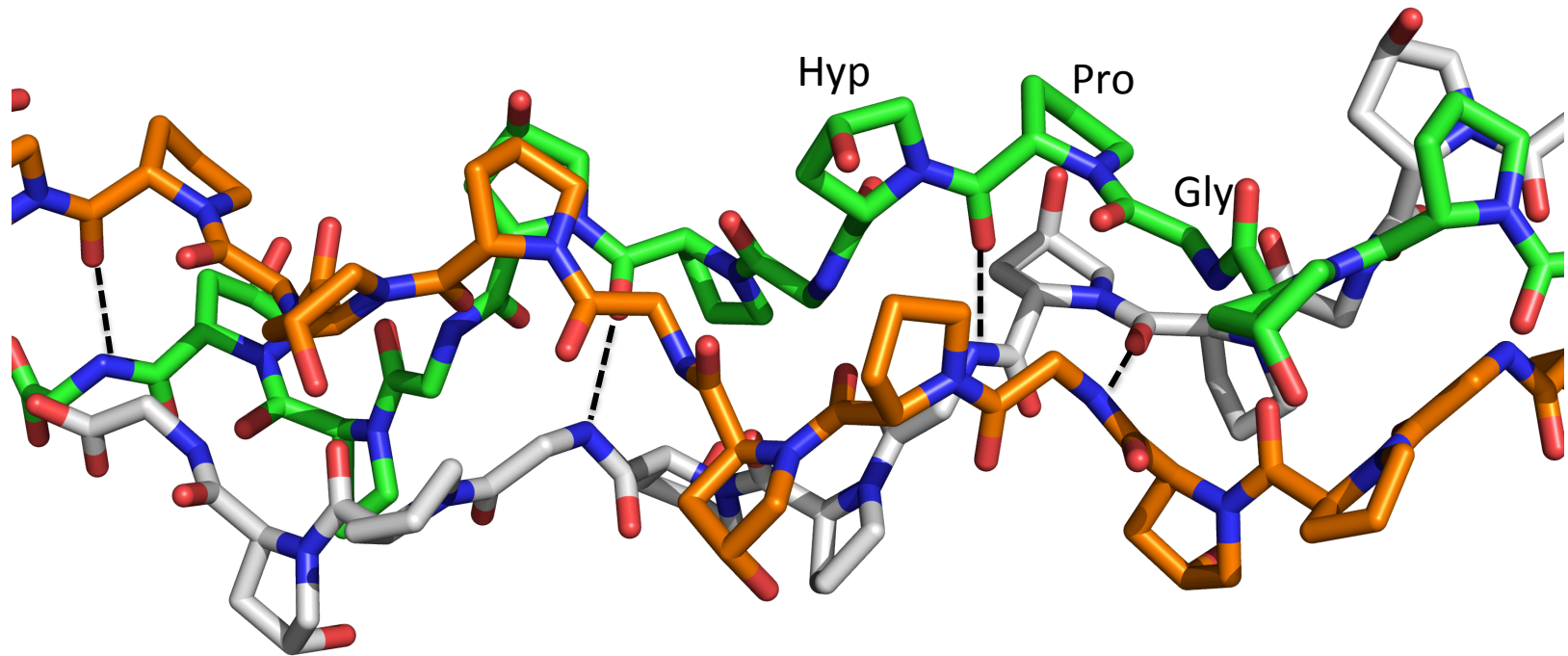
CDART (The Conserved Domain Architecture Retrieval Tool)

Table 1.1 (continued)

Letter code	Full name	Size (aa)	ECM proteins with homologues	Frequent function
TSP1	Thrombospondin type 1 domain	About 55	Thrombospondin-1,-2,-3,-4	ADAMTS, properdin
TSP2	Synonymous to EGF			
TSP3	Thrombospondin type 3 domain	Composed of many EF-hand like repeats	Thrombospondins 1–5	Binding of Ca-ions
TSPC	C-terminal L-lectin-like thrombospondin domain		Highly conserved domain of all thrombospondins	
VWFA	Von Willebrand factor A domain, I-domain of integrin	About 190	Present in 22 ECM proteins including VWF, collagens VI, VII, XII, XIV, matrilin, integrin α -chain	Binding of specific sites of some collagens
VWFC	Von Willebrand factor C domain	About 70	VWF, thrombospondins-1 and -2, chordin	
VWFD	Von Willebrand factor D domain		VWF, BMP-binding regulator protein	

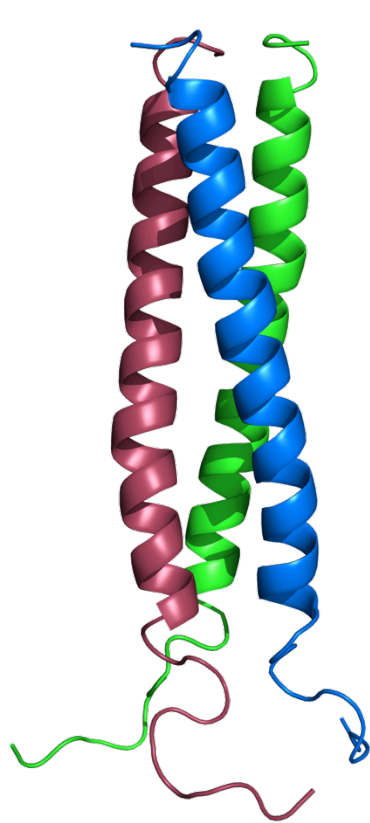
Strukture v obliki palice-kolagen

Trojna vijačnica kolagena

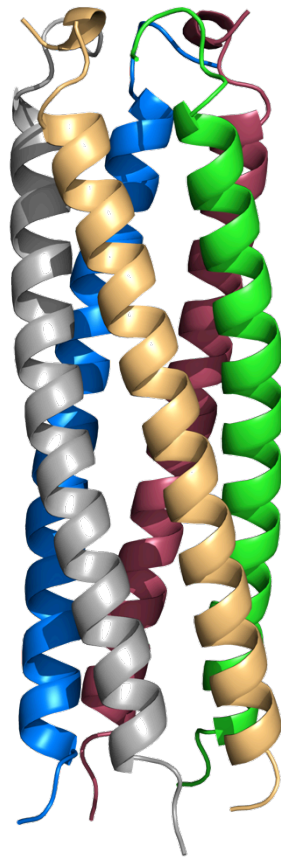


- (Gly-Pro-Hyp)_n
- L-poliprolinska vijačnica (različne)
- D trojna trojna vijačnica
- stabilizacija preko H-vezi med CO- skupino Hyp in NH- skupino Gly
- stranske verige so usmerjene iz vijačnice in namenjene interakcijam s sosednjimi molekulami pri tvorbi fibril
- dolžina 14 nm - 800 nm

Strukture v obliki palice - helične strukture



matrilin-1



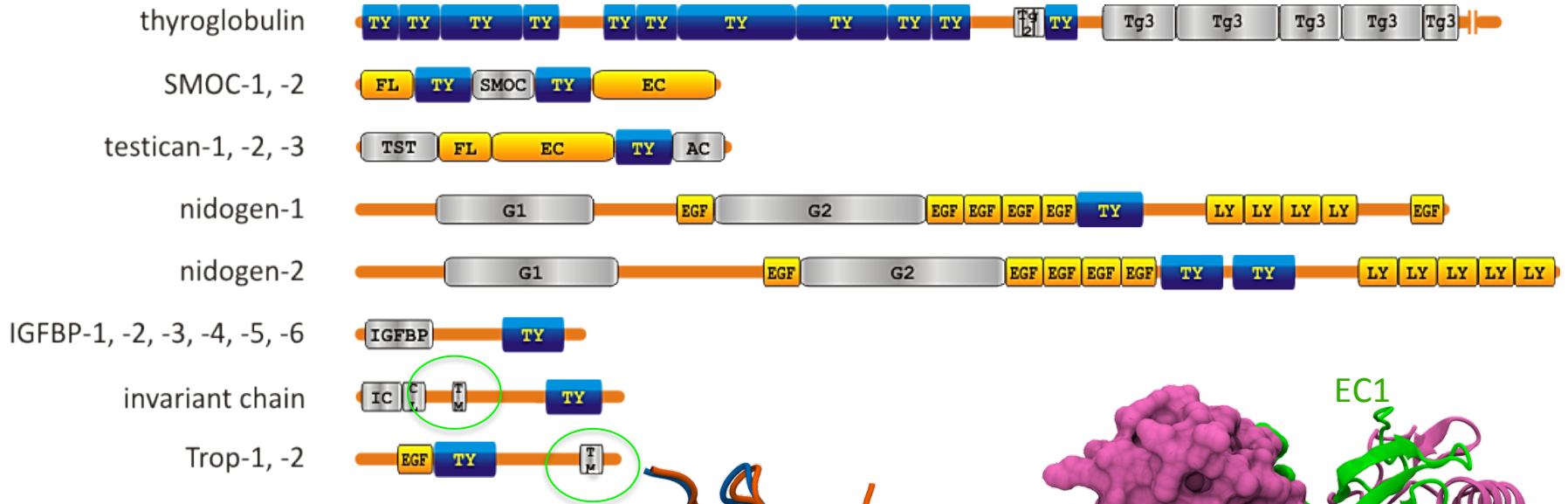
trombospondin-5

	a	b	c	d	e	f	g
	E	E	D	P	C	E	
7	C	K	S	I	V	K	F
14	Q	T	K	V	E	E	L
21	I	N	T	I	Q	Q	K
28	L	E	A	V	A	K	R
35	I	E	A	L	E	N	K
42	I	I					



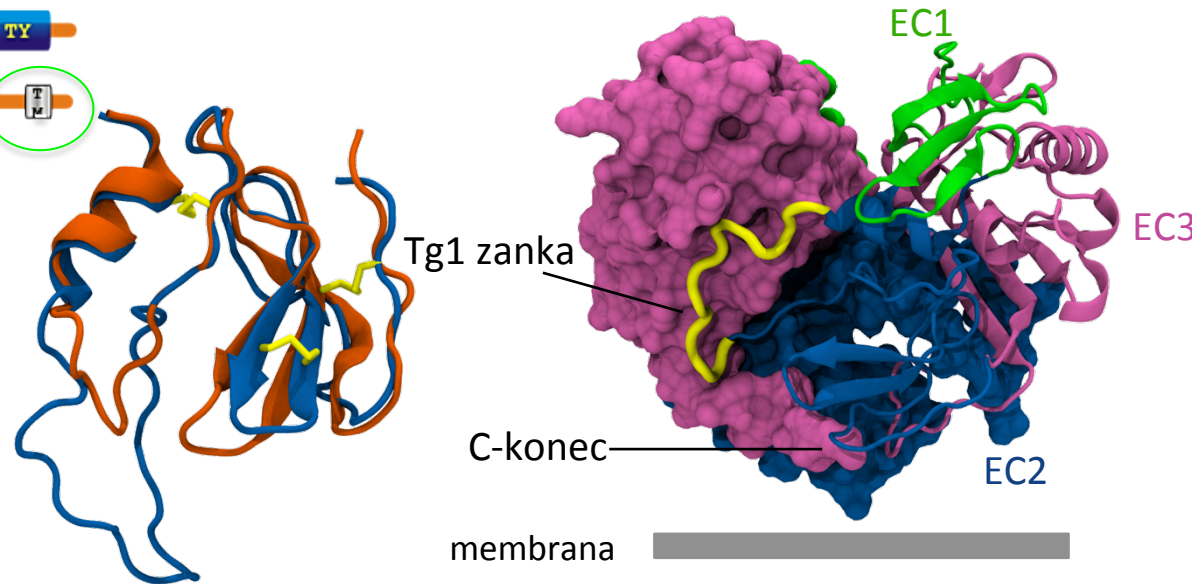
- 3-5 vijačnic
- značilna zaporedja
- stabilizacija preko hidrofobnih ak
- dolžina 3.5 nm
- vijačnice v lamininu 75 nm

Transmembranski proteini



Imajo homologne domene podobne funkcije?

fragment p41 kot inhibitor CP

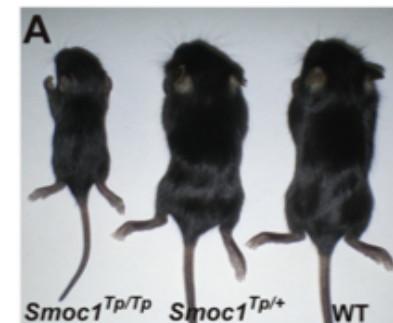
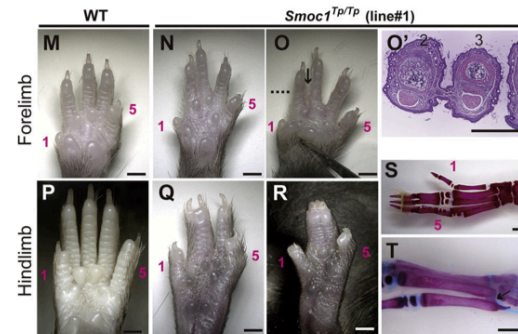
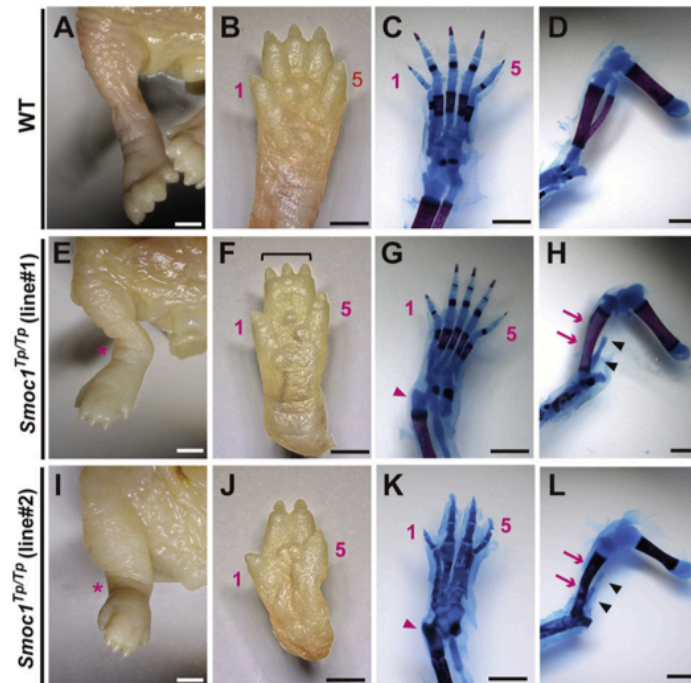
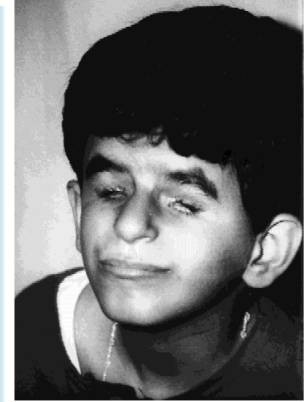


- Tg1 domena v fragmentu p41/inhibitor cisteinskih proteaz (rdeče)
- Tg1 domena v EpCAM/strukturna vloga pri dimerizaciji
- Tg1 domena IGFBP /vezava rastnega faktorja
- TG! domena SMOC /odgovorna za razvoj oči in okončin

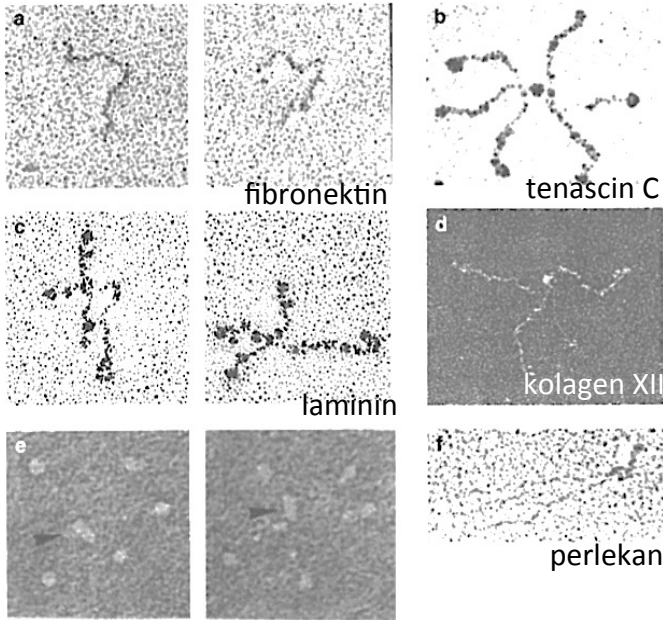
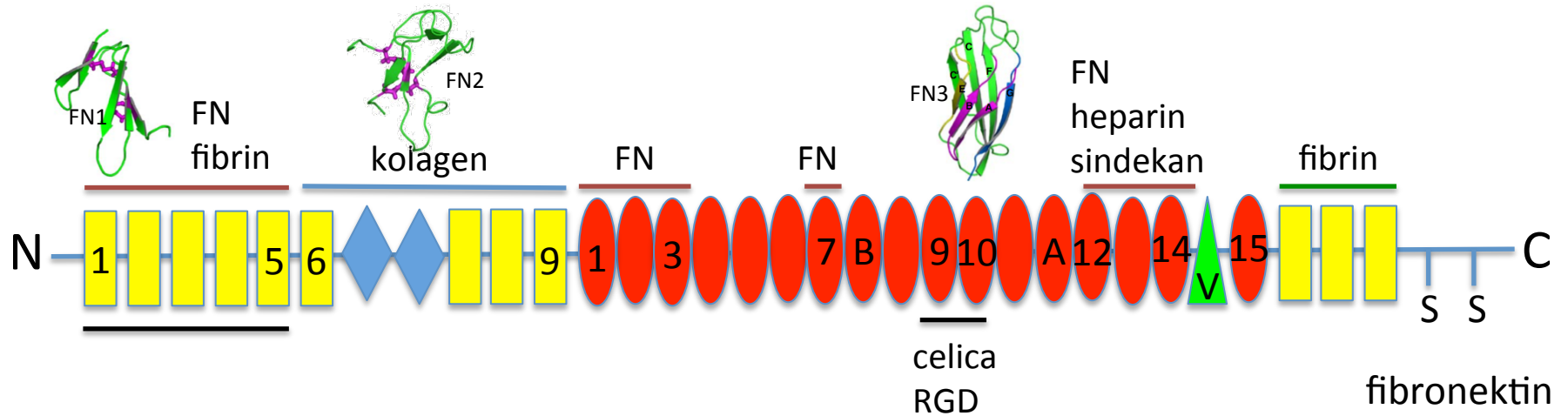
Waardenburg Anophthalmia

Abstract

Ophthalamo-acromelic syndrome (OAS), also known as Waardenburg Anophthalmia syndrome, is defined by the combination of eye malformations, most commonly bilateral anophthalmia, with post-axial oligosyndactyly. Homozygosity mapping and subsequent targeted mutation analysis of a locus on 14q24.2 identified homozygous mutations in *SMOC1* (*SPARC-related modular calcium binding 1*) in eight unrelated families. Four of these mutations are nonsense, two frame-shift, and two missense. The missense mutations are both in the second Thyroglobulin Type-1 (Tg1) domain of the protein. The orthologous gene in the mouse, *Smoc1*, shows site- and stage-specific expression during eye, limb, craniofacial, and somite development. We also report a targeted pre-conditional gene-trap mutation of *Smoc1* (*Smoc1^{tm1a}*) that reduces mRNA to ~10% of wild-type levels. This gene-trap results in highly penetrant hindlimb post-axial oligosyndactyly in homozygous mutant animals (*Smoc1^{tm1a/tm1a}*). Eye malformations, most commonly coloboma, and cleft palate occur in a significant proportion of *Smoc1^{tm1a/tm1a}* embryos and pups. Thus partial loss of *Smoc-1* results in a convincing phenocopy of the human disease. *SMOC-1* is one of the two mammalian paralogs of *Drosophila* Pentagone, an inhibitor of decapentaplegic. The orthologous gene in *Xenopus laevis*, *Smoc-1*, also functions as a Bone Morphogenetic Protein (BMP) antagonist in early embryogenesis. Loss of BMP antagonism during mammalian development provides a plausible explanation for both the limb and eye phenotype in humans and mice.



Organizacija domen proteinov ECM



Fibronektin

Dve podenoti 70 nm sta povezani nekako pod kotom 70°. Verigi se lahko zvijata.

Tenascin-C

Šest verig tenascina-C (75-90 nm), globularni predeli.

Laminin

Oblika križa, 35 nm/75 nm, velika fleksibilnost molekule.

Kolagen XII

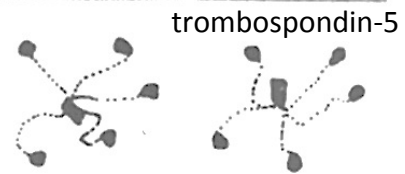
Homotrimer, 90 nm dolge, nekolagenske domene so povezane s 50 nm dolgim kolagenskim trojnim heliksom (tanka črta)

Trombospondin-5

40 nm dolge verige so spojene v pentamerni zviti domeni

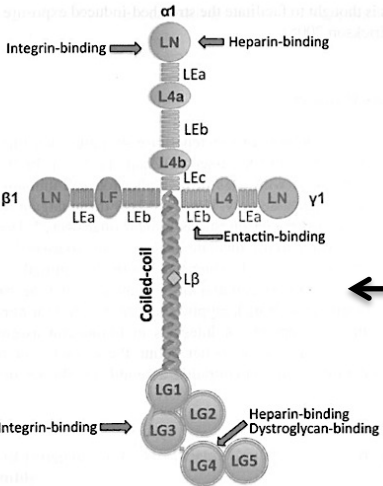
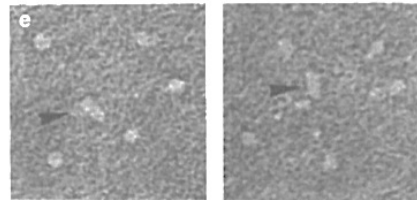
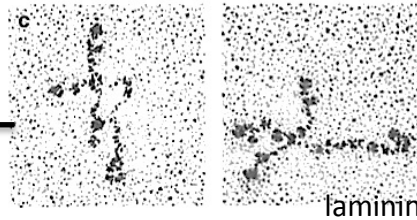
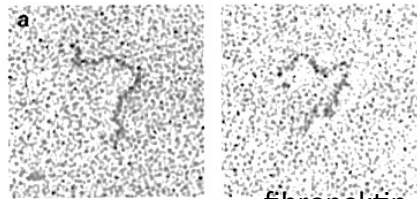
Perlekan

Proteoglikan s tremi GAG-verigami (šibko vidne, do 100 nm dolžine)

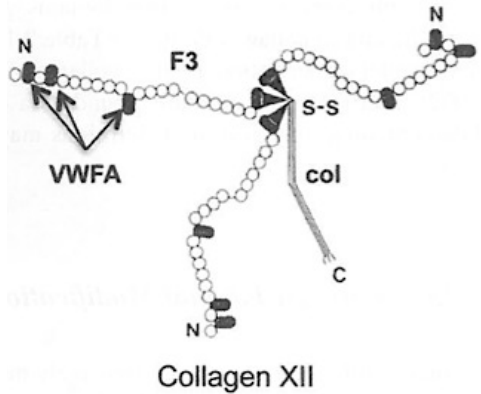
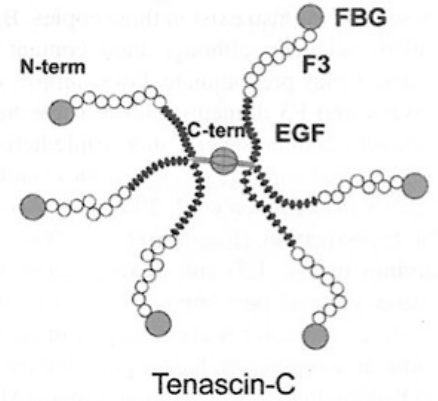
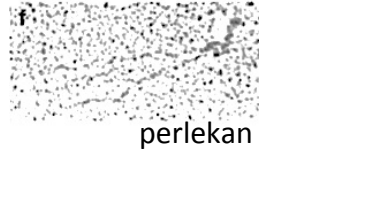
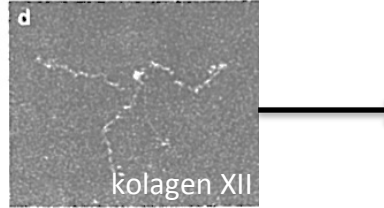
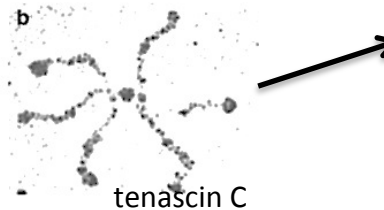


Multimerizacija polipeptidnih verig proteinov ECM

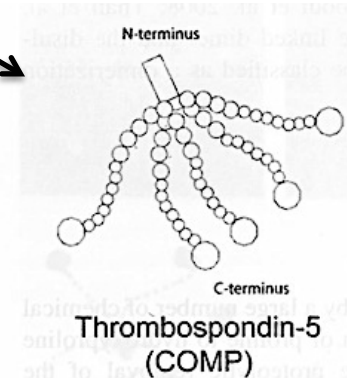
disulfidni dimer



helična obvijana vijačnica



kolagenski trojni heliks

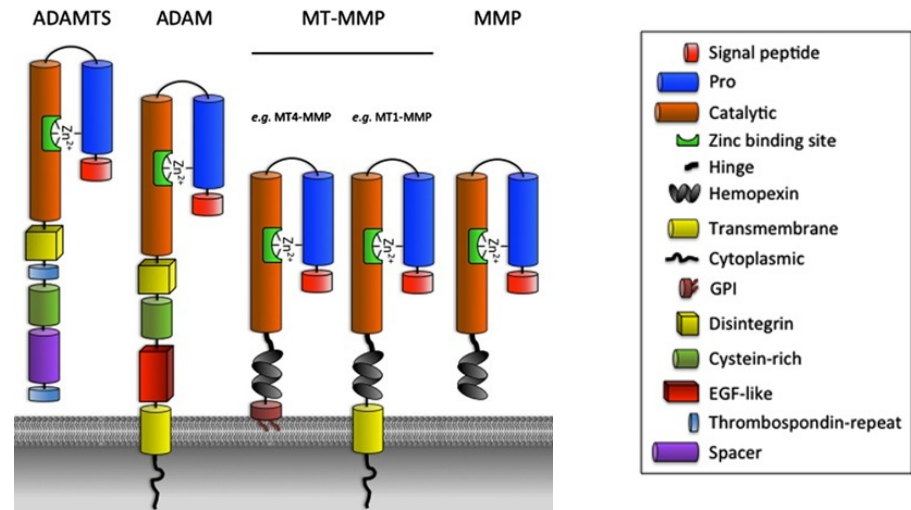


-alternativno izrezovanje

Posttranslacijske modifikacije proteinov ECM

- hidroksilacija Pro v Hyp
- proteolitske cepitve N- ali C- koncev
 - proteaze matriksa

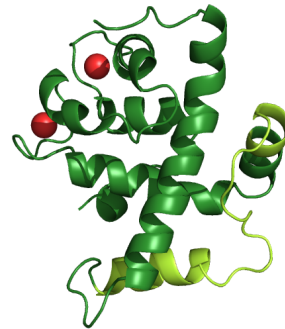
MMP (matriks metalo proteinaze)
ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinases)
ADAMTS (ADAMs with Thrombospondin motifs)



- aktivacije latentnih domen
 - pogosto se poveča topnost
- glikozilacija prispeva k strukturni stabilnosti
 - GAG pretvorijo proteine v proteoglikane (protein z in brez GAG)
 - dolžina GAG zelo varira glede na starost in vrsto tkiva
 - glikozilacije se odvijajo v Golgiju
 - dinamično preoblikovanje matriksa (remodelling)

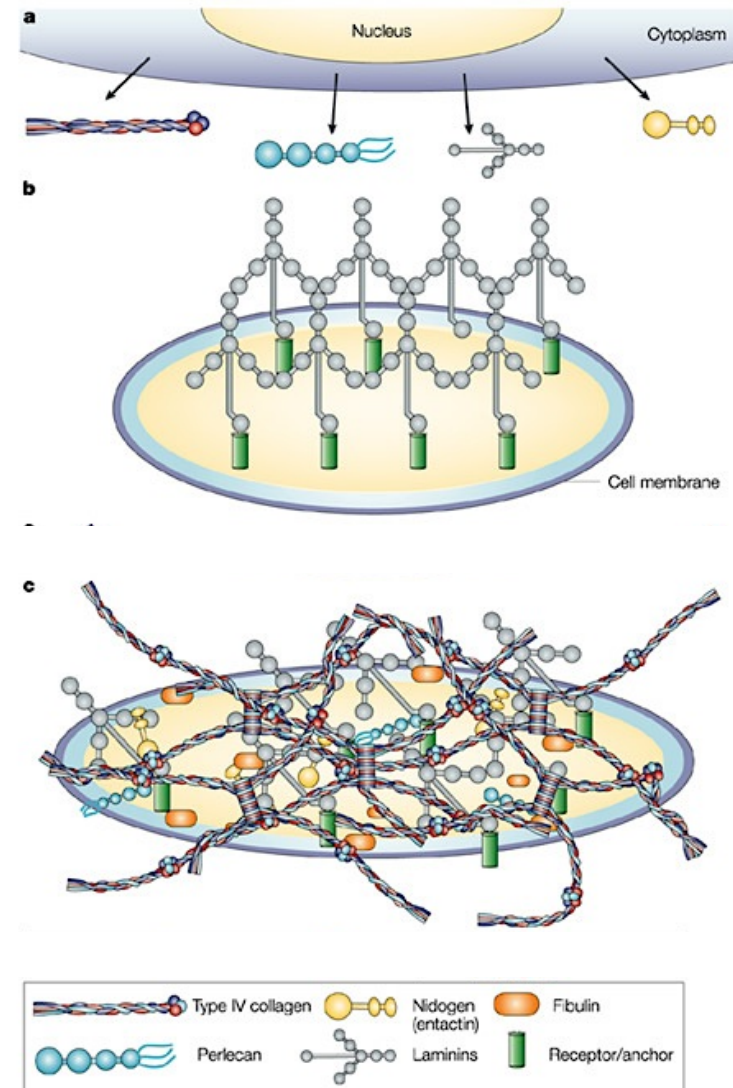
Vezava Ca^{2+} in mineralizacija

- koncentracija Ca^{2+} je v ECM visoka (2mM)
- spremembe v koncentraciji so majhne (GAG)
- številne domene ECM proteinov se stabilizirajo ob vezavi Ca^{2+}
- velika afiniteta proteinov do Ca^{2+}
- primeri:
 - domene EF roke SPARC
 - EGF- Ca^{2+} domene fibrilina
- kalcifikacije tkiva
- mineralizacija kosti, zob in drugih tkiv



ECM skupki - organizacija

- komponente ECM delujejo v skupkih
- intrinzična lastnost molekul po združevanju
- večina nekovalentne povezave, nekaj kovalentnih (lizil hidroksilaza)
- tvorba širokega omrežja
- vključitev celičnih receptorjev
- molekularni stroji

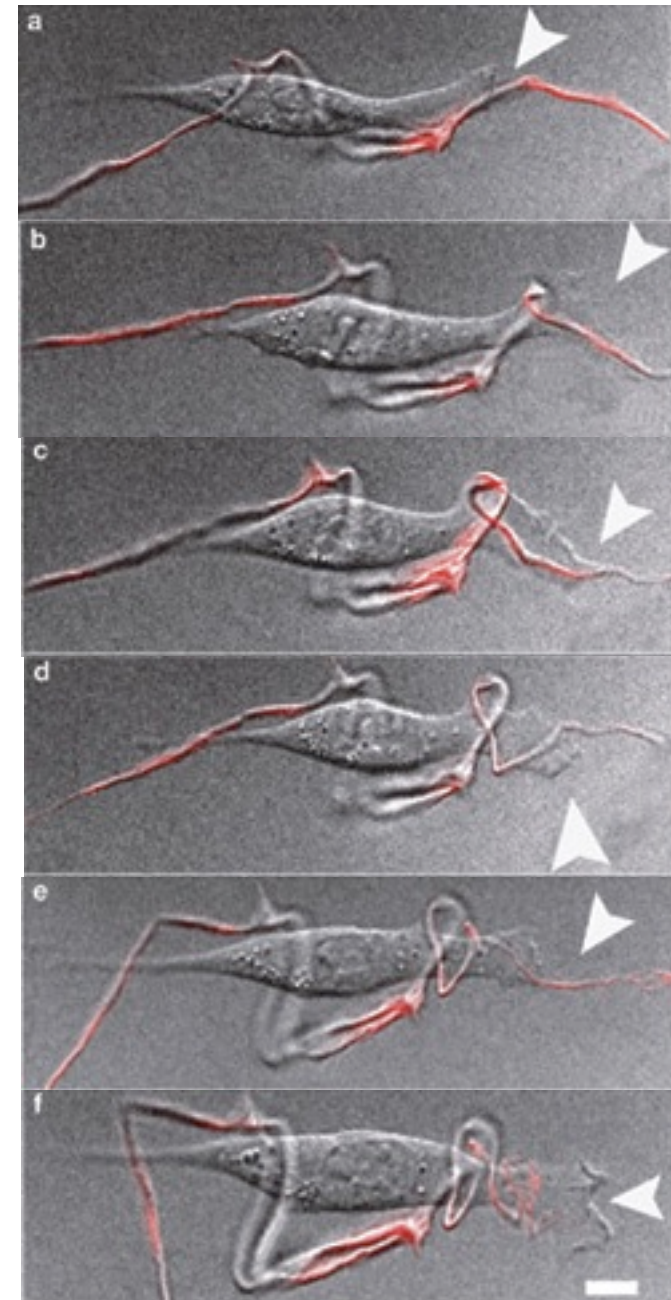


ECM skupki - kontrola

- afiniteta združevanja
- kontrola preko celic, ki komponente izloča
- urejene nadmolekulske strukture (npr. kolagen)
 - ploščate (dermis)
 - oblika vrvi (vezi)
 - transparentne plasti (kornea)
- pritrjevanje ECM komponent na celico predpogoj za topografsko urejenost
- vključenost citoskeleta in celičnih receptorjev (integrin)

ECM - reorganizacija

- gibanje celic fibroblastov
- fluorescenčno označen kolagen pripet na celico
- lamelopod v ciklih premika celice in zviija kolagen
- kot vlečenje vrvi
- pritrditev na površinske receptorje (integrin)
- osnova za reorganizacijo ECM

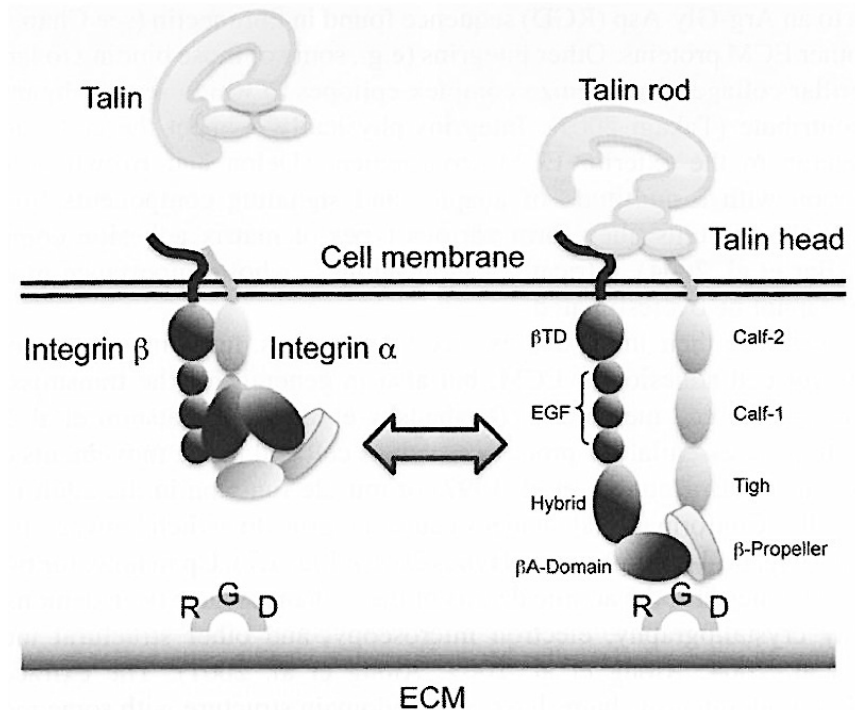


fibroblasti

fluorescenčno označen fibrilarni kolagen

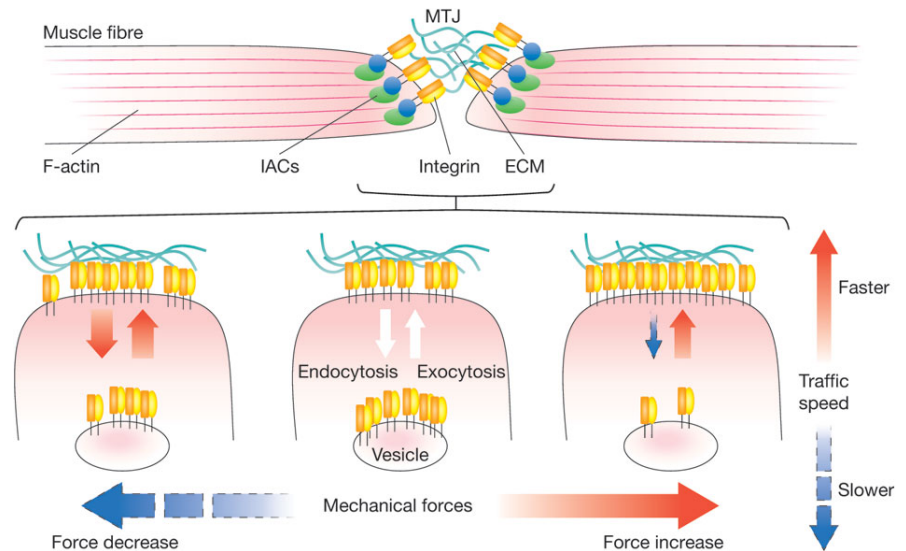
Integracija celic z ECM

- membranski receptorji
 - integrini, sindekani, diskodin
- integrin
 - heterodimer, α in β podenoti
 - ic domena, TM heliks, ec domena
 - 24 kombinacij iz 18 α in 8 β podenot
 - neaktivna/aktivna oblika
 - aktivacija preko konformacijskih sprememb
 - ic vezani na citoskelet, epitopi za ligande
 - ec večdomenski, epitopi za ligande (npr. za RGD)
- adhezija, signalna transdukcija
- mehanska transdukcija



Integrini - mehanska transdukcija

- mehanski stimulus → kemijski
- integrini-center mehanske transdukcije
- gravitacijska sila (nN) mehanski stres (megaPa)
- rezistenca na pritisk, strižne sile, napetost, stiskanje)
- kosti, mišice, vezi, cirkulatorni sistem, pljuča
- paralelna kolagenska vlakna (vezi), mreža kolagena s proteoglikani (hrustanec)



Drosophila myotendinous junction (MTJ)
Intracellular adhesion complex (IAC)

Mehanske sile regulirajo hitrost pretvorbe integrina

ECM - rastni faktorji

- rastni faktorji ne difundirajo prosto
- vezani so na komponente ECM
- zagotovitev prostorske in časovne specifičnosti
- večinoma so v latentni obliki
 - proteolitska cepitev
 - mehanski stimulus