

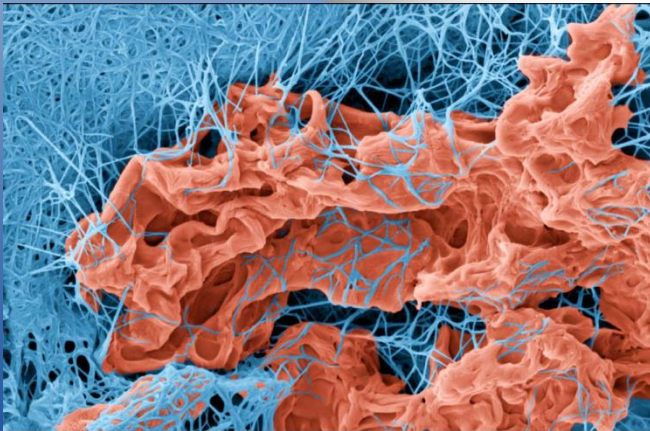
Molekulární biologie extracelulární matrix

Jana Šmardová

Jan Šmarda

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta MU



Přednáška kurzu Molekulární biologie eukaryot

3.10.2019

Povrch eukaryontních buněk

- glykokalyx (živočichové)
- buněčná stěna (rostliny, houby)

Mnohobuněčné organismy

- interakce mezi buňkami navzájem:
tkáně, resp. pletiva =
buňky + extracelulární matrix (ECM)
- propojení buněk:
přímý kontakt nebo prostřednictvím ECM
- růst buněk, migrace, proliferace, diferenciace

Mnohobuněčné organismy

- vývoj mnohobuněčnosti je jedním z nejvíce fascinujících a také z nejzáhadnějších kroků evoluce (a je jedním z „velkých evolučních přechodů“)
- klíčovým zprostředkovatelem mnohobuněčnosti u metazoí je extracelulární matrix
- sekretované proteiny, které tvoří ECM, se většinou objevily až s vývojem mnohobuněčných, představují tedy evoluční novinky
- proteiny ECM a jejich geny jsou dobrým podkladem pro hledání evolučních vztahů metazoí

Mnohobuněčné organismy

- mnohobuněčnost se vyvinula nezávisle několikrát (7x, respektive více než 20x)
 - živočichové: predátoři jiných organismů, silní a hbití, rychlý pohyb, rychlé vyvinutí a přenášení síly...
 - rostliny: nepohybují se, jejich pletiva pevná, jejich buňky slabé a velmi křehké – pevnost dána buněčnými stěnami
-
- rozdílům odpovídají i rozdíly v uspořádání ECM
 - ECM vytvářejí buňky kolem sebe a kontrolují její složení

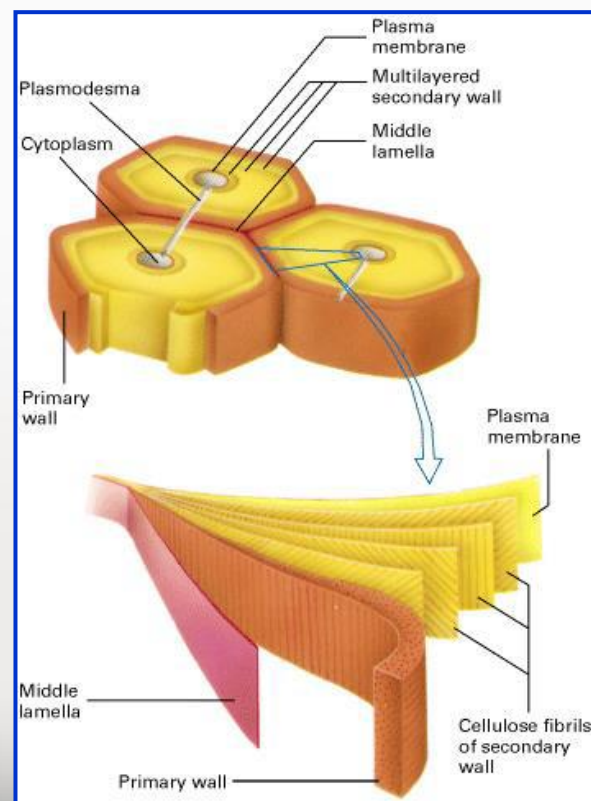
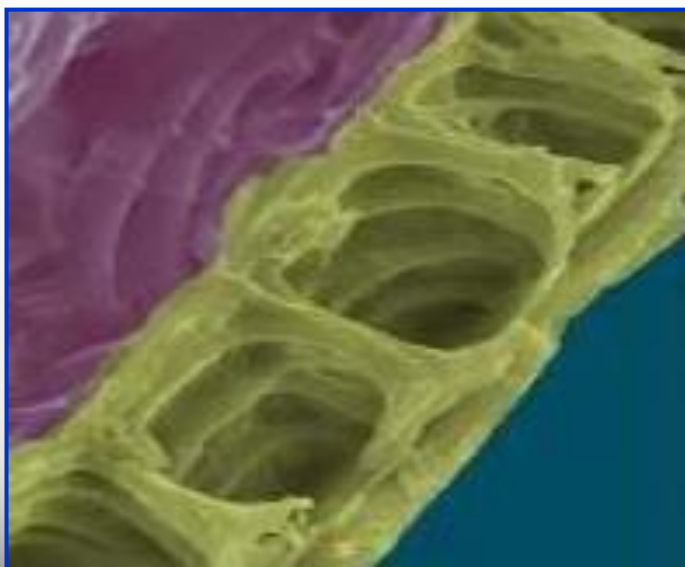
Osnova přednášky

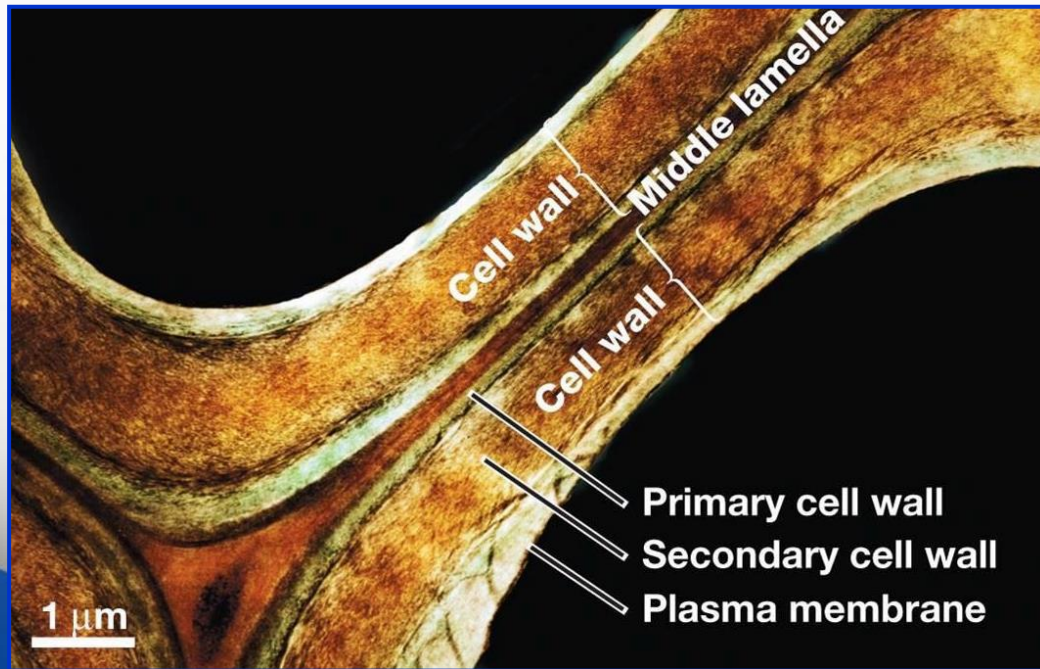
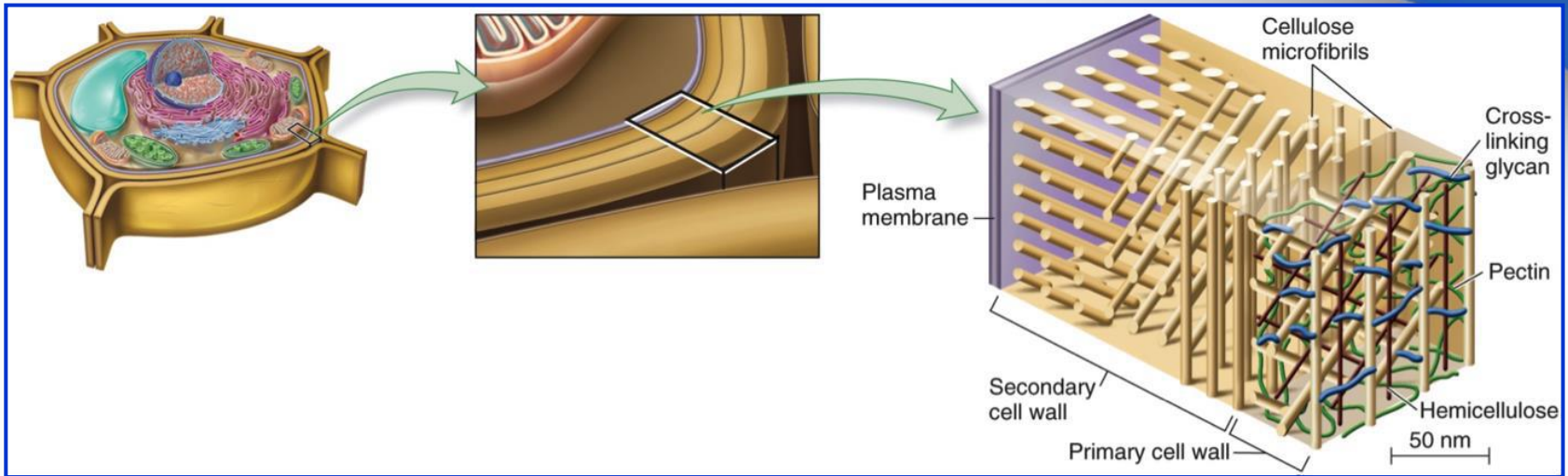
- buněčná stěna
- extracelulární matrix (ECM) u živočichů
 - funkce ECM
 - komponenty ECM
 - degradace ECM

Buněčná stěna

Buněčná stěna (cell wall, CW) u rostlin

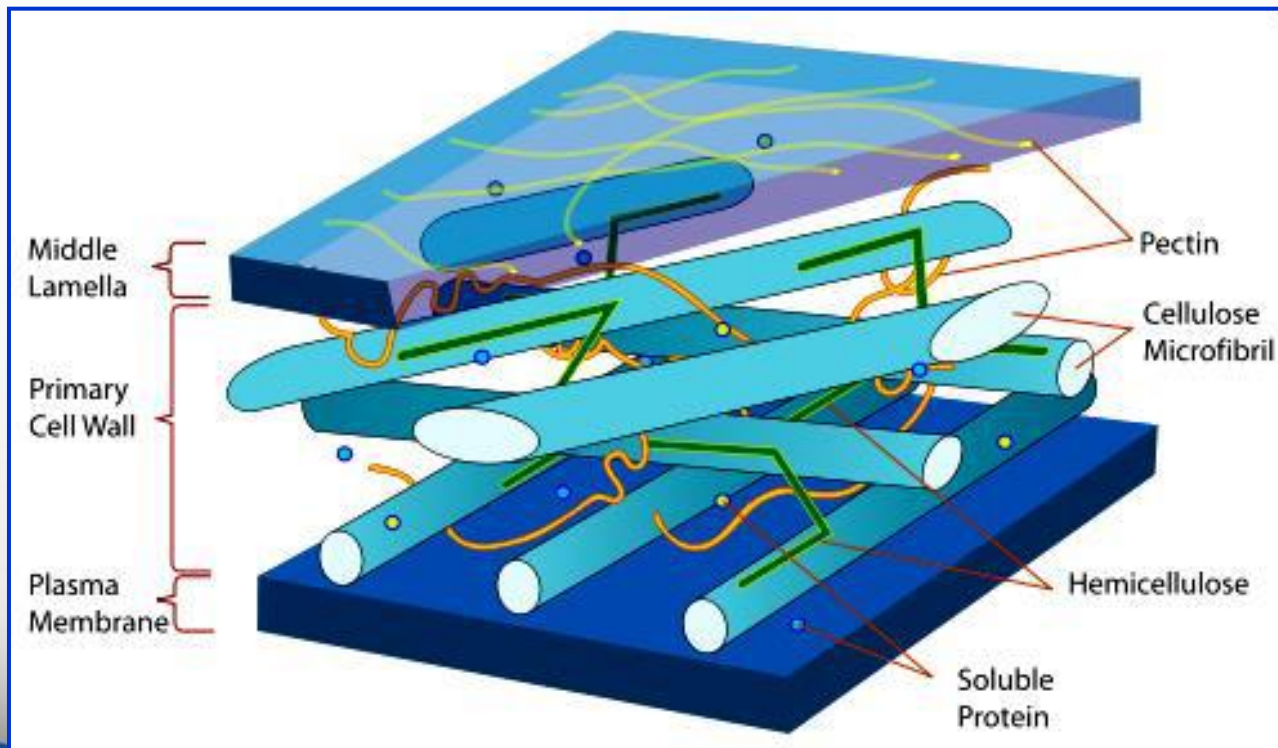
- primární CW (tenká) – schopnost zvětšování
- sekundární CW (pevná) – ztluštění primární CW nebo ukládání nových vrstev pod původní
- střední lamela





Složení buněčné stěny:

- celulóza, další polysacharidy (pektin, hemicelulóza), strukturální proteiny
- lignin



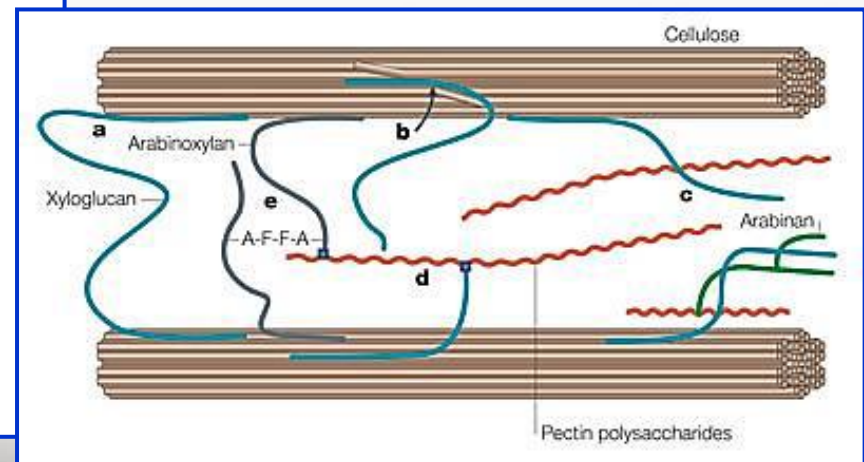
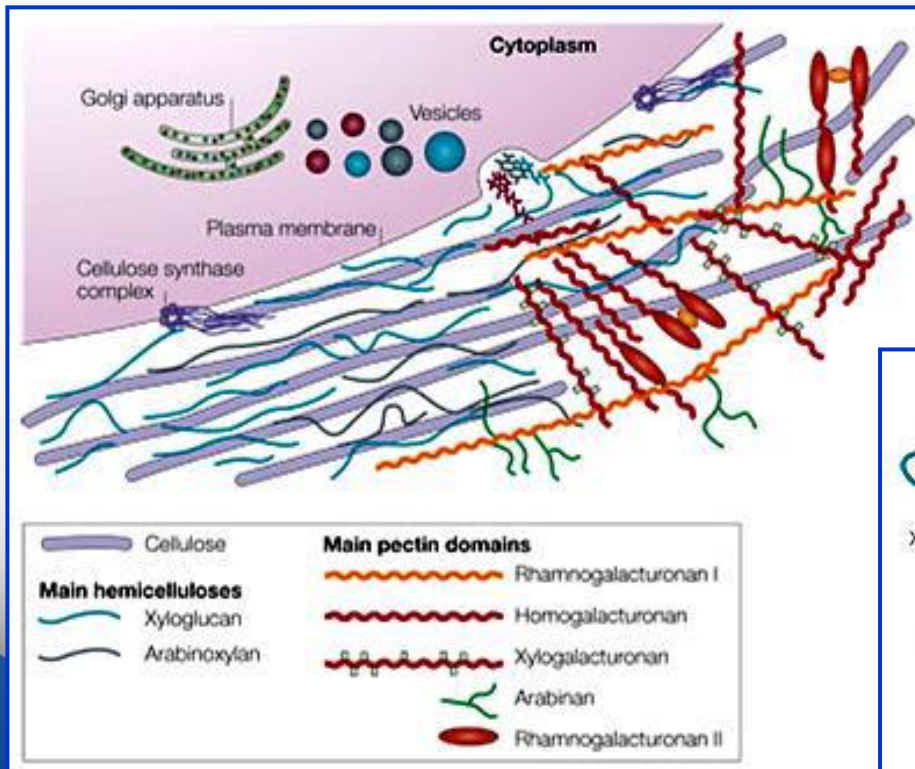
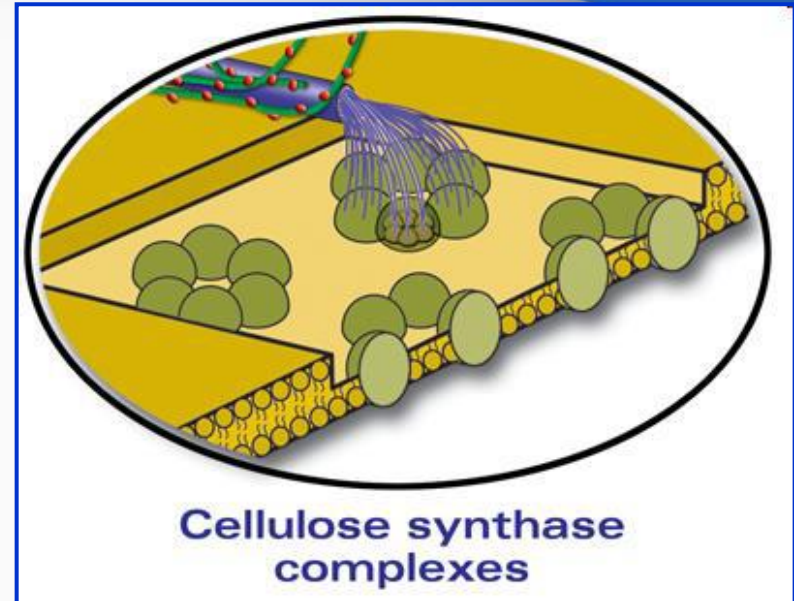
Syntéza celulózy

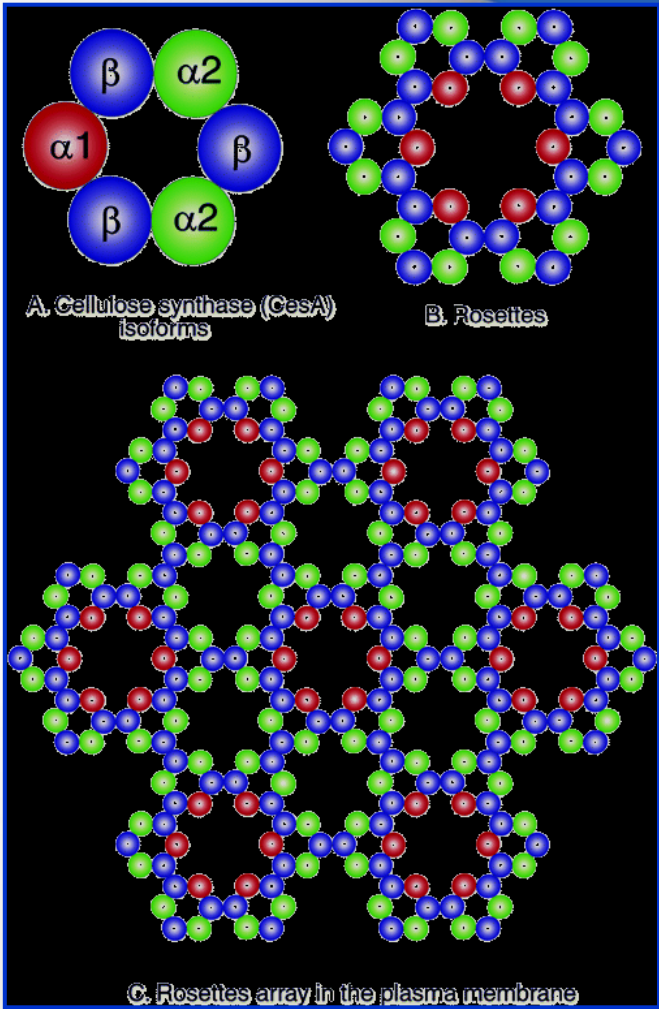
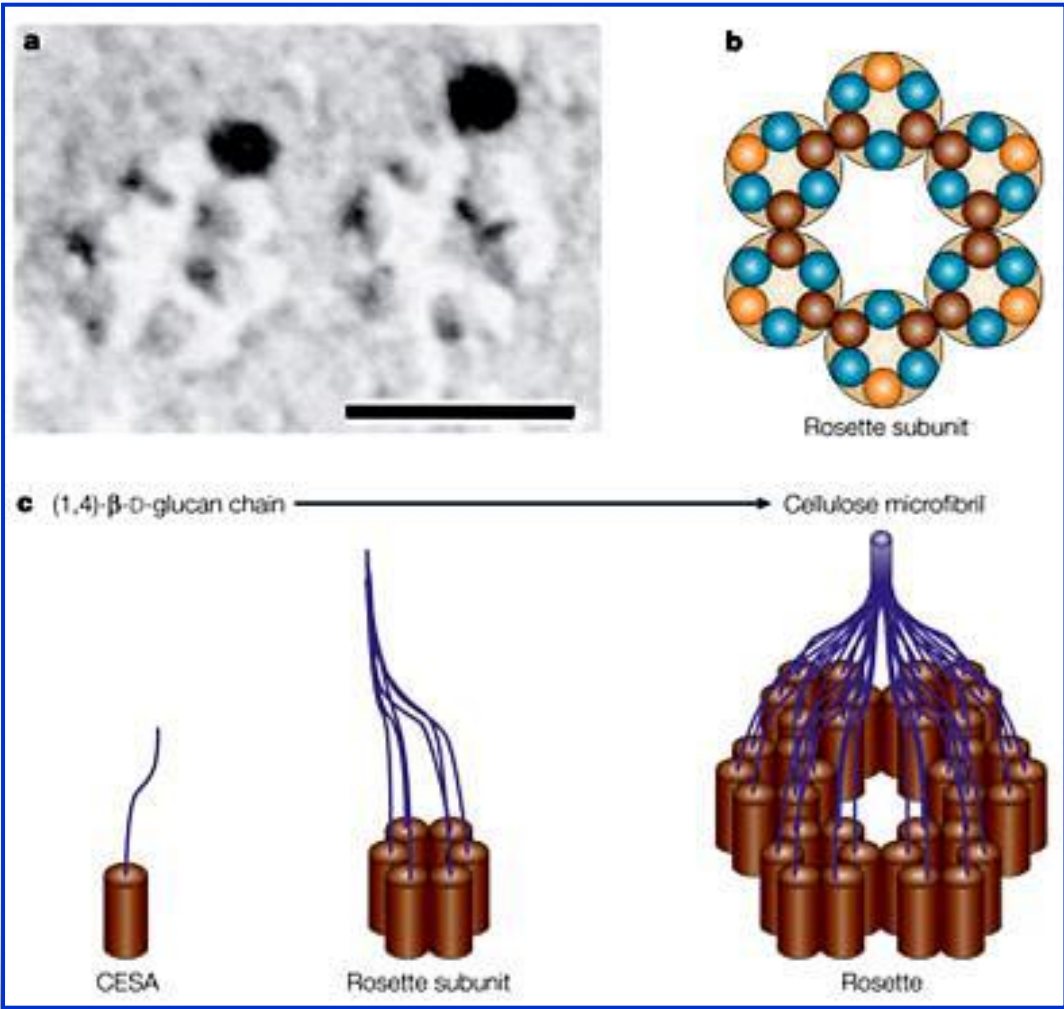
- lokalizace **na vnějším povrchu buňky** (enzymatické komplexy celulóza syntázy CESA zanořené do membrány)
- transport sacharidových monomerů přes membránu, začleňování v místě přichycení k plazmatické membráně
- **orientace mikrofibril** určena dráhami pohybu komplexů v membráně – dráhy patrně determinovány mikrotubuly pod membránou (tj. cytoskelet nepřímo určuje tvar buněk)

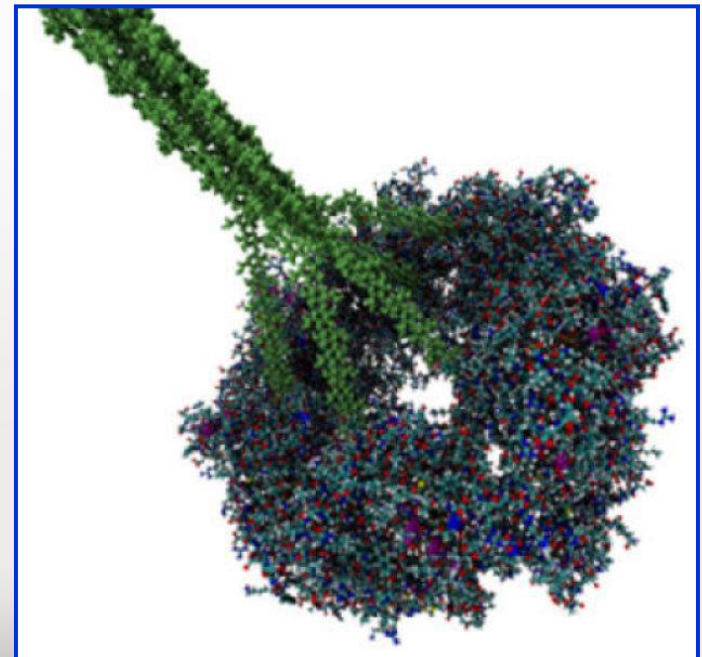
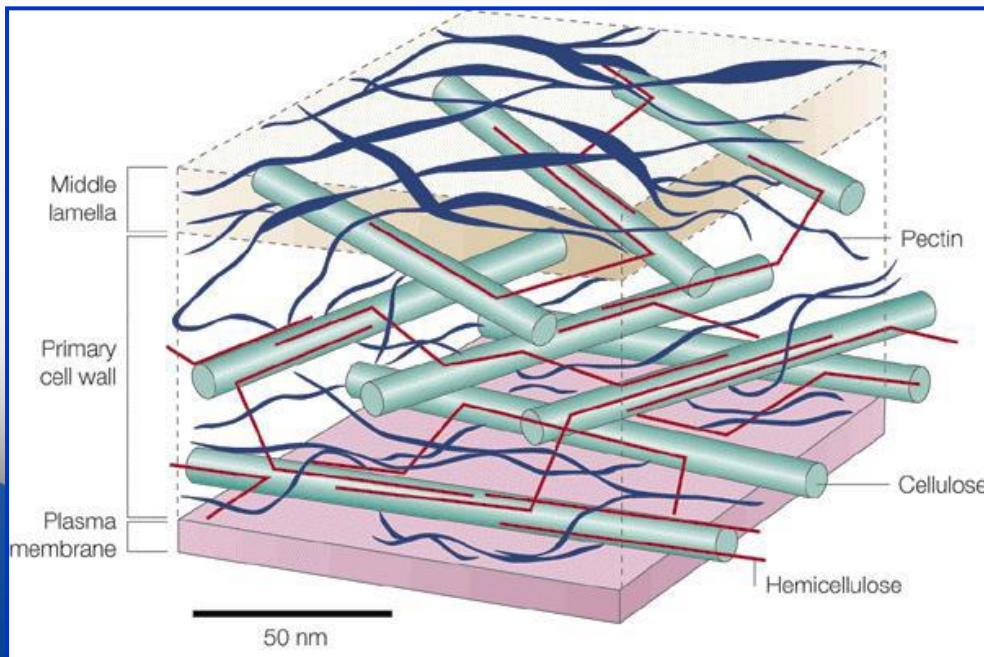
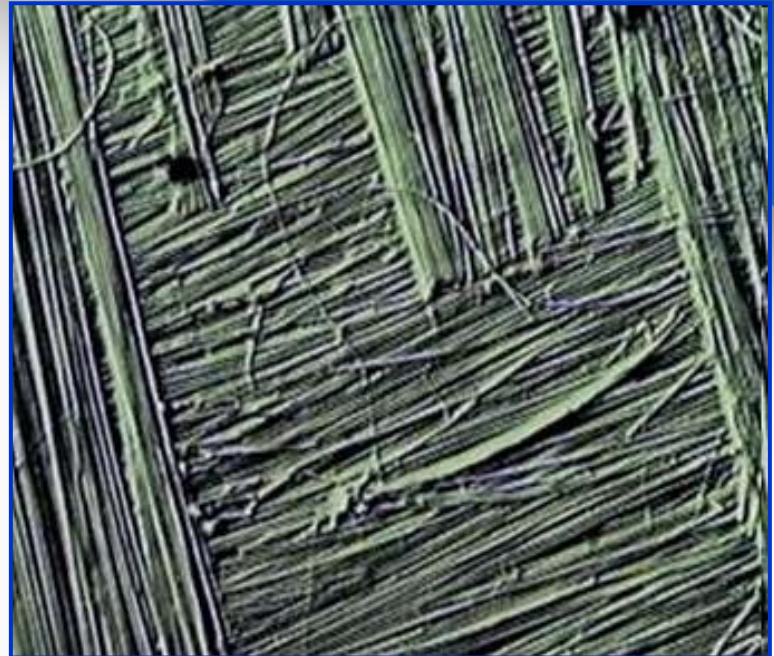
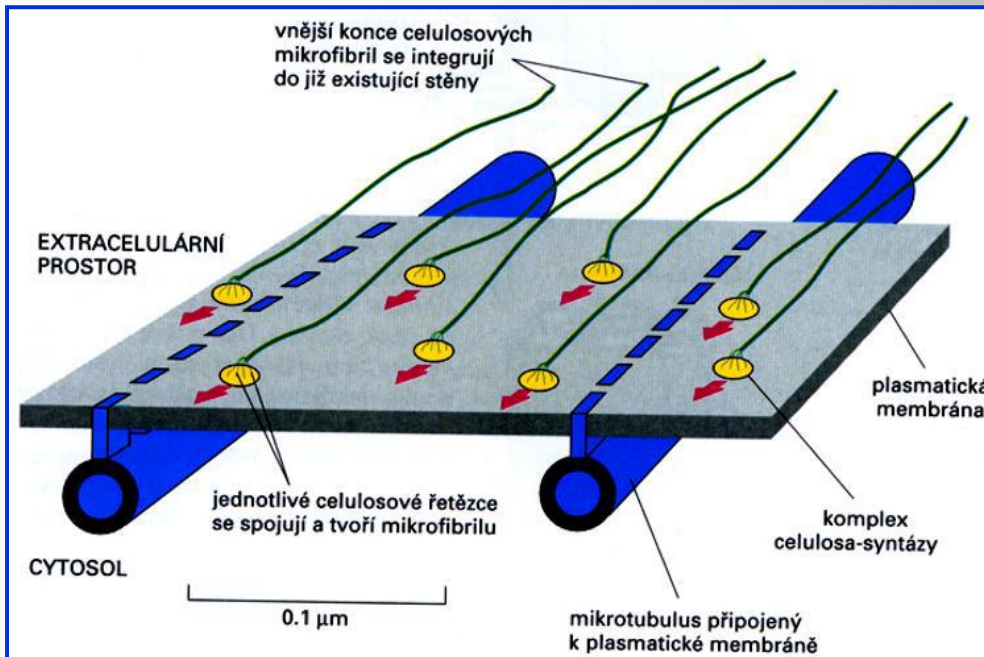
Další stěnový materiál:

- syntéza uvnitř buňky → **exocytóza**

Komplexy celulóza syntázy – CESA lokaliozovány v plazmatické membráně







ECM u živočichů: Funkce ECM

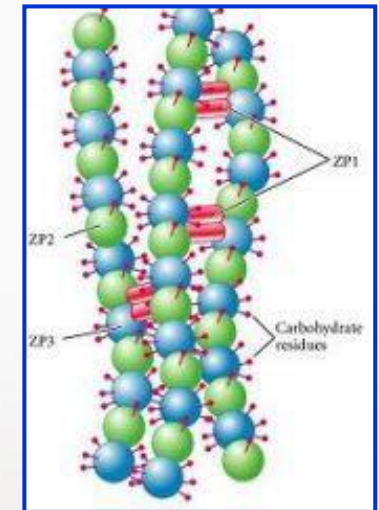
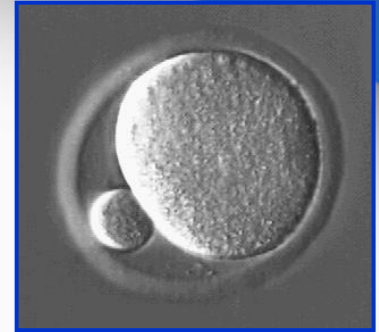
Glykokalyx

= tzv. buněčný plášť

- komponenty plazmatické membrány
- secernovaný materiál
- mechanická ochrana povrchu buňky
- realizace buněčných interakcí

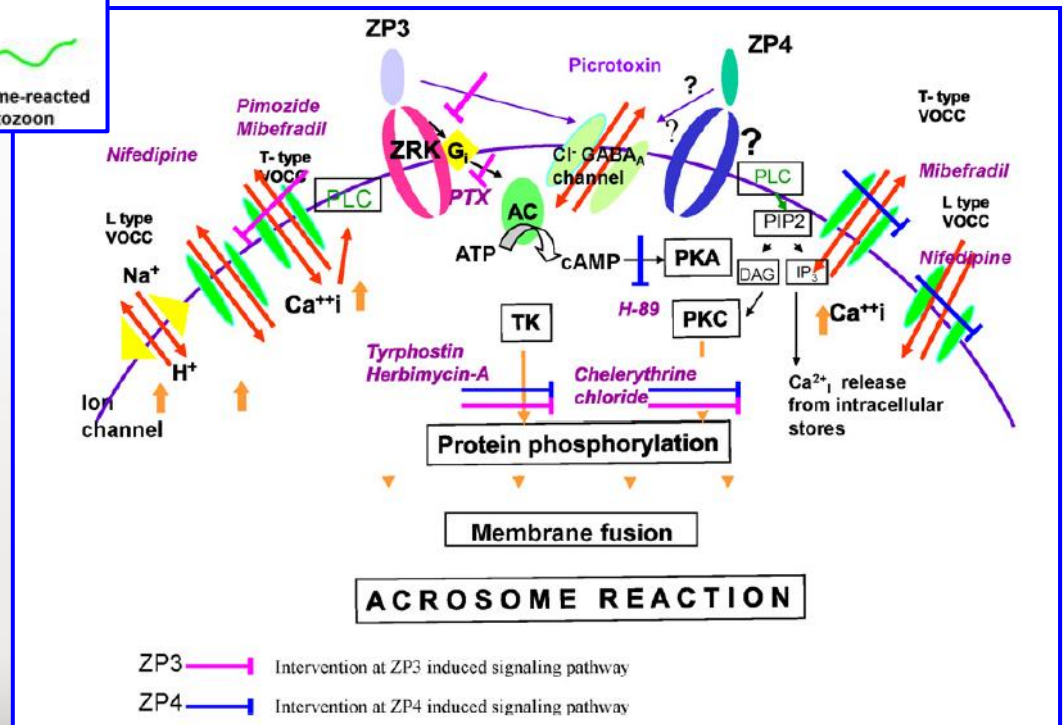
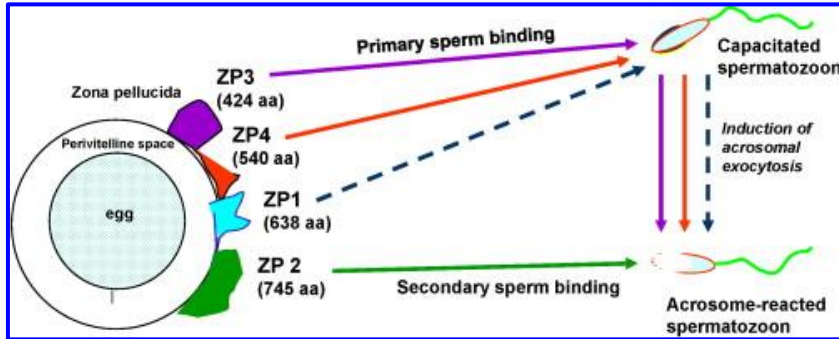
Příklad: [zona pellucida u oocytů](#)

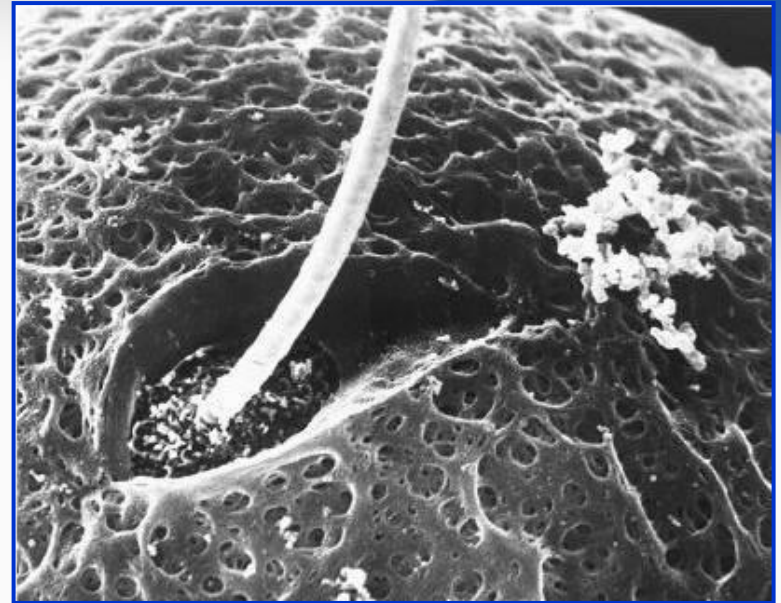
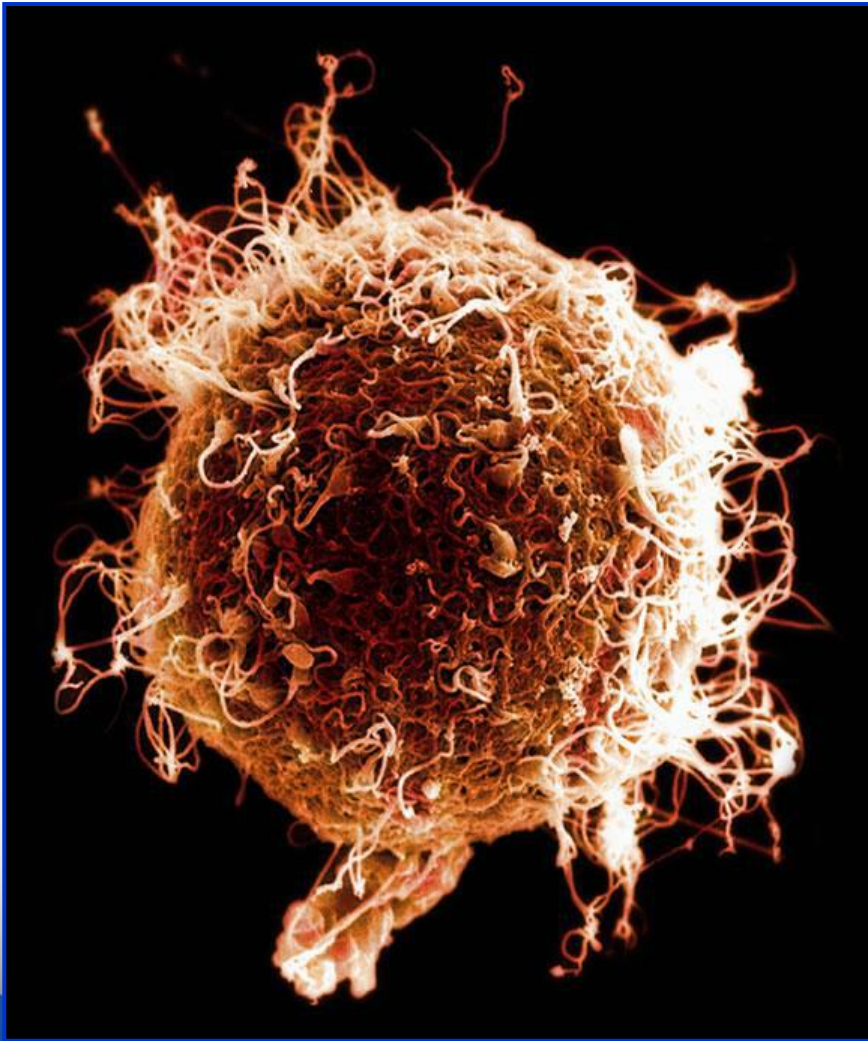
- 3 typy glykoproteinů (ZP2+ZP3, ZP1)
- bariéra mezidruhové fertilizace
- zajištění fertilizace (vazba spermie na ZP2)
- blokování polyspermie v důsledku kortikální reakce (štěpení ZP2, modifikace ZP3)



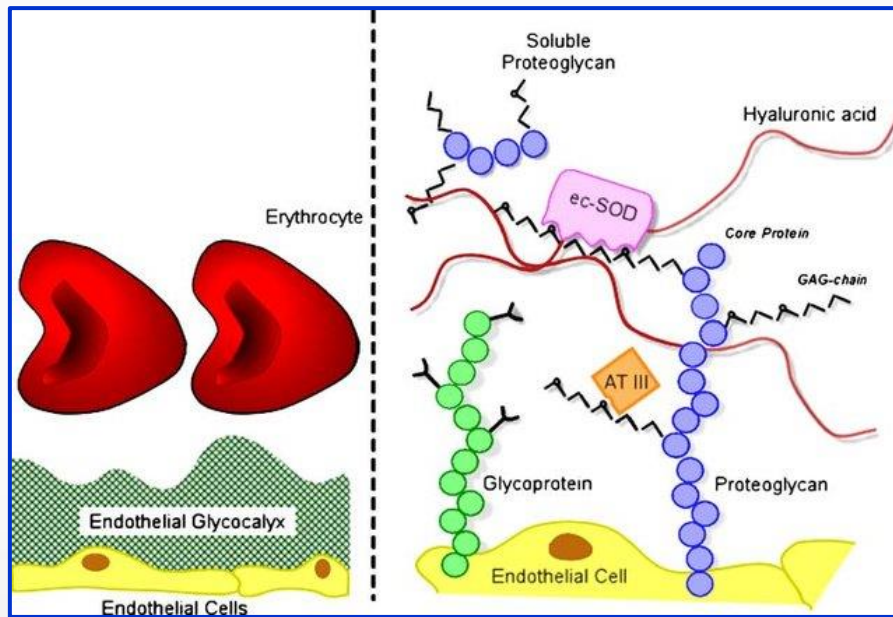
Zona pellucida u lidských oocytů

- 4 typy glykoproteinů: ZP1, ZP2, ZP3, ZP4





Příklad 2: Endoteliální glykokalyx (směrem do lumen cév)



- složení: proteoglykany s glykosaminoglykanovými řetězci (GAG-chain), glykoproteiny s karbohydrátovými řetězci, rozpustné proteoglykany, kyselina hyaluronová, proteiny (extracelulární superoxid dismutáza - ec-SOD; antitrombin III - AT III)

- slizovitý povrch pomáhá pohyblivým buňkám (např. bílým krvinkám) proklouzávat úzkými mezerami, zatímco zabraňuje lepení buněk k sobě navzájem, k erytrocytům a ke stěnám cév

Glykokalyx

- **ochranný** plášť povrchu buňky - chrání před mechanickým a chemickým poškozením
- (složený z glykoproteinů a proteoglykanů)
- každá buňka má své vlastní specifické složení glykokalyxu - určuje tedy i **identitu** buněk („uniformy“)
- pomáhá při vzájemném **rozpoznávání** buněk a při vytváření **adhezí**

Extracelulární matrix (ECM)

- odlišné uspořádání a vlastnosti v závislosti na typu tkáně
- **pojivové tkáně** (kosti, šlachy, chrupavky, sklivec):
převaha ECM (nutnost mechanické pevnosti)
- **svaly, epitely, nervové tkáně**:
minimum ECM (bazální lamina), mechanickou oporu zajišťuje cytoskelet

Funkce ECM:

1. mechanická opora
2. specifické funkce tkání (vazba signálních molekul)
3. regulace embryogeneze

ECM u živočichů: Funkce ECM

Složení ECM

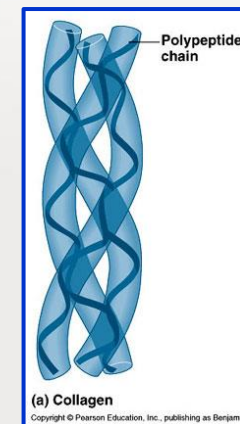
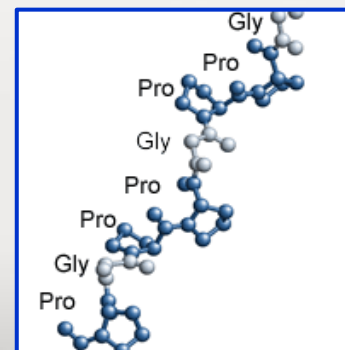
buňky příslušné tkáně produkují složky ECM intracelulárně a vylučují exocytózou:

1. kolagenová vlákna
(zajištění pevnosti v tahu; základní složkou **kolagen**)
2. elastická vlákna
(zajištění pružnosti; základními složkami **elastin** a **fibrilin**)
3. výplňová komponenta
(zábrana stlačování; základními složkami **hyaluronany** a **proteoglykany**)
4. adhezivní molekuly
(**glykoproteiny**)

různé typy ECM v různých tkáních (izoformy, regulace genové exprese)

(1) Kolagenová vlákna

- **kolagen** – u savců 25% z celkového množství proteinů v těle; (~20 genů)
- trojřetězcová helikální struktura (trihelix) = **tropokolagen**
- **trihelix** → **kolagenové mikrofibrily** → **kolagenové fibrily** (průměr 10-300 nm, délka v μm) → **kolagenová vlákna**
- **uspořádání fibril podle typu tkáně:**
 - kůže – střídající se vrstvy s různou orientací
 - šlachy = paralelní svazky ve směru shodném s hlavní osou napětí
- syntéza: **fibroblasty**, **epitelové buňky**, **osteoblasty**



Struktura kolagenu

- trihelix – trojšroubovice - tropokolagen
- stabilizace pomocí **vodíkových vazeb** mezi N- a C-konci jednotlivých molekul
- vysoký obsah **glycinu** (každá 3. AA), **prolinu**, **hydroxyprolinu**, **hydroxylysinu**
- člověk: asi **27** různých typů kolagenů

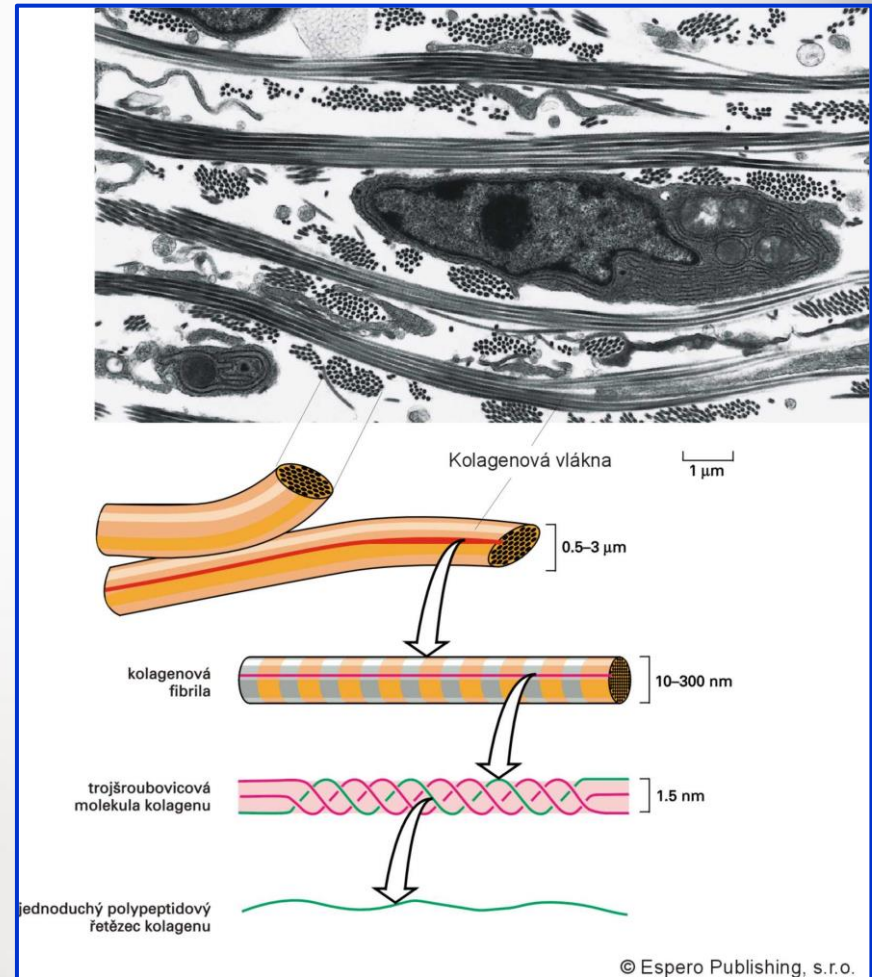
Kolageny **vláknité** (typ I, II, III, V)
 síťové (typ IV)
 spojovací (typ VII)

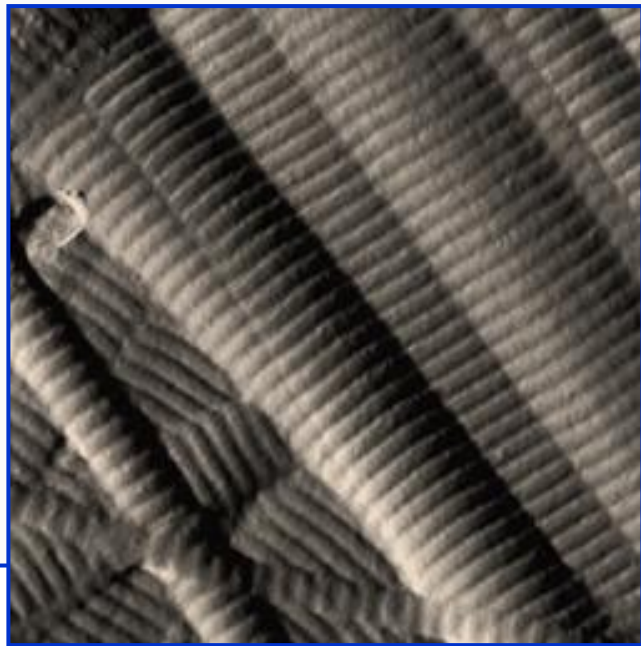
Struktura kolagenu

- vlákna **protokolagenu** stáčená po způsobu lana tak, že jednotlivá vlákna přesahují o $\frac{1}{4}$ sousední vlákno
- překryvy vláken a nahloučení kyselých a bazických zbytků jsou příčinou **pruhování** struktury viditelného v elektronovém mikroskopu
- vzniká tak mechanicky velmi odolná **mikrofibrila**, jejíž molekula je dále stabilizována příčnými vazbami mezi aminokyselinovými zbytky (především lysinu a jeho derivátů)

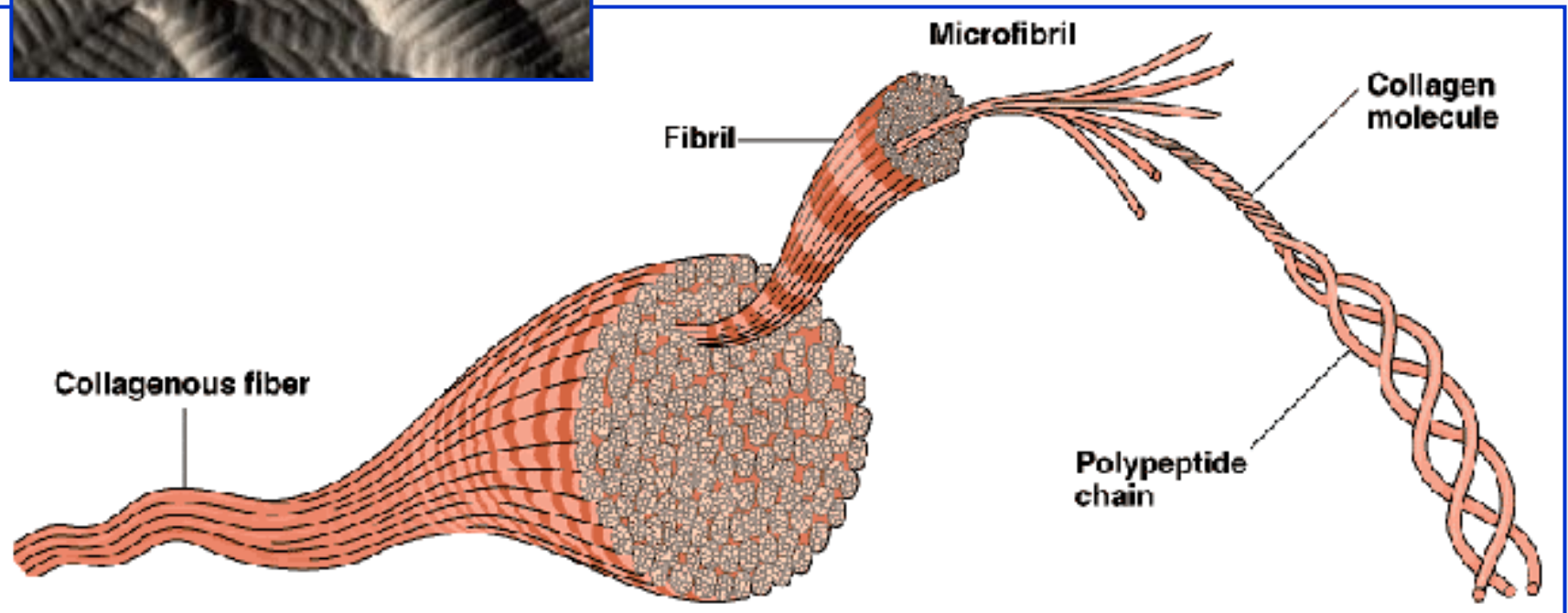
Organizace a struktura kolagenu

- kolagenové fibrily v pojivové tkáni kůže kuřecího embrya
- fibrily organizovány do svazků – některé v rovině řezu, jiné kolmo
- fibroblast vylučující kolagen i ostatní složky ECM
- molekulární struktura kolagenové fibrily

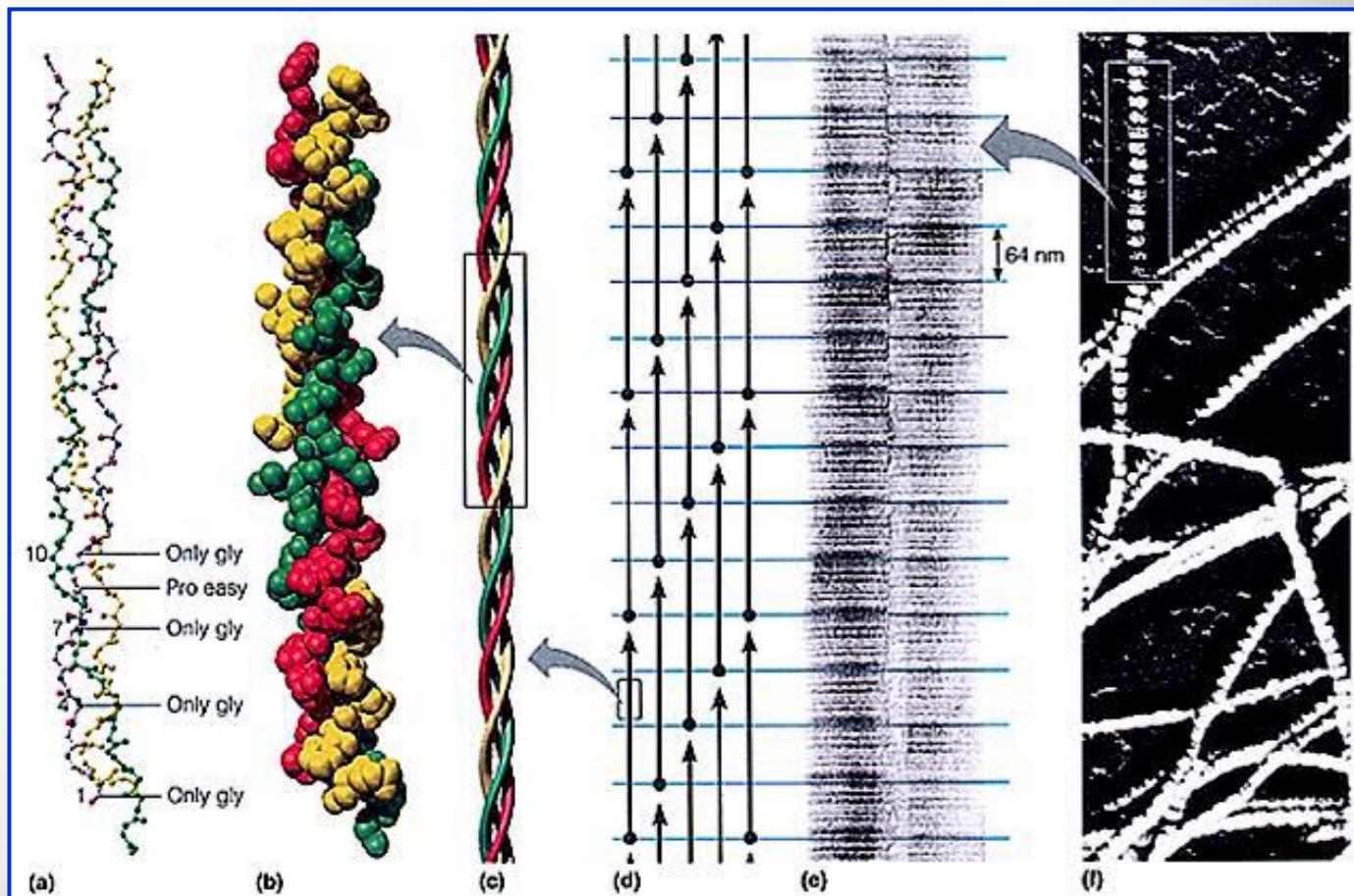




Organizace a struktura kolagenu



Struktura kolagenu



(a) – (c): tropokolagen; (d) – mikrofibrila; (e) – příčně pruhovaná struktura; (f) – obraz kolagenových vláken pojiva

Syntéza kolagenu

- extracelulární uspořádání = **kohezní agregáty**
- **prokolagen** = secernovaná forma kolagenu; na obou koncích molekuly přídavné peptidy, které blokují uspořádání do fibril
 - prokolagen I: N-konec / 150 AA
 - C-konec / 250 AA
- Kolagenáza (ec): odštěpí přídavné peptidy z prokolagenu → **kolagen**
- hydroxylace (Pro, Lys), připojení cukrů (Lys), tvorba disulfidických můstků
- spontánní **sestavení molekul do vláken** (fibrily)

Klasifikace kolagenů:

Třída 1:

- typy I, II a III
- dlouhé řetězce
- tzv. „ortopedické“ kolageny (kosti, chrupavky,...)

Třída 2:

- typy IV, VII a VIII
- komponenty bazální laminy

Třída 3:

- typy VI, IX, a X
- různé určení (např. stěny krevních cév)

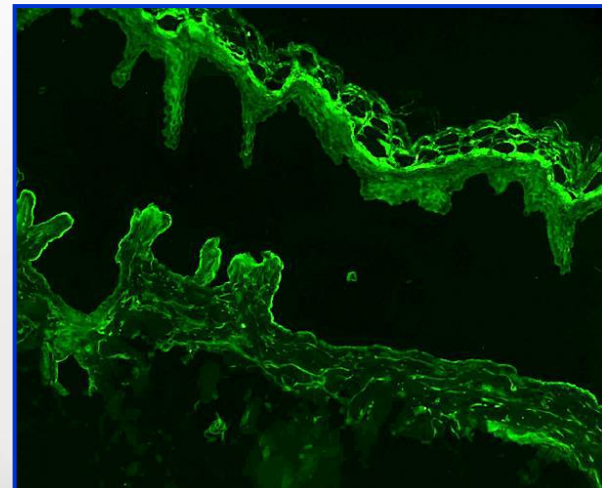


Poruchy syntézy kolagenu

- **osteogenesis imperfecta**
defekt syntézy kolagenu I (bodová mutace, AD)
abnormality kostí, časté fraktury
- **epidermolysis bullosa**
defekt syntézy kolagenu VII nebo cytokeratinů (IF)
extrémně křehká pokožka (puchýře, traumata)



OI



EB

[o nemoci motýlích křídel](#)[o nás](#)[EB Centrum](#)[osvěta o EB](#)[aktuality](#)[kontakty](#)[eshop](#)[jak pomáhat](#)[Onemocnění EB](#)[Pro pacienty a rodiny](#)[Příběhy lidí s EB](#)[Úvod](#) / [o nemoci motýlích křídel](#)

O nemoci motýlích křídel

Tímto pojmem označujeme vrozené puchýřnaté onemocnění kůže Epidermolysis bullosa congenita (zkráceně EB). Tato dědičná choroba patří mezi tzv. vzácná onemocnění. U nás jí trpí přibližně 300 lidí, v Evropě je cca 30 000 nemocných a ve světě žije okolo 500 000 pacientů s EB. Nemoc je geneticky podmíněná a v současnosti ji nelze zcela vyléčit. Díky vysoce specializované lékařské péči se však daří život nemocných s EB výrazně zlepšovat. K tomu můžete [přispět i vy](#).

Zkuste si, jak vidí svět lidé s nemocí motýlích křídel

[zdravý člověk](#)[člověk s eb](#)

Fotogalerie DEBRA ČR

[Cyklo-tým DEBRA ČR na cestě za snem](#)



[Tuzemský ozdravný pobyt 2016](#)

[další fotografie](#)



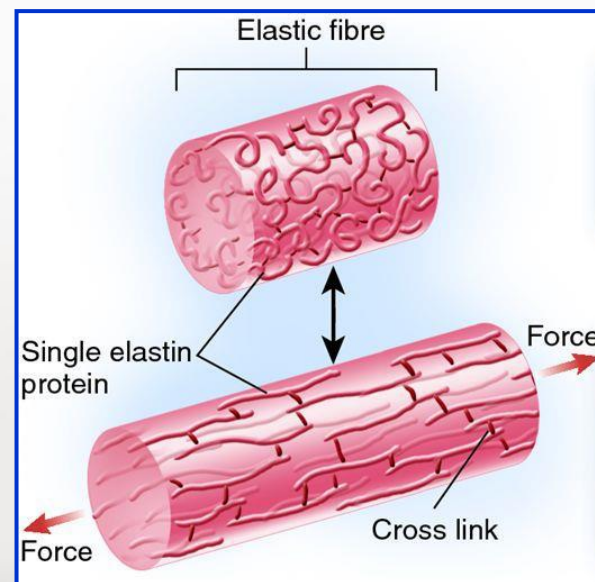
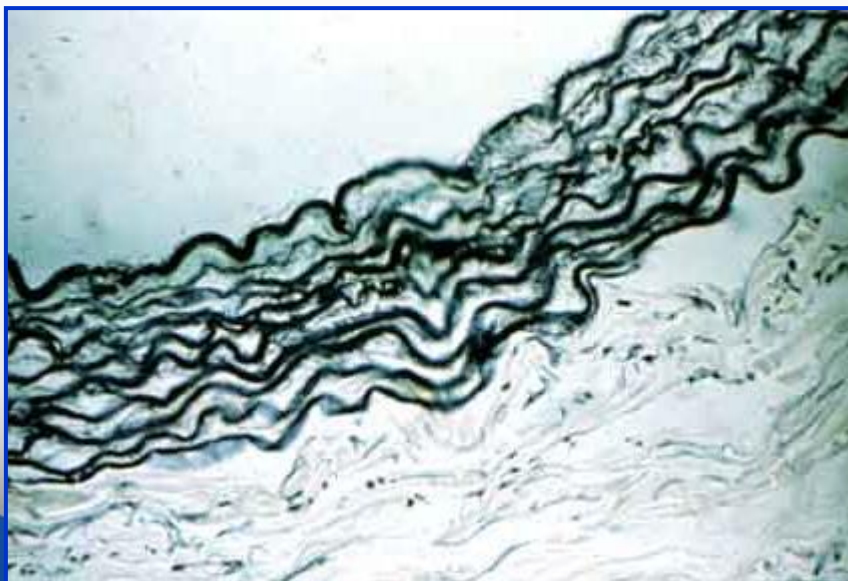
Poruchy syntézy kolagenu

- **hyperplastická kůže**
abnormálně roztážitelná kůže je příznakem genetického syndromu, který je důsledkem chyby v sestavování nebo zesíťování kolagenu (včetně nepřítomnosti/nefunkce kolagenázy)



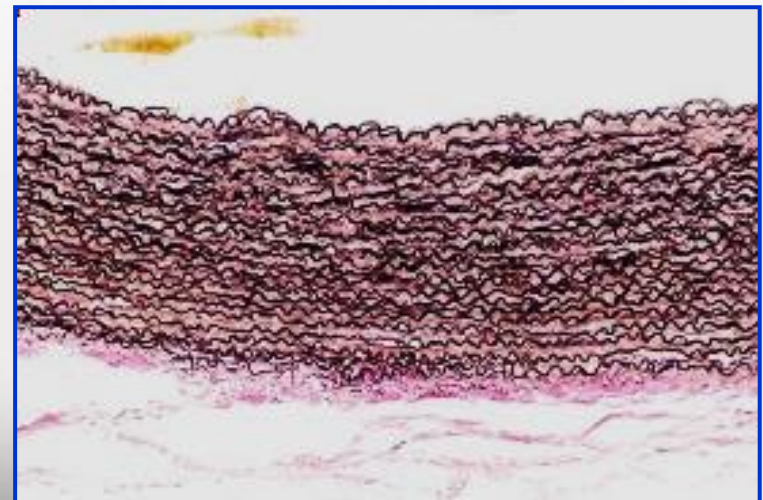
(2) Elastická vlákna

- elastin + fibrilin
- kožní pojivo, stěny kapilár, plíce
- pružnost tkání (po natažení návrat do původního tvaru)
- poruchy způsobují **vznik vrásek**

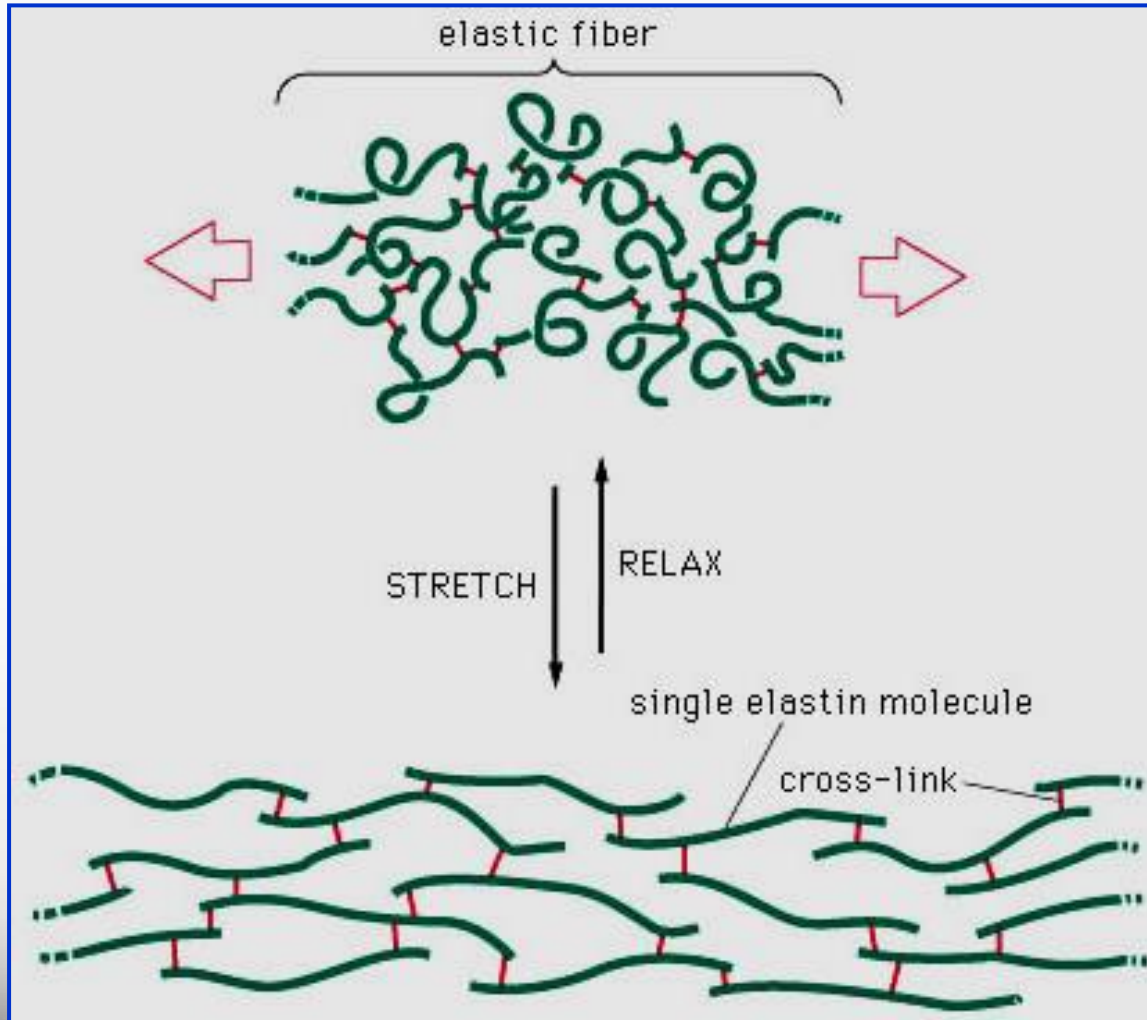


Elastin

- neglykosylovaný, hydrofobní polymer
- základní jednotkou je rozpustný monomer **tropoelastin**, 60 kDa, 830 AA, značné množství Gly, Pro, Ala, Val, Lys
- secernovaný fibroblasty, endoteliemi, buňkami hladkého svalstva, chondrocyty a keratinocyty
- **náhodné změny konformace**, mnoho variant
- tvorba **hustých elastinových sítí** (vysoká odolnost vůči tahu a tlaku, ochranu zajišťují vlákna kolagenu)



Elastin zajišťuje odolnost vůči tlaku



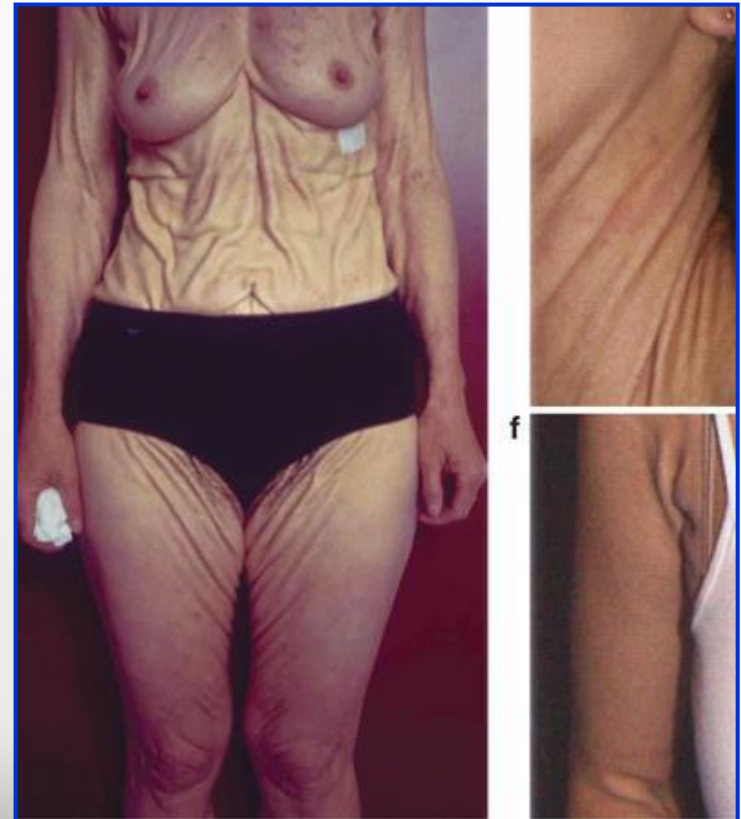


Poruchy elastických vláken

- **Marfanův syndrom**
AD mutace v genu pro fibrilin 1
postižení kostry, CVS, kůže, očí
- **cutis laxa**
AD mutace v genu pro elastin
(nedostatečná pružnost tkání)



MS



CL



Marfanův syndrom

základní kritéria:

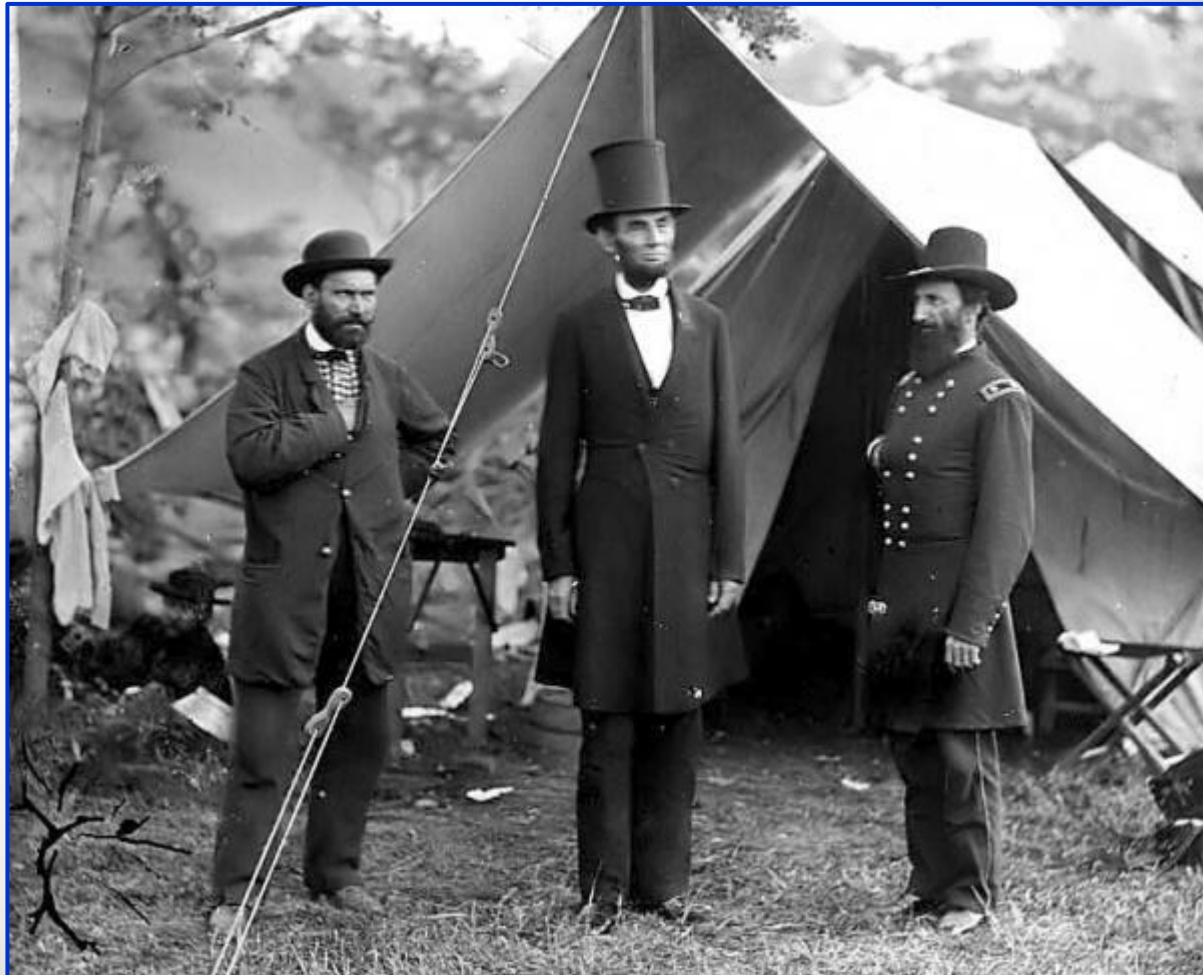
- vysoká postava
- dlouhé tenké končetiny
- dlouhé tenké prsty („nemoc pavoučích prstů“)
- dislokace oční čočky
- anomálie srdce a cév

Niccolo Paganini





Abraham Lincoln

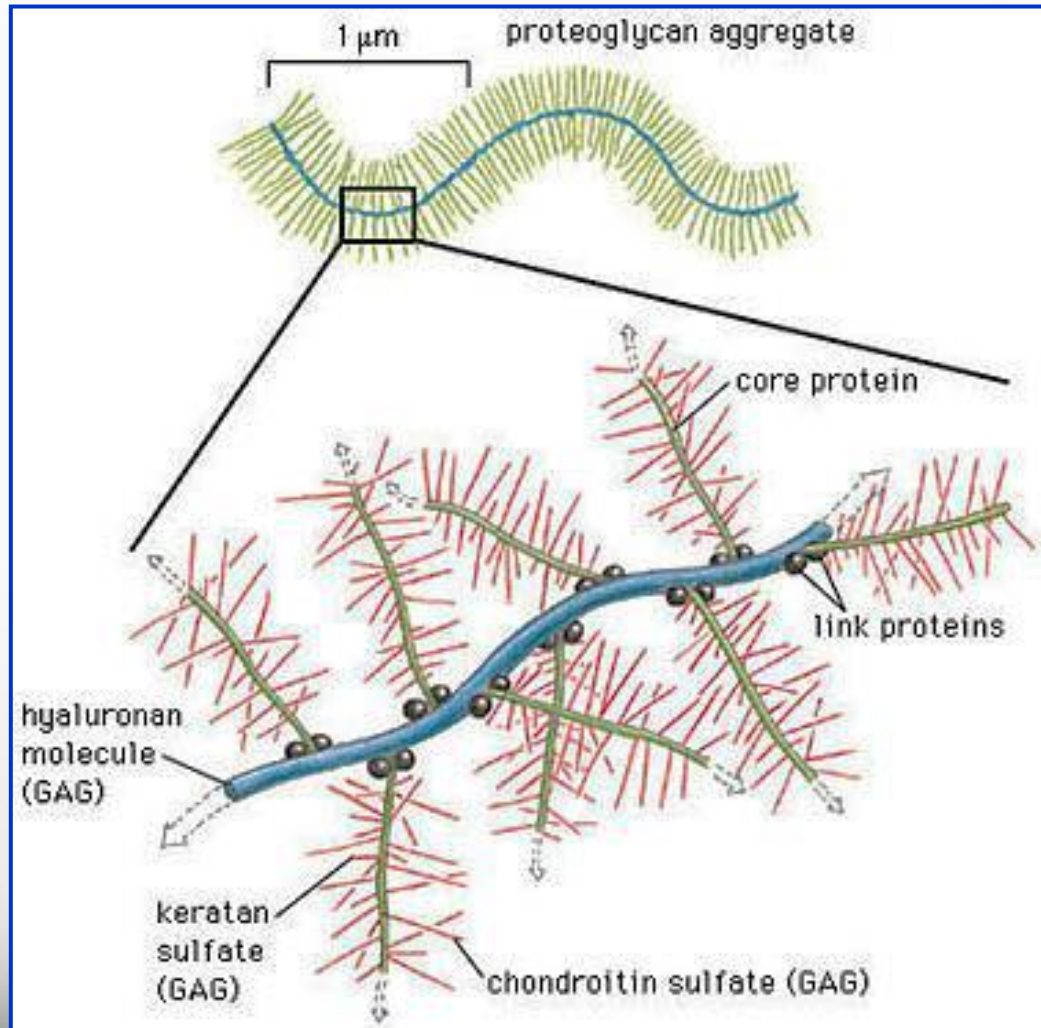


Abraham Lincoln

(3) Výplňová komponenta

- **hyalurony:** kyselina glukuronová + $\beta(1,3)$ -N-acetylglukosamin (až 50 000 disacharidů v 1 molekule)
- **proteoglykany:** centrální protein + řetězce GAG (glykosaminoglykany - mukopolysacharidy)
- **tvorba viskózního hydratovaného gelu** (vysoká afinita k molekulám vody, vznik vodíkových můstků)
→ **tendence zaujímat velký objem** → **odolnost vůči tlaku**
- vazba na **povrch migrujících buněk** – usnadnění pohybu a proliferace

Proteoglykanový agregát z chrupavky



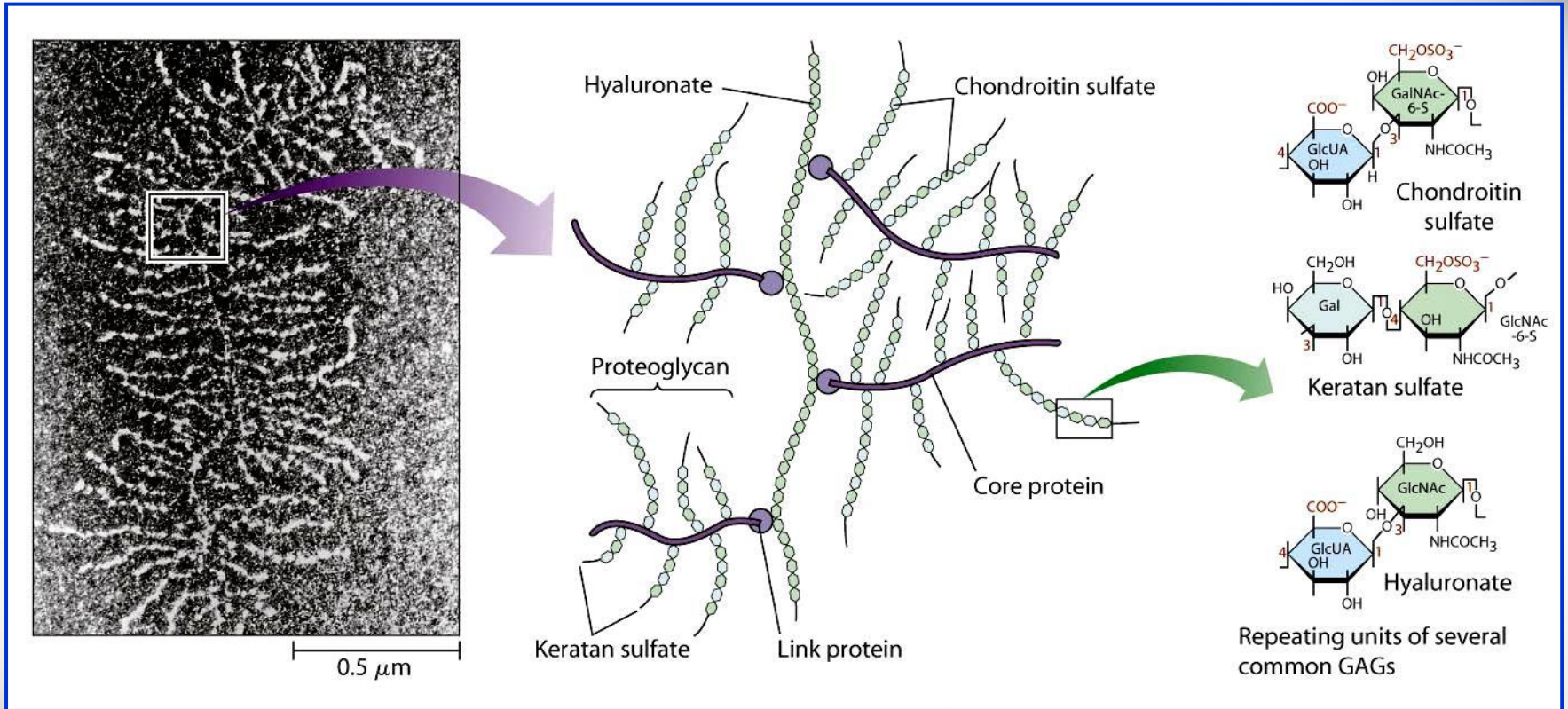
Proteoglykany

- součást výplňové komponenty (zábrana stlačování), různorodé složení i velikost:
centrální protein + řetězce GAG

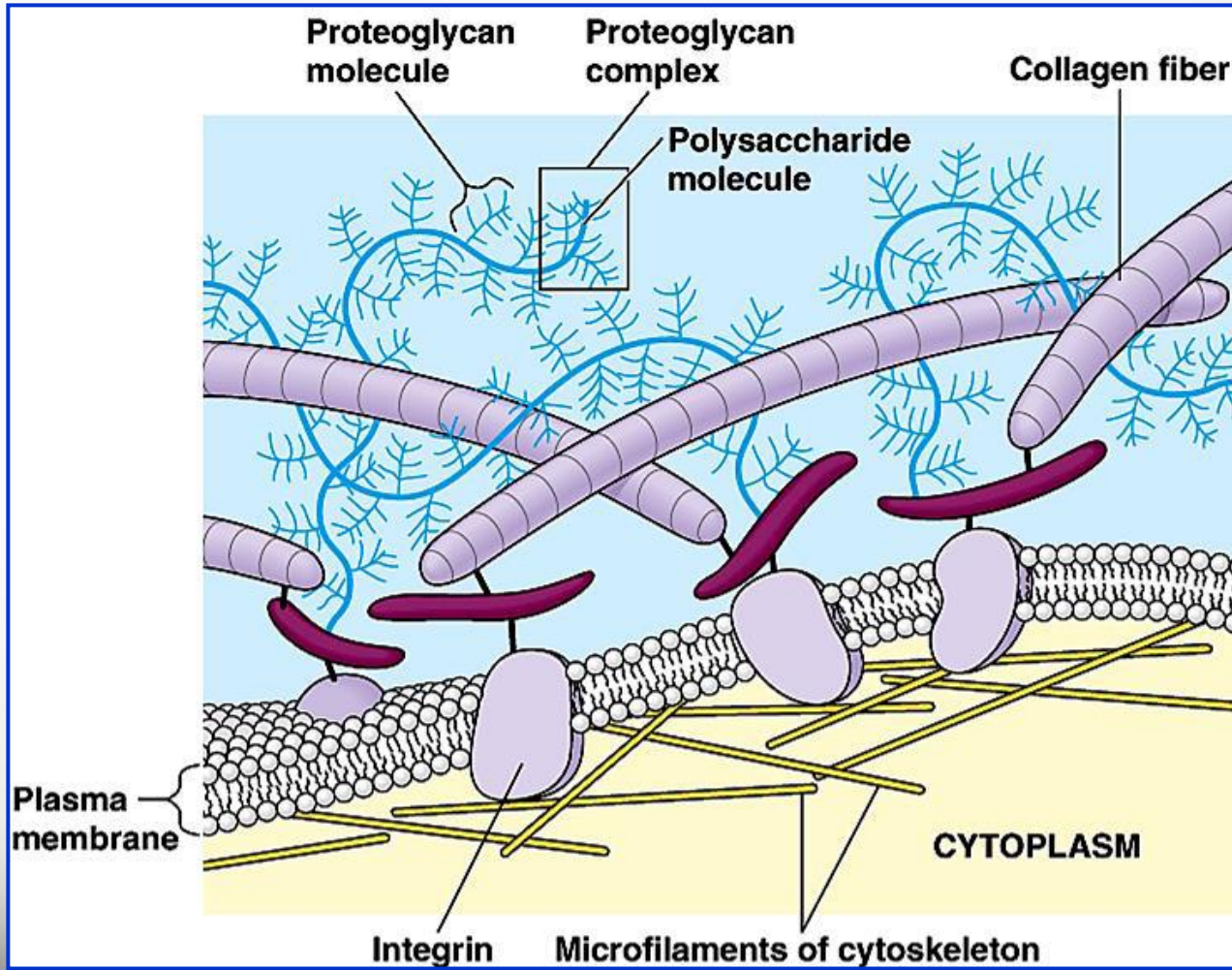
GAG (glykosaminoglykany)

- nevětvené polysacharidy obsahující deriváty uronových kyselin a hexosaminové zbytky
- minimum v kostech a šlachách, převaha ve sklivci
- **silně hydrofobní** molekuly
- **rozvolněné konformace** zabírající obrovský prostor
- i v nízkých koncentracích **tvorba gelu**
- různá velikost pórů v gelu – ECM funguje jako filtr
- **vazba signálních molekul**
- **ovlivnění migrace buněk**

Struktura proteoglykanů



Struktura a uspořádání ECM



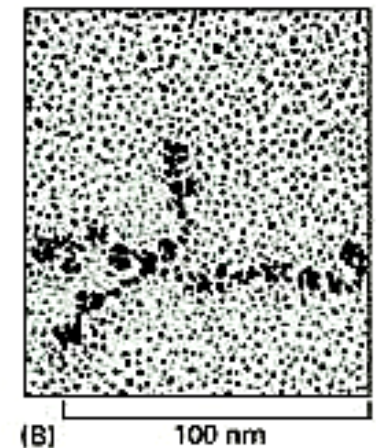
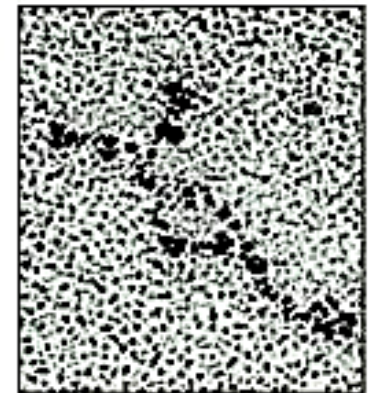
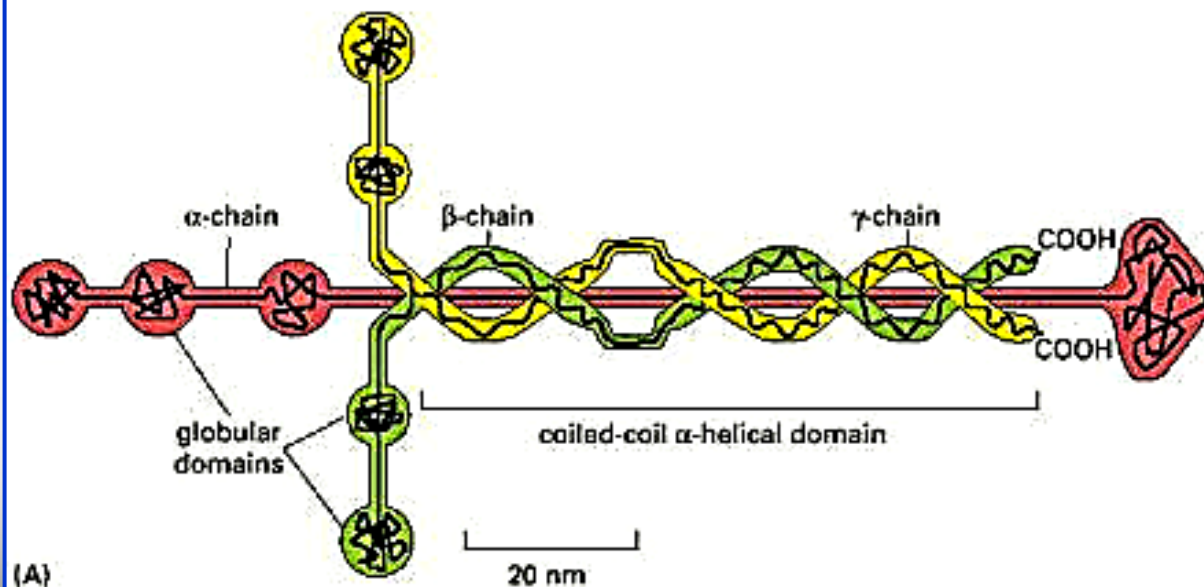
(4) Adhezivní glykoproteiny

- zajištění interakcí v ECM (na čistý kolagen je přichycení obtížné)
- **laminin** (heterotrimer – tvar kříže; multiadhezivní protein; migrace, tvar, adheze buněk)
- **fibronektin** (dimer – disulfidové můstky na C-konci; 1 gen → alternativní sestřih → 20 izoform; migrace buněk)
obsahují sekvenci **RGD** (Arg-Gly-Asp)
- **tenascin** (antiadhezivní vlastnosti, příbuznost s fibronektinem)
- **fibrinogen** (agregace trombocytů)

Laminin

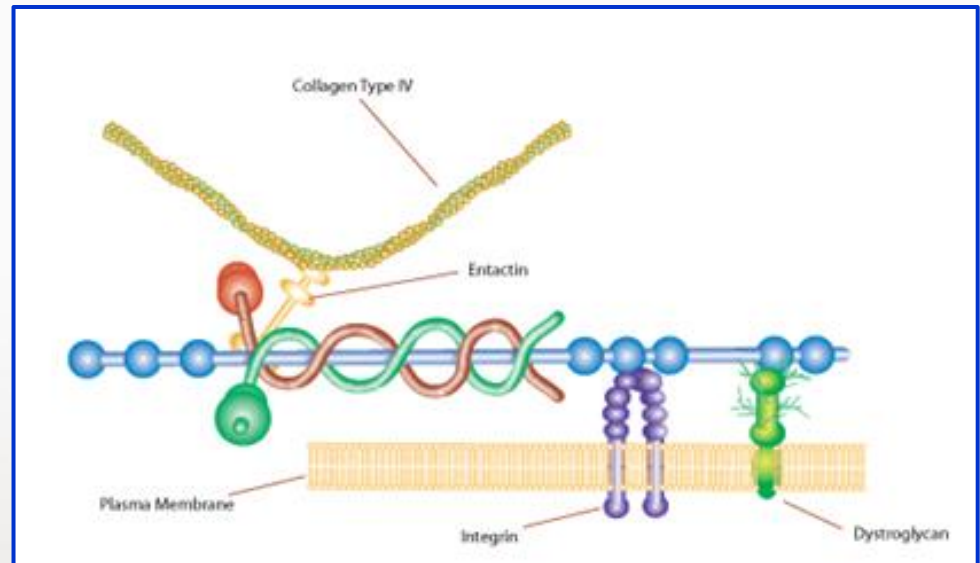
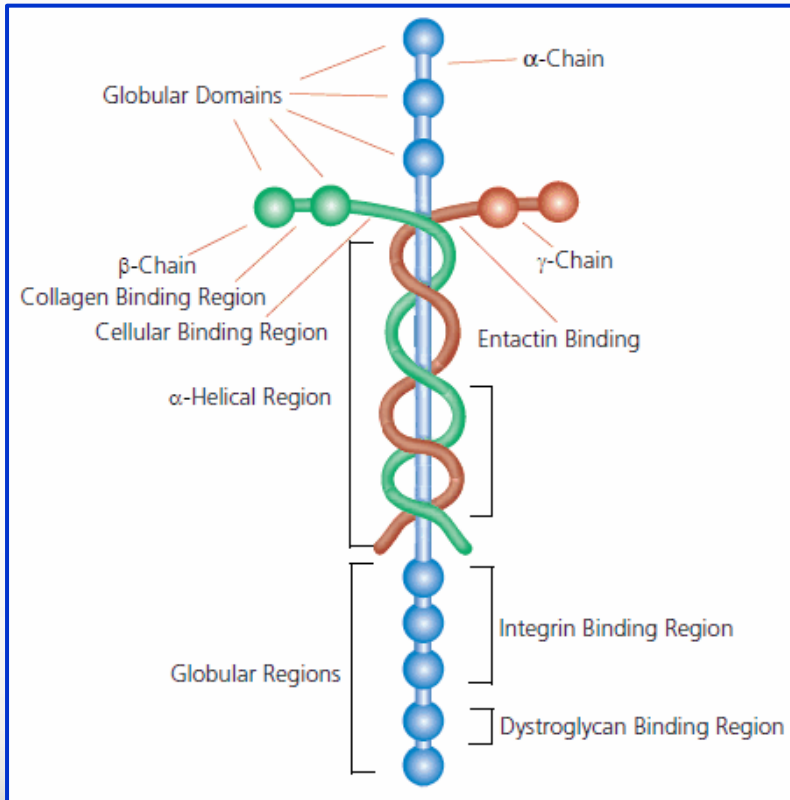
The Structure of Laminin

(from Molecular Biology of the Cell)

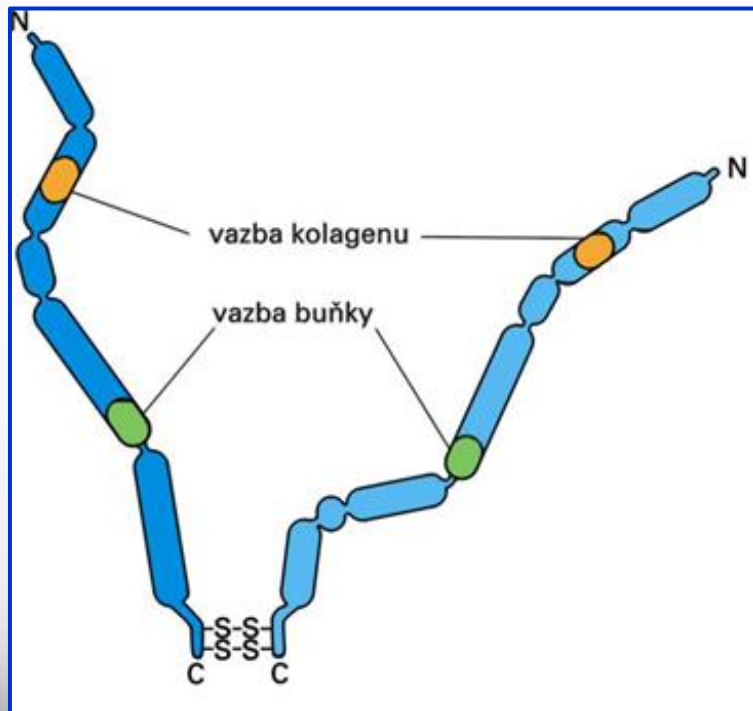


Laminin

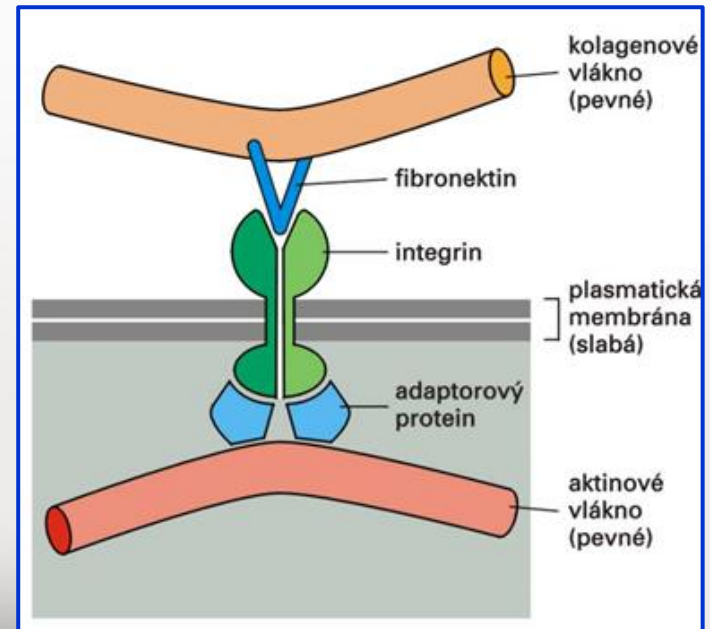
- heterotrimer – tvar kříže;
multiadhezivní protein; migrace,
tvar, adheze buněk



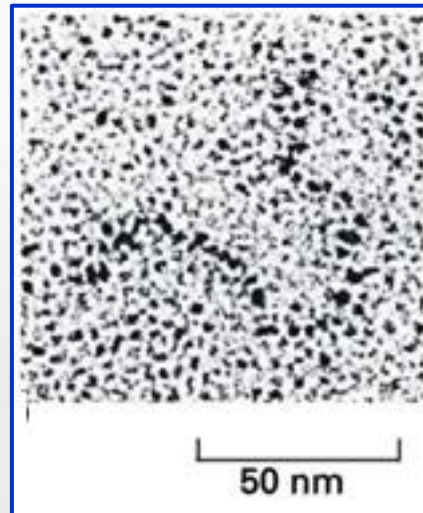
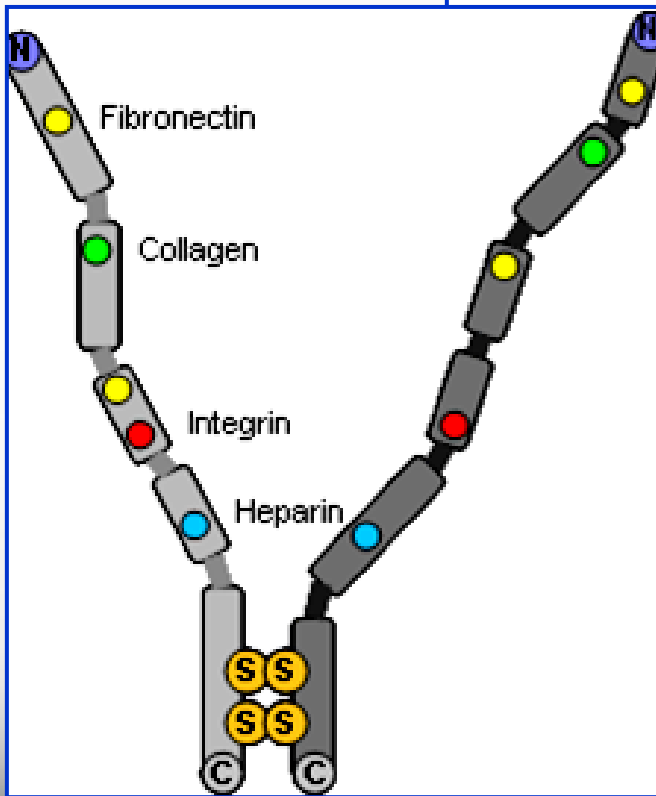
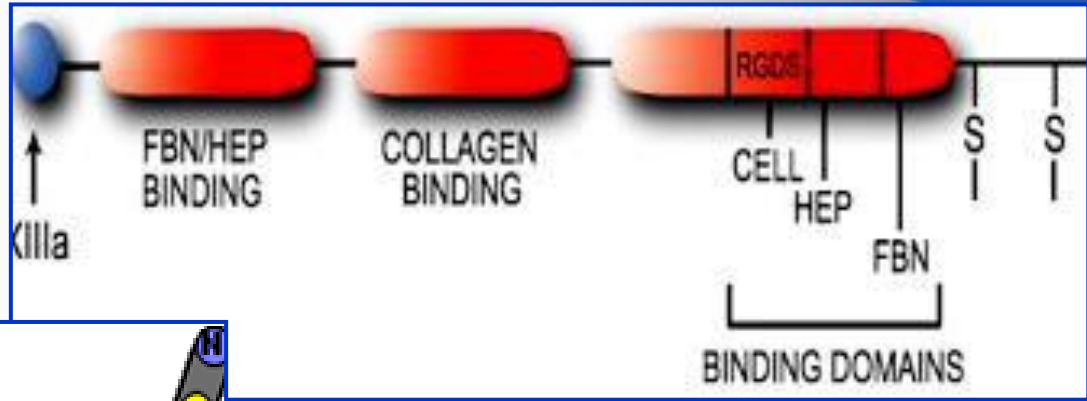
Fibronektin



- jedna část molekuly fibronektinu se váže na kolagen, druhá na buněčnou strukturu (integrin)
- integrin se extracelulární doménou váže na fibronektin, intracelulární doménou na aktinová filamenta v buňce

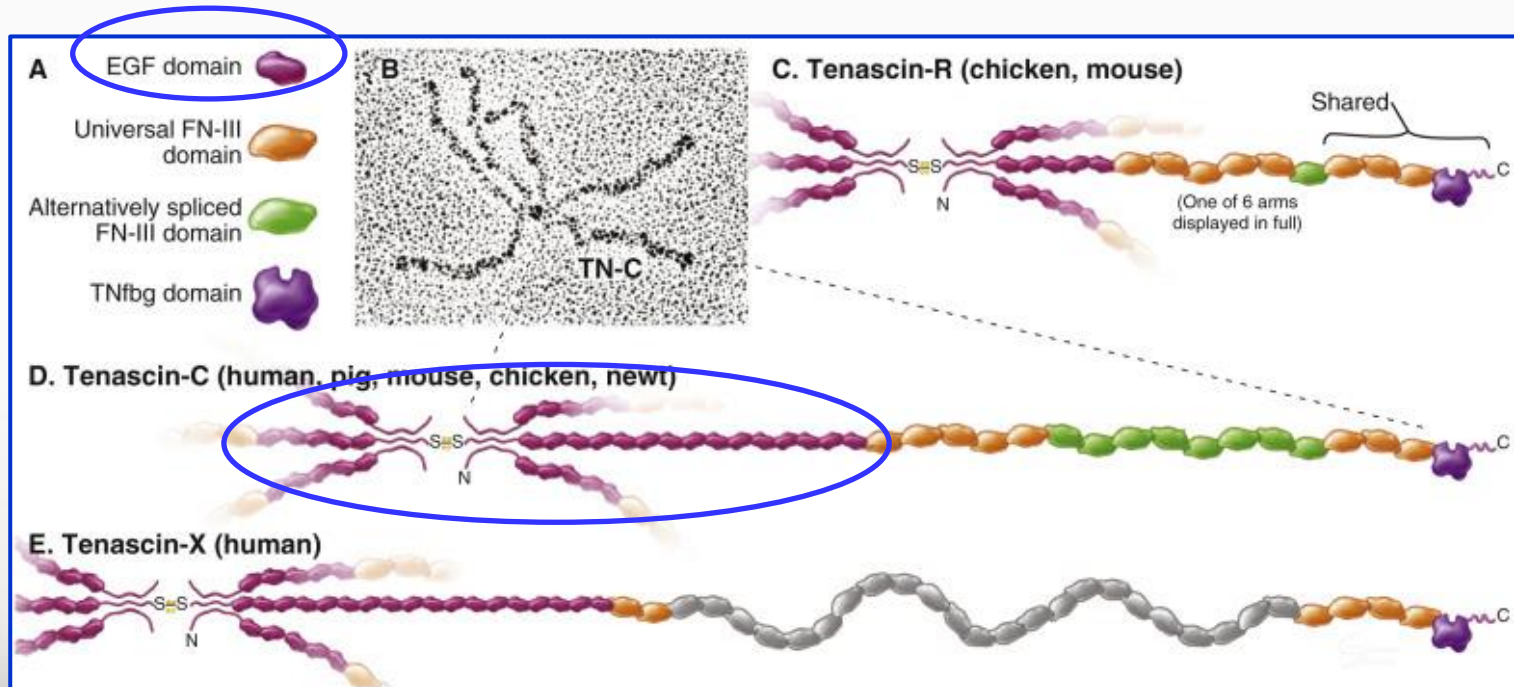


Fibronektin



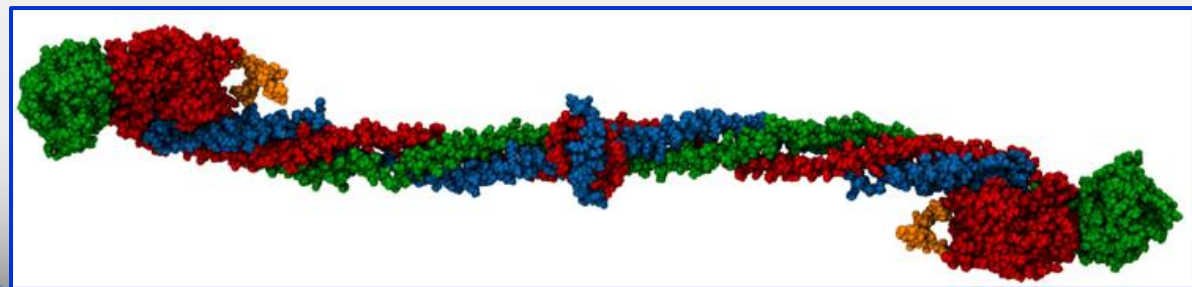
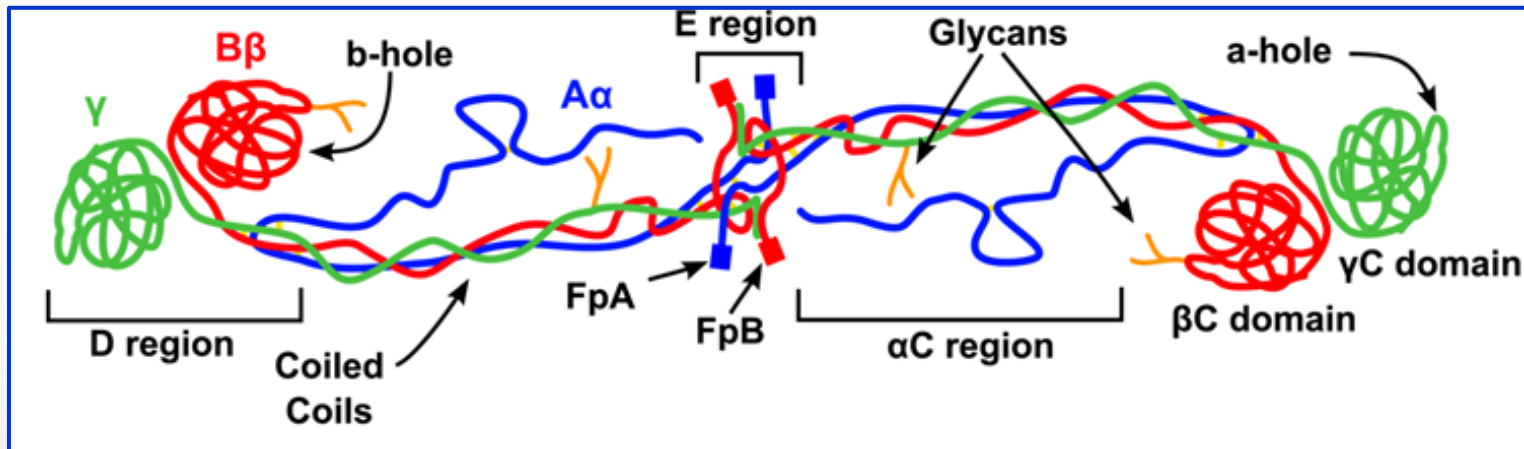
Tenascin

- typickou součástí struktury tenascinů jsou **EGF-like repeats**
- interaguje s fibronektinem



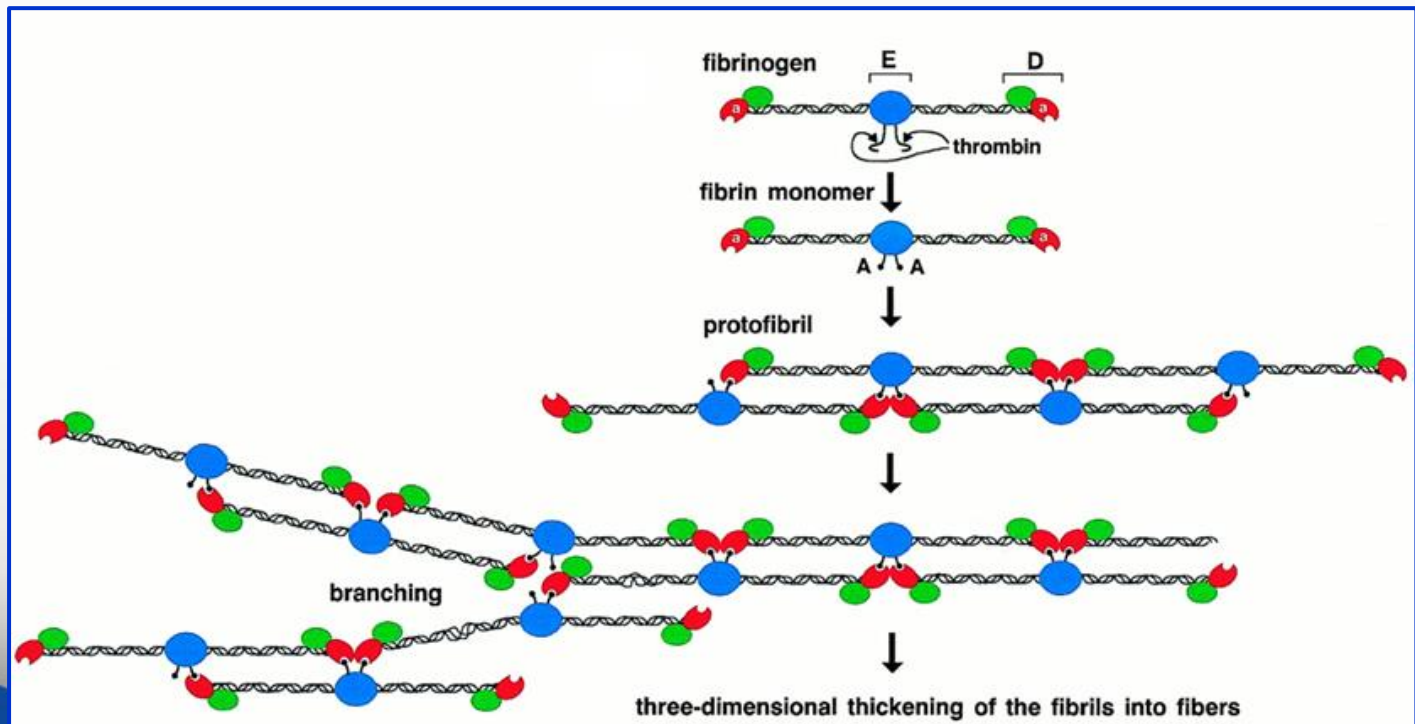
Fibrinogen

- rozpustný glykoprotein (340 kDa)
- složený ze tří párů polypeptidů $(\alpha\beta\gamma)_2$; řetězce kovalentně propojeny disulfidickými můstky v N-části molekul (C-konce jsou rozvolněné)



Fibrinogen

- fibrinogen je posledním stupněm (zymogenem) **koagulační kaskády**, je aktivován proteázou trombinem, který přeměňuje fibrinogen na fibrinové monomery, které následně polymerují a tvoří hustou síť vláken
- síť je dále stabilizována tvorbou vazeb mezi postranními řetězci

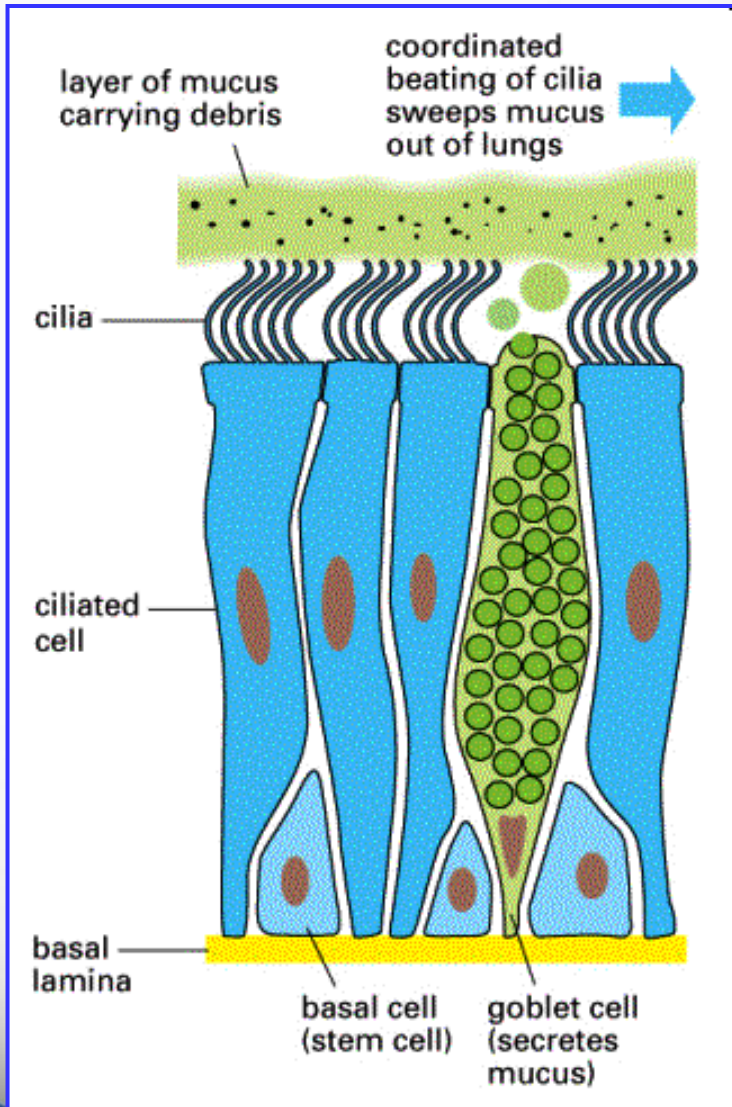


ECM v epitelech

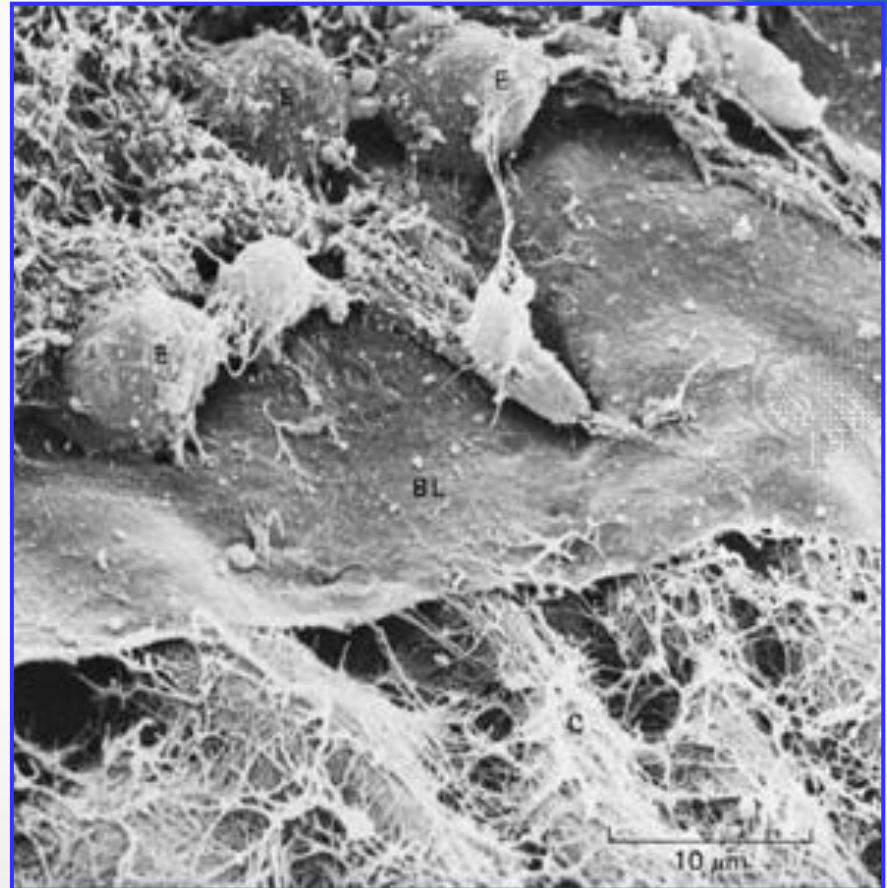
- epiteliální list: **apikální povrch**
 bazální povrch → další druhy tkáně
- polarizace buněk

Bazální membrána (bazální lamina)

- tenká tuhá vrstva ECM pod bazálním povrchem
- tloušťka 50 – 200 nm
- **kolagen IV** (síťová struktura), **laminin**, **entaktin**
(spojovací protein)

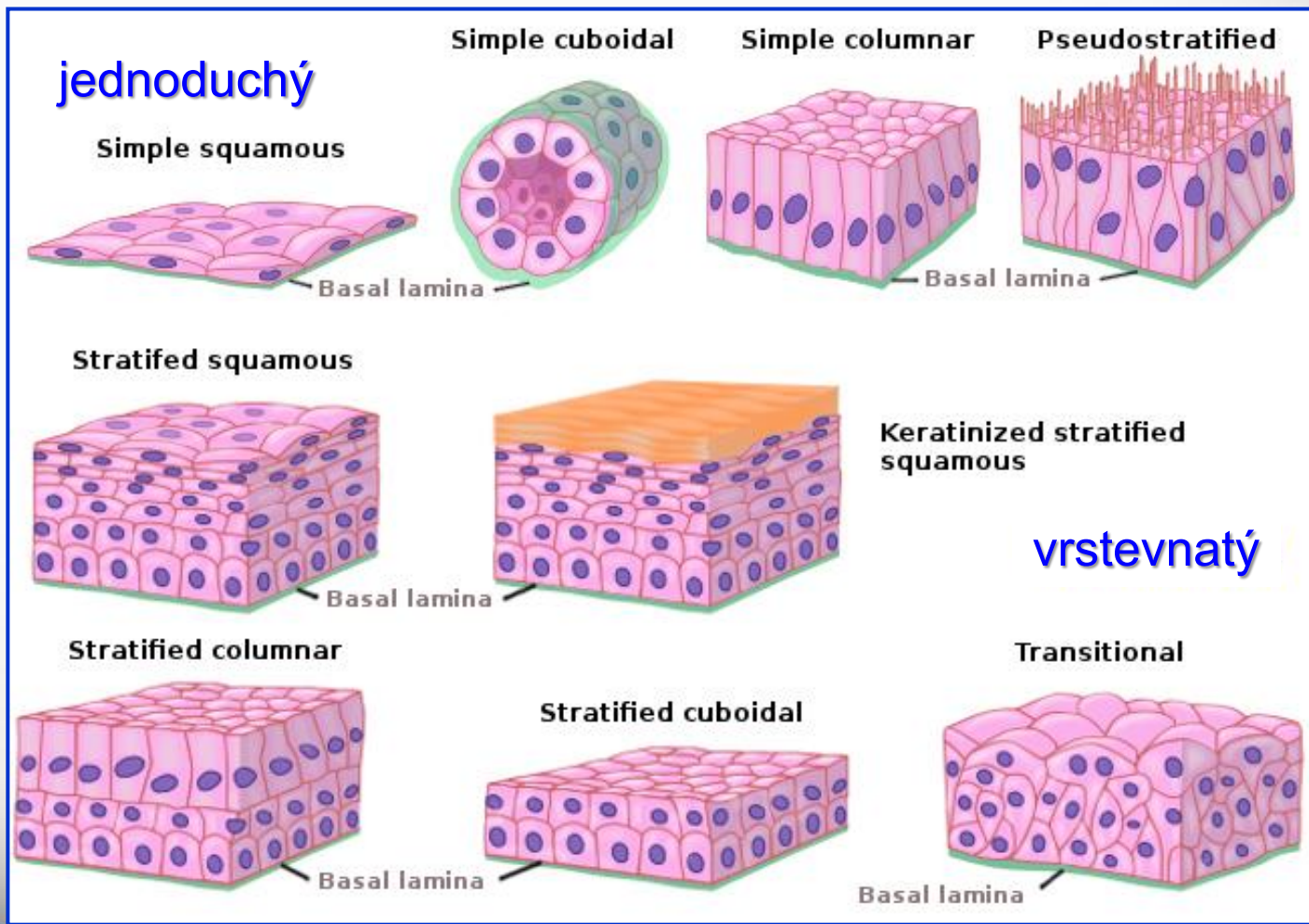


plicní epitel



rohovka (kuřecí embryo)

Různé způsoby uspořádání epitelu



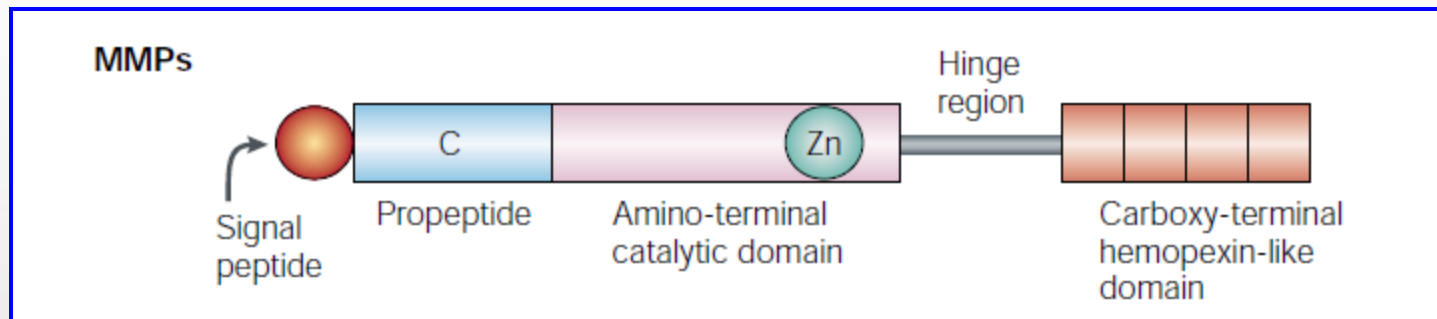
ECM u živočichů: Degradace ECM

Degradace ECM

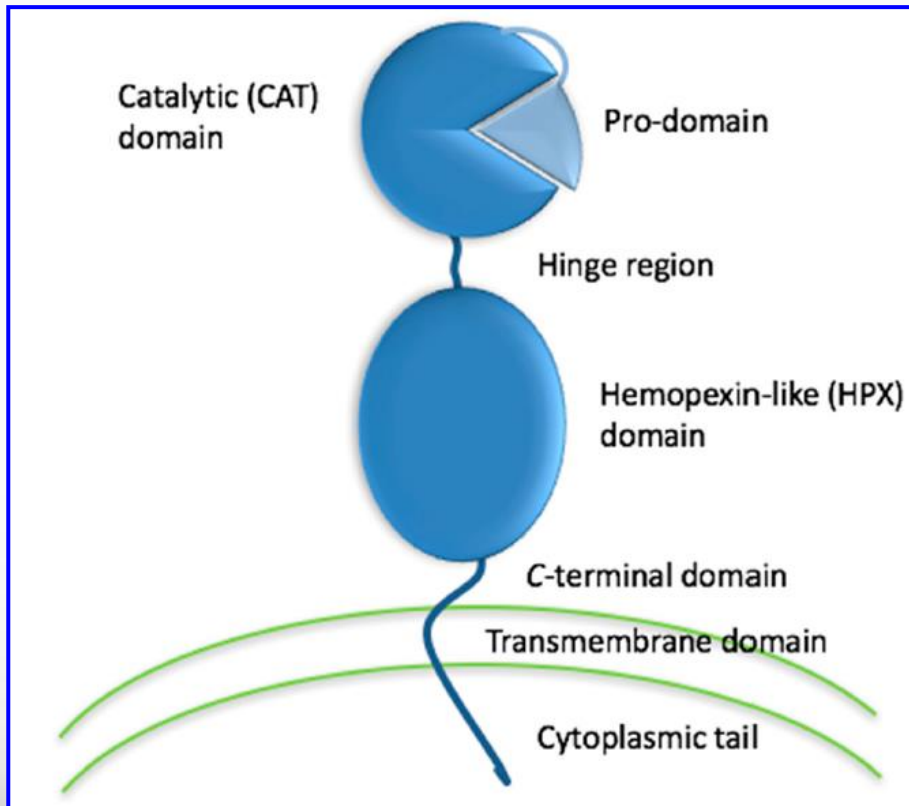
- řízená:
embryogeneze, hojení ran, uvolnění endometria při menstruaci, angiogeneze, zánět
- neřízená:
metastazování
degenerativní poruchy (emfyzém, artritida)
- **matrix metaloproteinázy (MMPs)**

MMPs

- MMPs (23): 14-17 transmembránové, ostatní: sekrece
- vazba pro-MMP na povrchové receptory
- pro-MMP: **autoinhibiční propetid** (za signální sekvencí)
→ proteolýza → aktivace → MMP



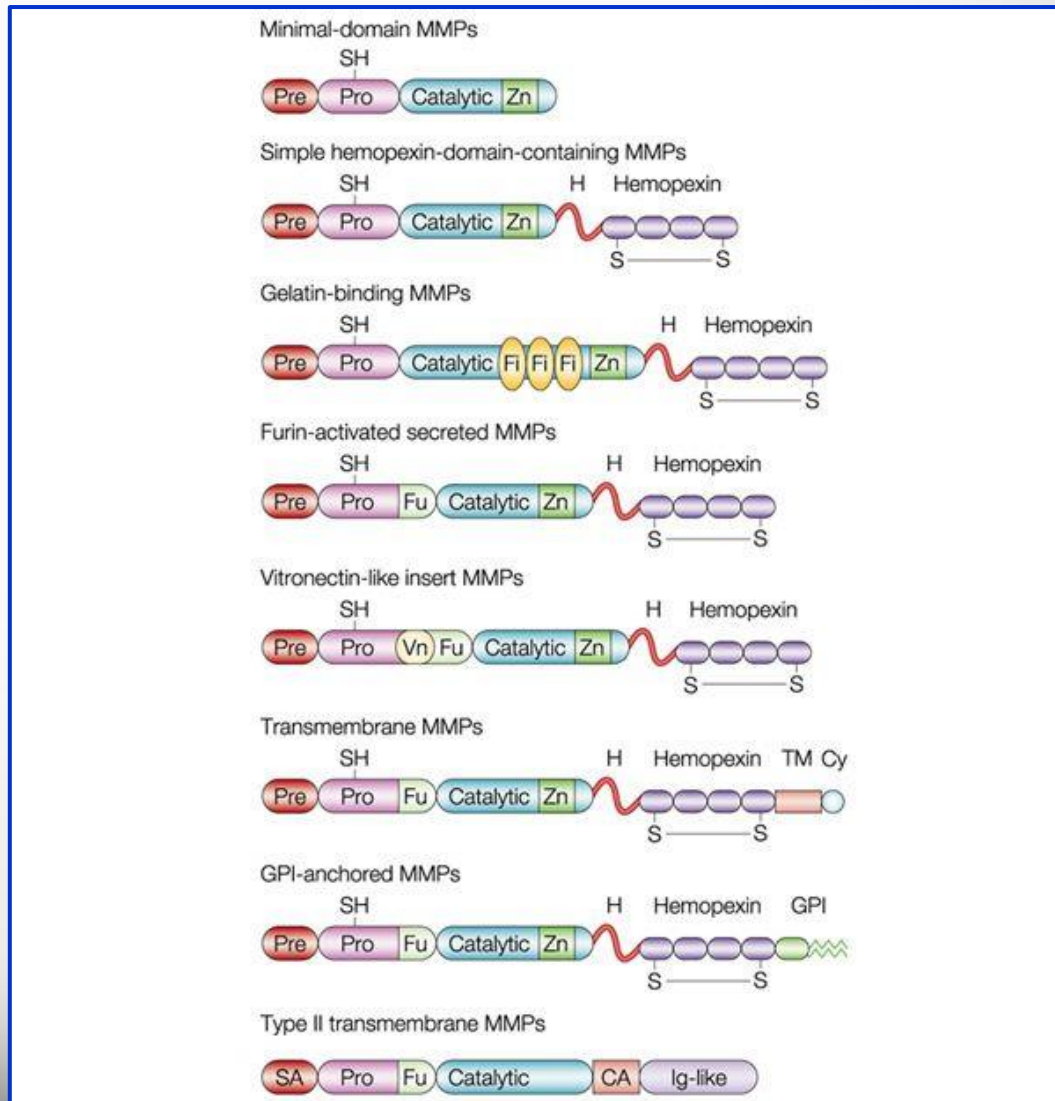
Obecná struktura MMPs



MT1-MMP (membránový typ)

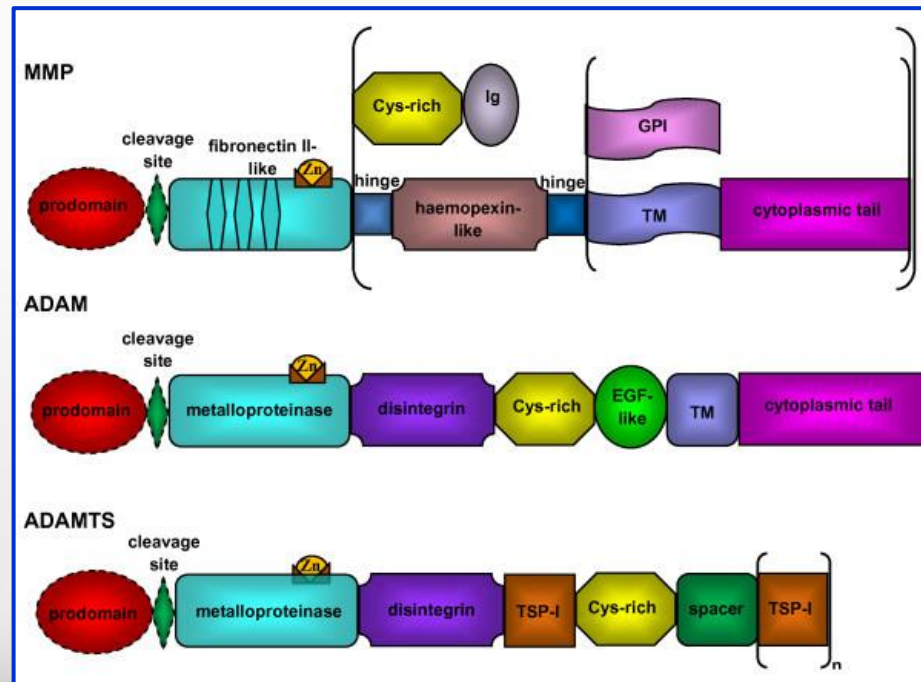
- **propeptid**: inaktivuje MMP (zymogen), pro aktivaci musí být odštěpen (ec)
- **katalytická doména**: váže Zn^{2+} iont
- **hinge oblast**: spojuje katalytickou a C-koncovou doménu
- **C-koncová (HPX) doména**: protein-proteinové interakce

Struktura některých MMPs



Extracelulární proteinázy

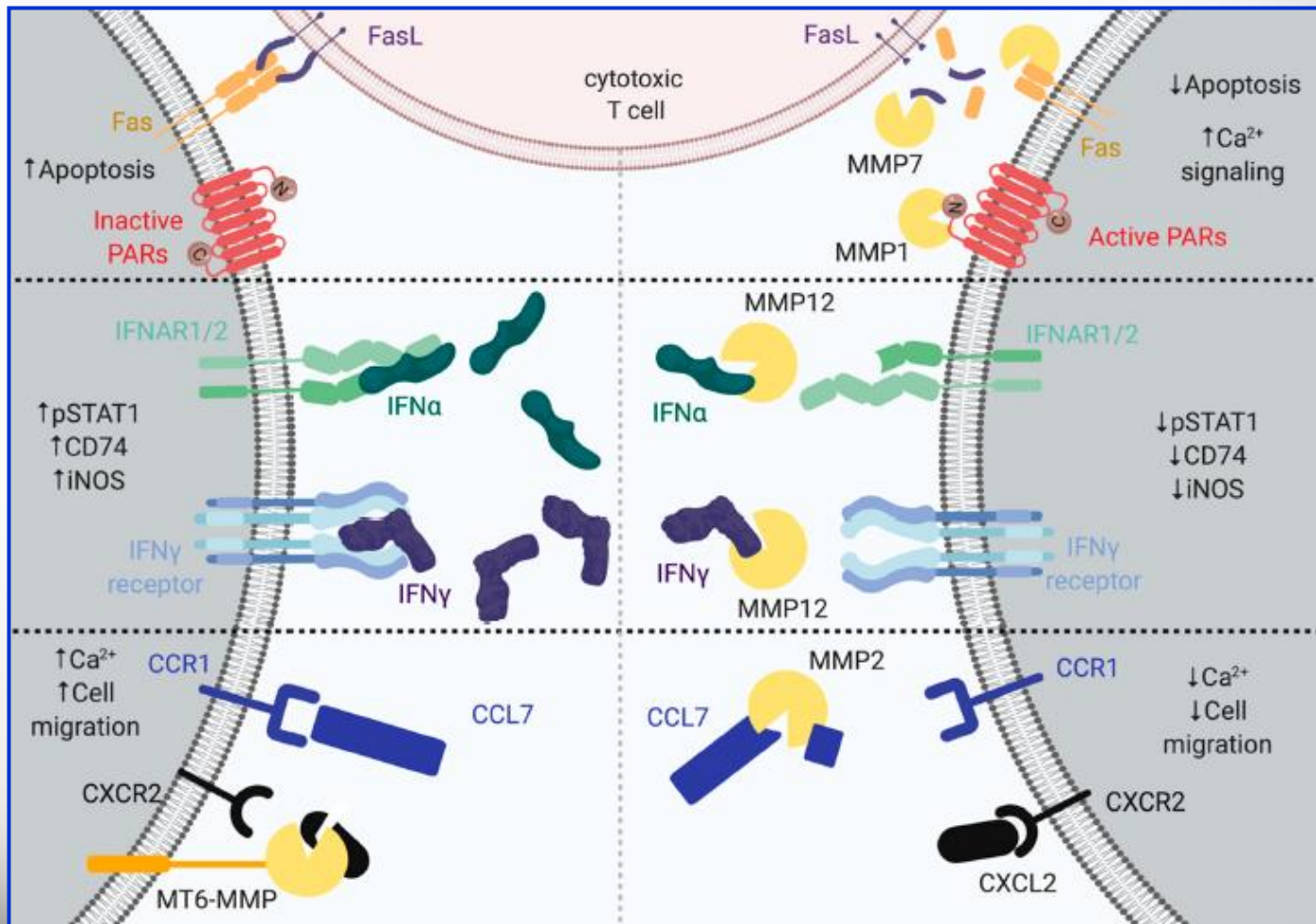
- MMPs (23)
- ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) (13)
- ADAMTS (A Disintegrin-like And Metalloproteinase Domain with Thrombospondine Type 1 Repeat) (29)



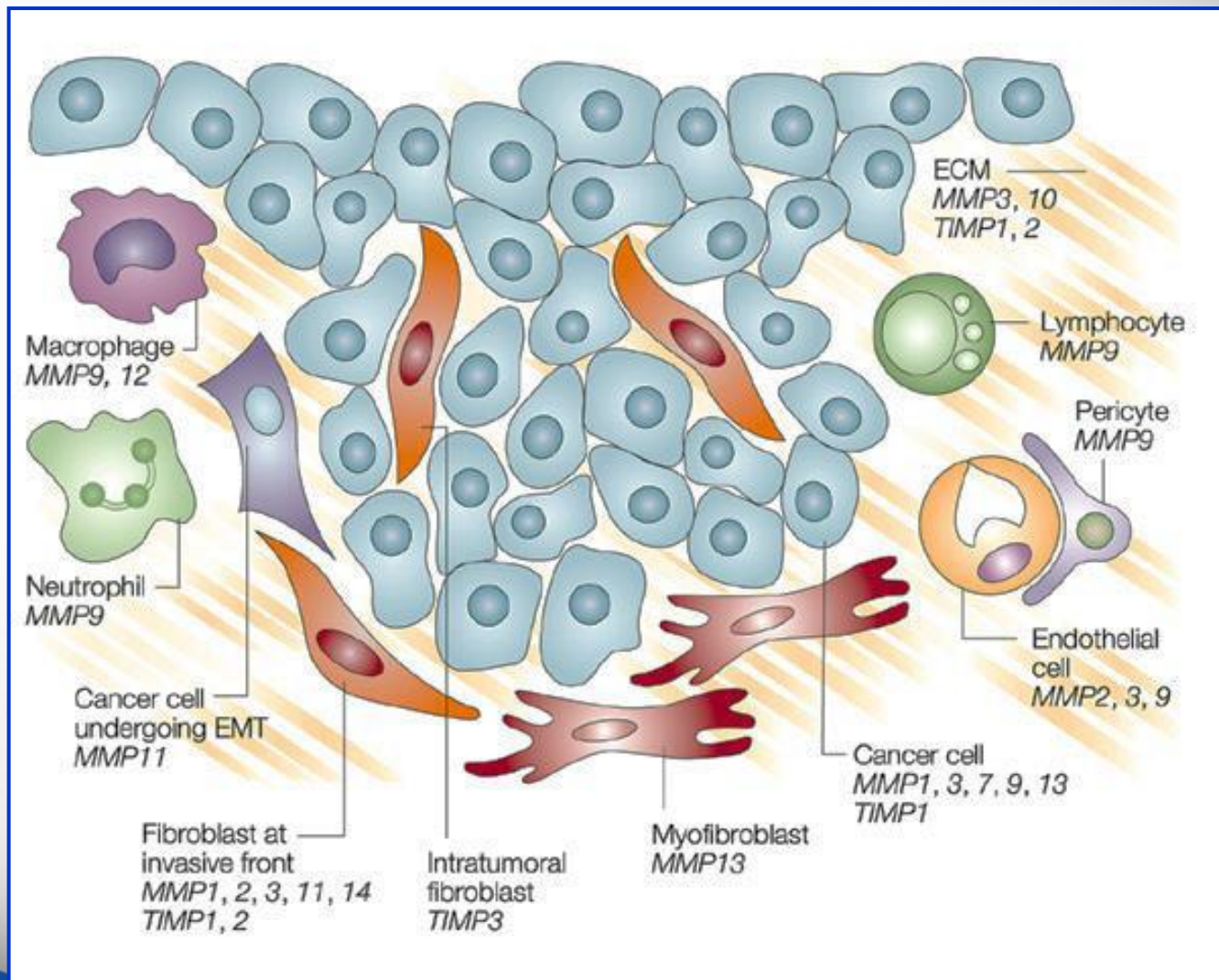
Úloha MMPs (ec proteináz)

- degradace struktur ECM
- degradace biomolekul (receptory, ligandy, cytokiny, chemokiny) → signalizace → buněčná proliferace, migrace, diferenciace, angiogeneze, apoptóza, obrana hostitele, ...

Úloha některých MMPs v signalizaci

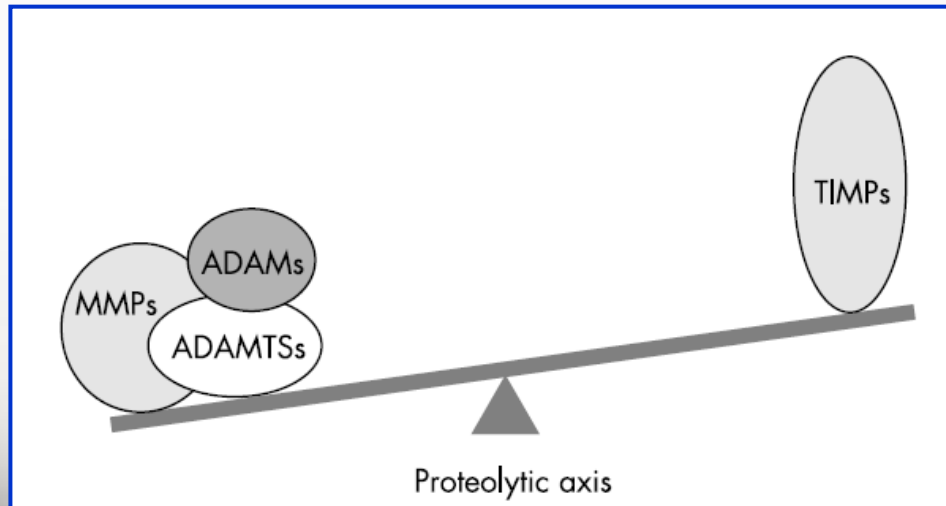


Úloha (a exprese) MMPs v karcinogenezi

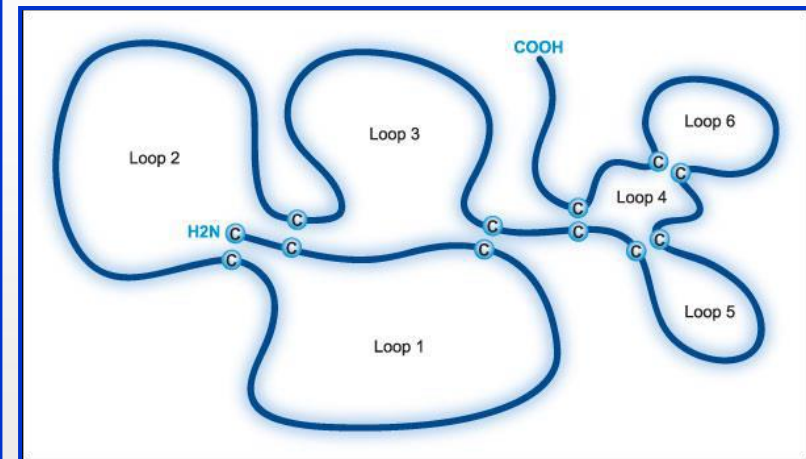


TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases)

- 4 různé TIMP 1-4
- inaktivují (regulují) všechny MMPs, ADAMs a ADAMTs
- **struktura molekuly:** 184-194 AA, 21-22 kDa;
12 Cys → disulfidické můstky → 6 smyček

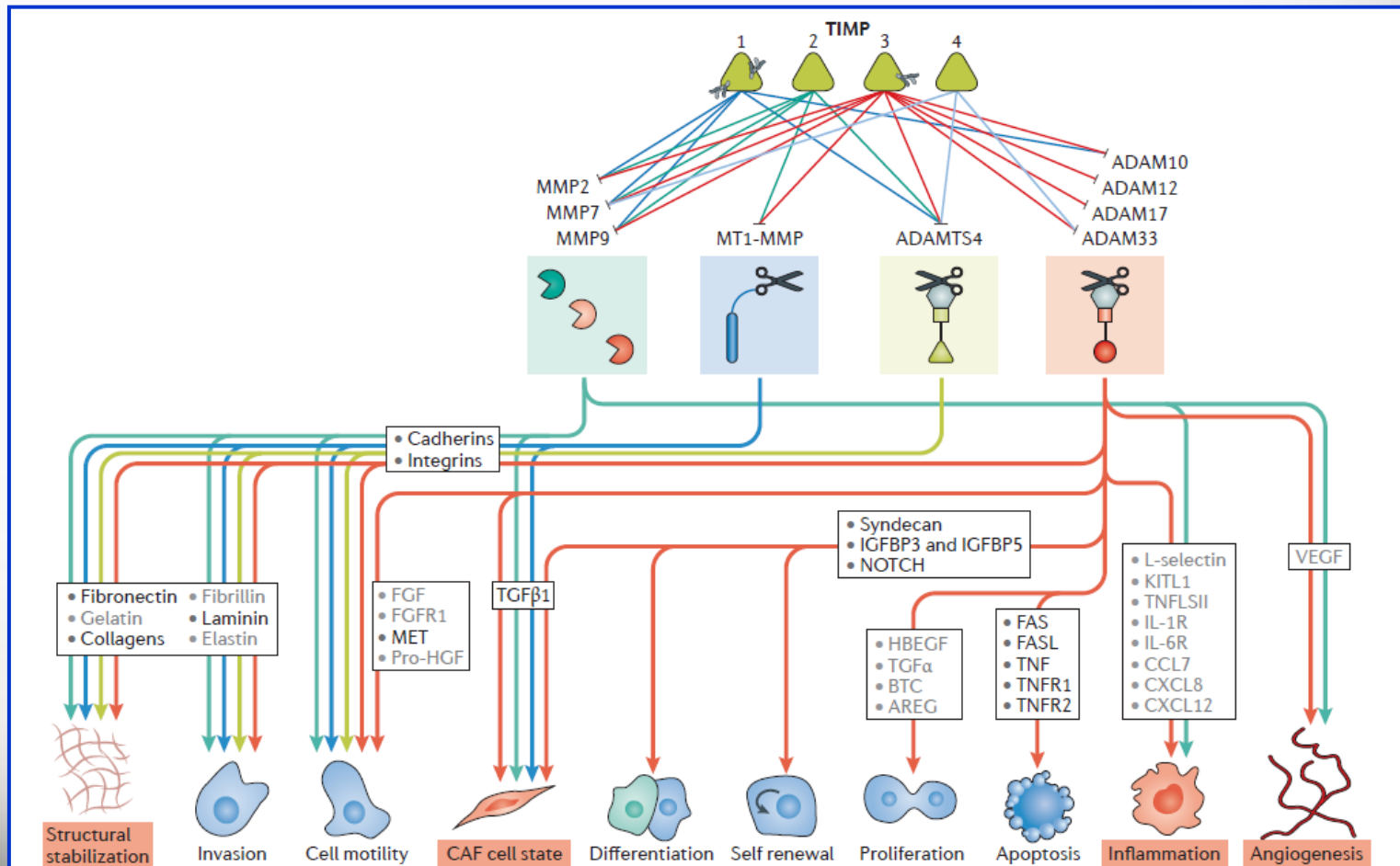


Mohammed FF et al, *Ann Rheum Dis* 62 (Suppl II): ii43-47, 2003



Cao J a Zucker S, www.abcam.com

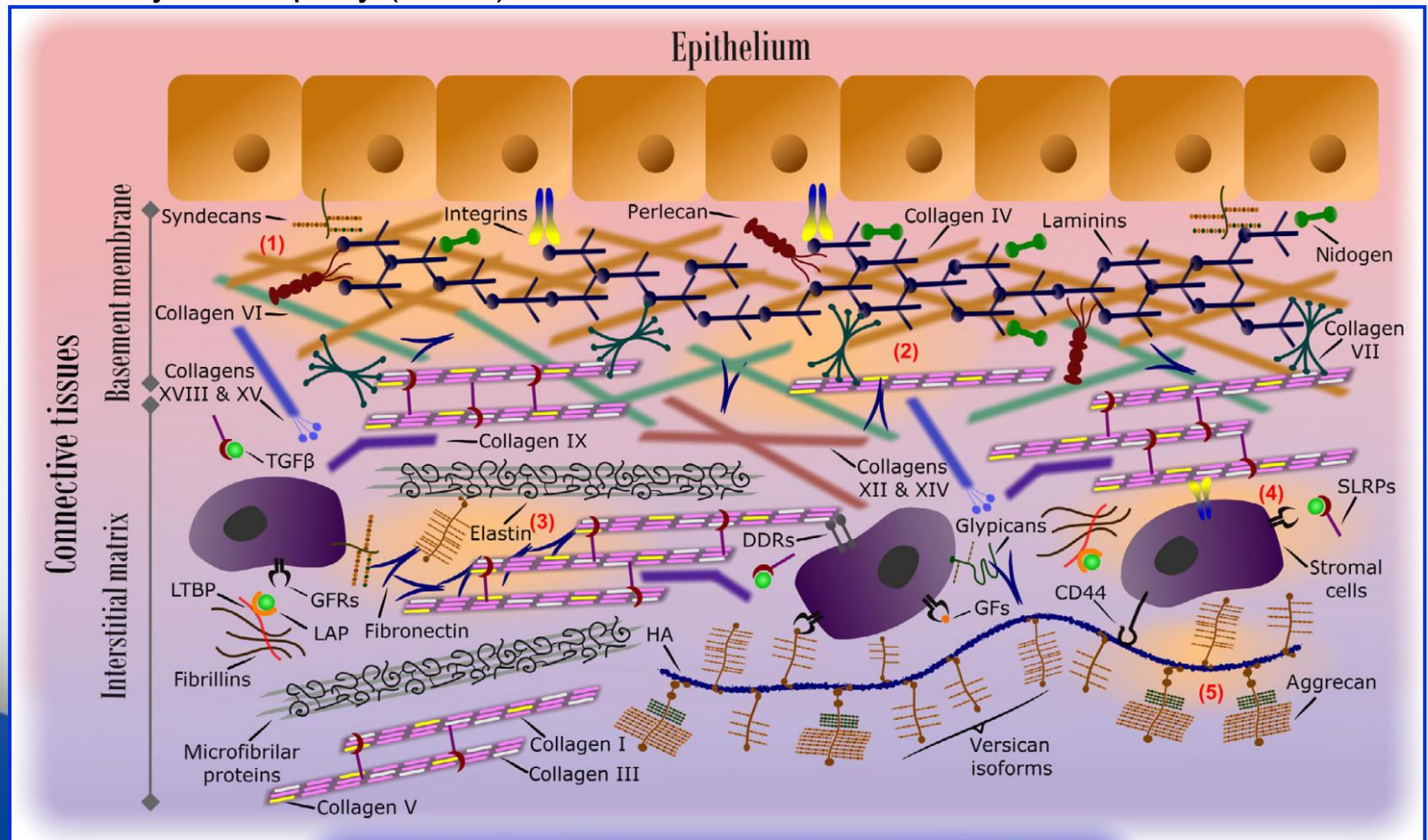
TIMPs jsou součástí (vrcholem) složité biologické sítě



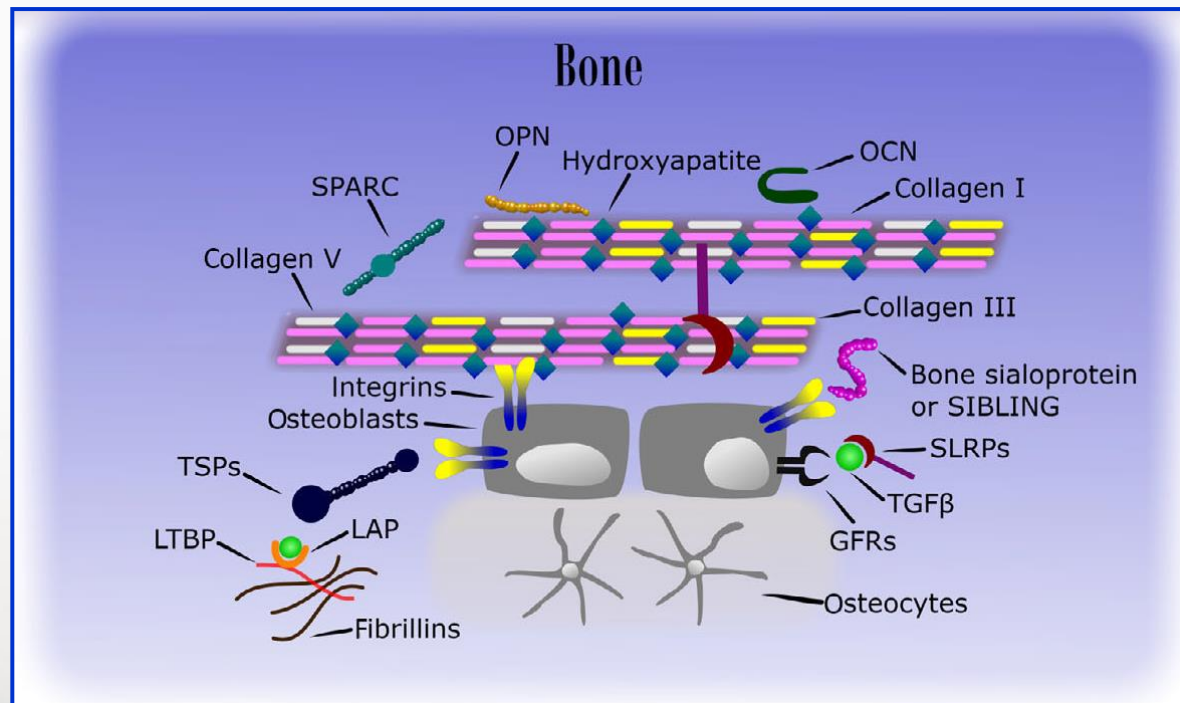
Příklady ECM

- savčí ECM tvořena asi 300 proteiny (včetně kolagenů, proteoglykanů a glykoproteinů) někdy označovanými jako **matrisom**
- 2 hlavní typy ECM:
 - intersticiální pojivová tkáňová matrix
 - bazální membrána

Epitel: (1) Bazální membrána je unikátní pericelulární matrix, kterou tvoří především lamininy a kolagen IV, které propojují perlecan a nidogeny; epiteliální buňky jsou spojeny s BM pomocí desmosomů a integrinů. (2) S dalšími vrstvami ECM BM interaguje prostřednictvím kolagenů VI a VII, které interagují s kolagenem I a IV, perlecanem a lamininy. (3) Hlavní součástí intersticiální matrix jsou kolageny I, III a V, dále elastin, proteoglykany a HA. (4) Se složkami ECM interagují buněčné receptory (integriny, DDRs, glypikany) a růstové faktory (TGF β). (5) K pevnosti ECM přispívají agregáty HA a hyalektanů. Interagují s některými buněčnými receptory (CD44).



ECM kostí: obsahuje fibrily kolagenu I, které slouží jako nukleační centra pro hydroxyapatity; **mineralizaci** kostí zajišťuje několik složek ECM, například SIBLING, OCN, OPN (*osteopontin*) a SLRPs (*small leucine-rich proteoglycans*)



ECM chrupavky: (1) chondrocyty jsou obklopeny pericelulární matrix s kolagenem IV a perlecanem; (2) okolní matrix je tvořena kolagenem II, IX, SLRPs; (3) mezi fibrilami kolagenu II jsou zachyceny velké agregáty HA a aggrecanu

