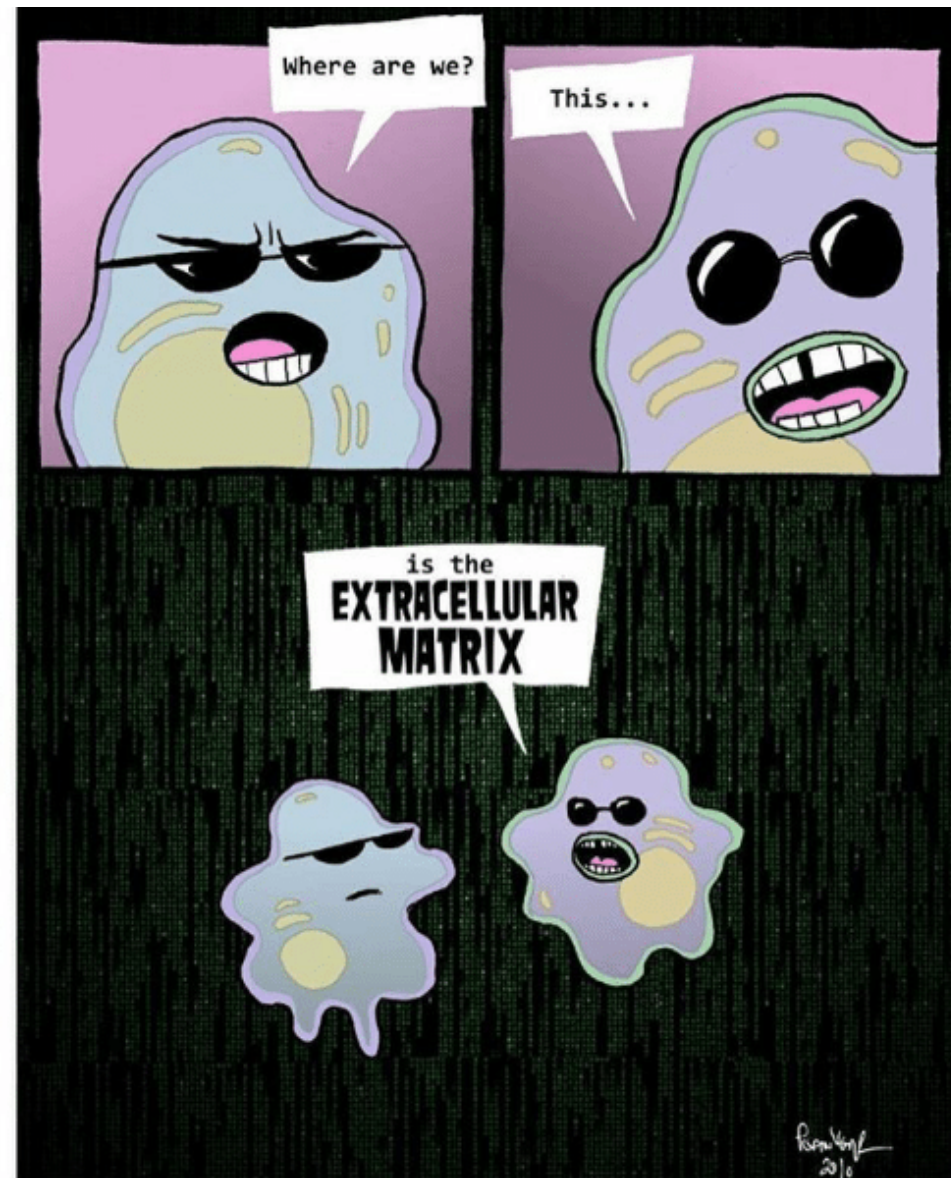


# Úloha extracelulární matrix ve vývoji

Tomáš Bárta  
tbarta@med.muni.cz



## Obsah přednášky

- Úvod
- Funkce ECM
- Role ve vývoji
- Složení, Komponenty
- Remodelace
- Receptory
- Anoikis

## Úvod - Extracelulární matrix (ECM)



- Co drží buňky dohromady, aby vytvořily tkáň?
- Jak spolu buňky a tkáně interagují, koordinují se, aby vytvořily celého jedince?

?

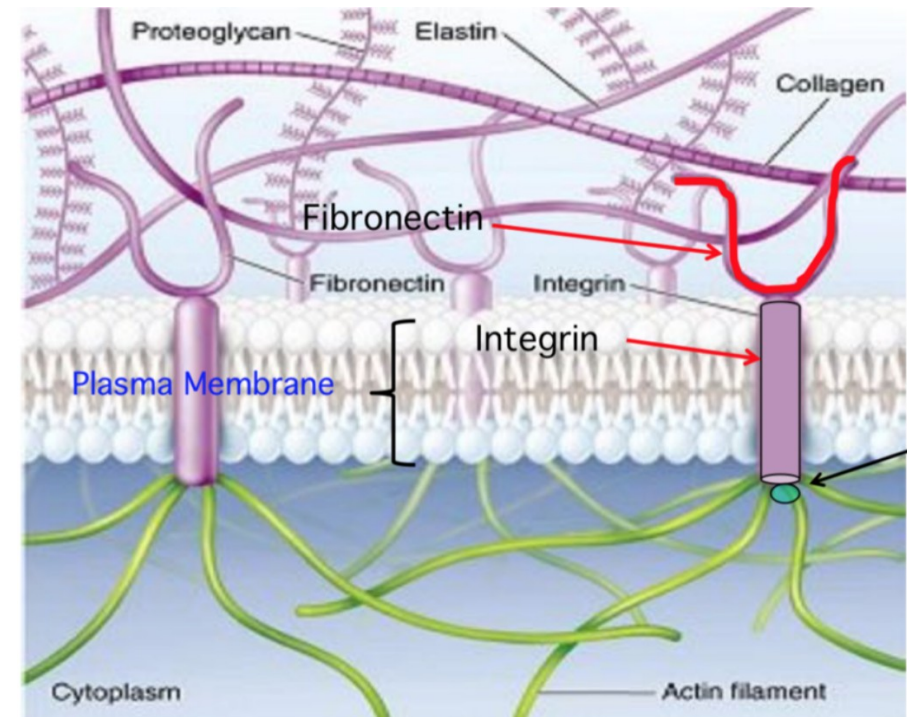
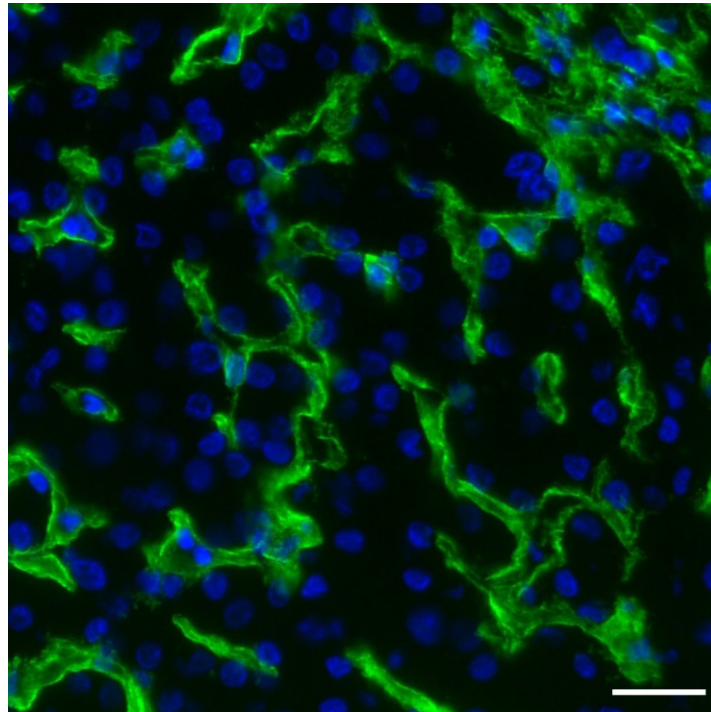
ECM – ExtraCelulární Matrix

## Co je extracelulární matrix (ECM)?

- Je to trojrozměrná nerozpustná síť extracelulárních makromolekul, jako je kolagen, enzymy a glykoproteiny atp., které poskytují strukturální a biochemickou podporu okolním buňkám.
- Zprostředkovává buněčnou adhezi, komunikaci mezi buňkami a diferenciaci.
- Podává instrukce buňkám „kdy růst, kdy se dělit, kdy produkovat různé molekuly, kdy zemřít“.
- Skládá se asi z 300 proteinů, převážně: kolagen, proteoglykany, elastin, glykoproteiny (fibronectin and laminin). Každá složka má určité fyzikální a biochemické vlastnosti.

## Úvod - Extracelulární matrix (ECM)

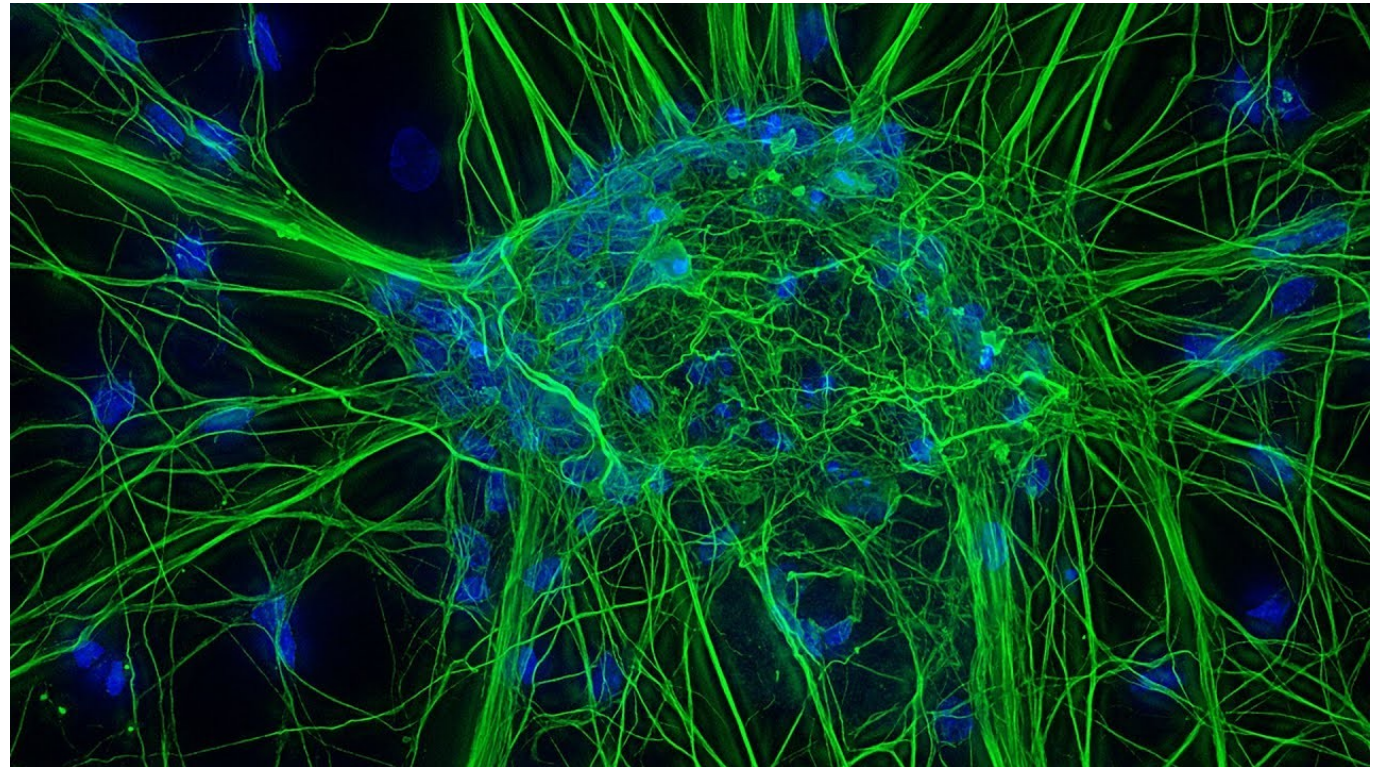
- Určitá analogie mezi cytoskeletem a ECM
- Podobně jako cytoskelet určuje vnitřní strukturu buňky, podílí se na pohybu, transportu atp., tak podobnou funkci má ECM ale vně buňky a na úrovni tkání a orgánů.
- ECM je složena z mnoha typů makromolekul, vláken, proteinů, glykoproteinů, nejvíce ale Kolagen (cca 30% všech proteinů).



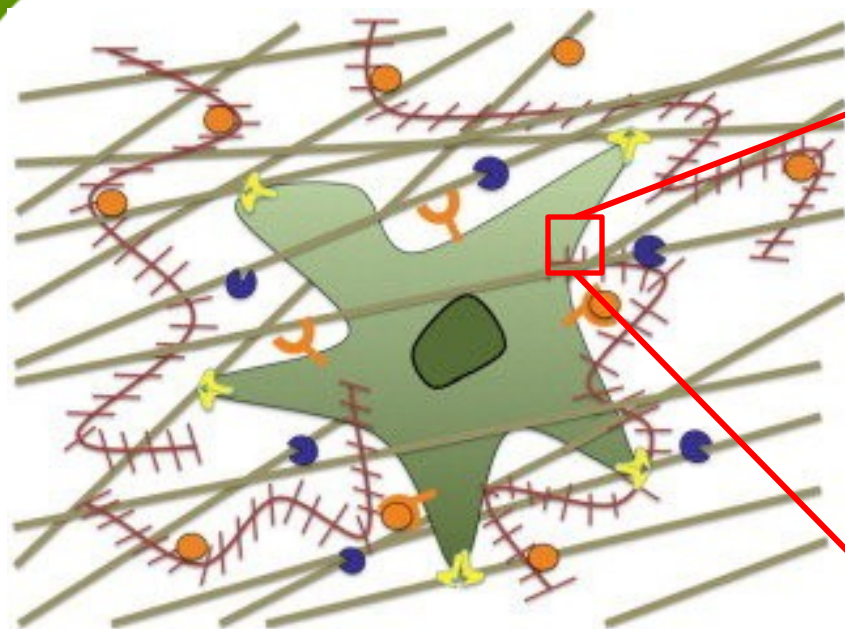


## Úvod - Extracelulární matrix (ECM)

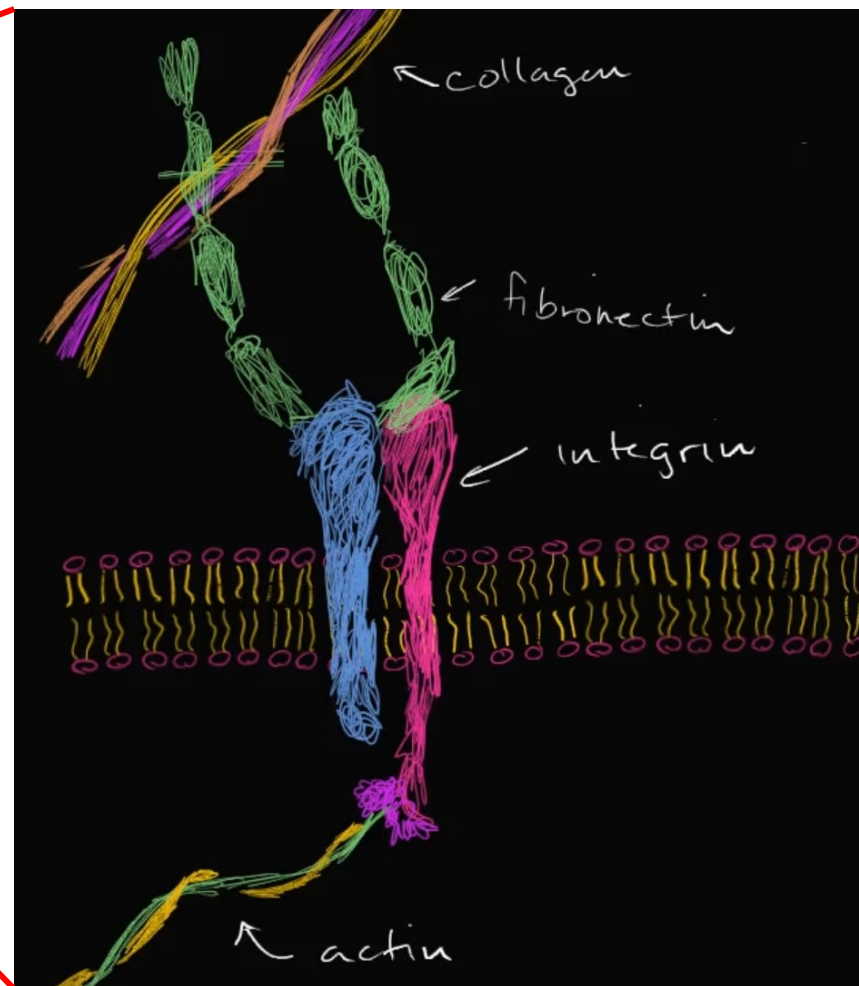
- Všechny komponenty ECM napomáhají přichycovat buňky a strukturovat buňky do tkání.
- Ale také dávají buňkám signál, kdy růst, kdy se dělit, kdy produkovat určité molekuly a dokonce i kdy umřít.



# Extracelulární matrix (ECM)

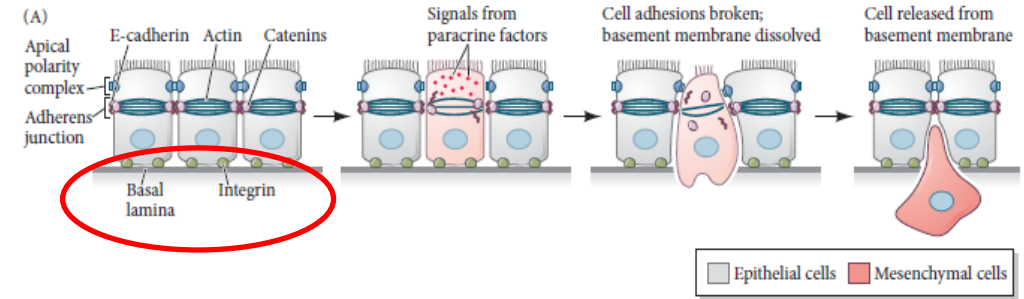
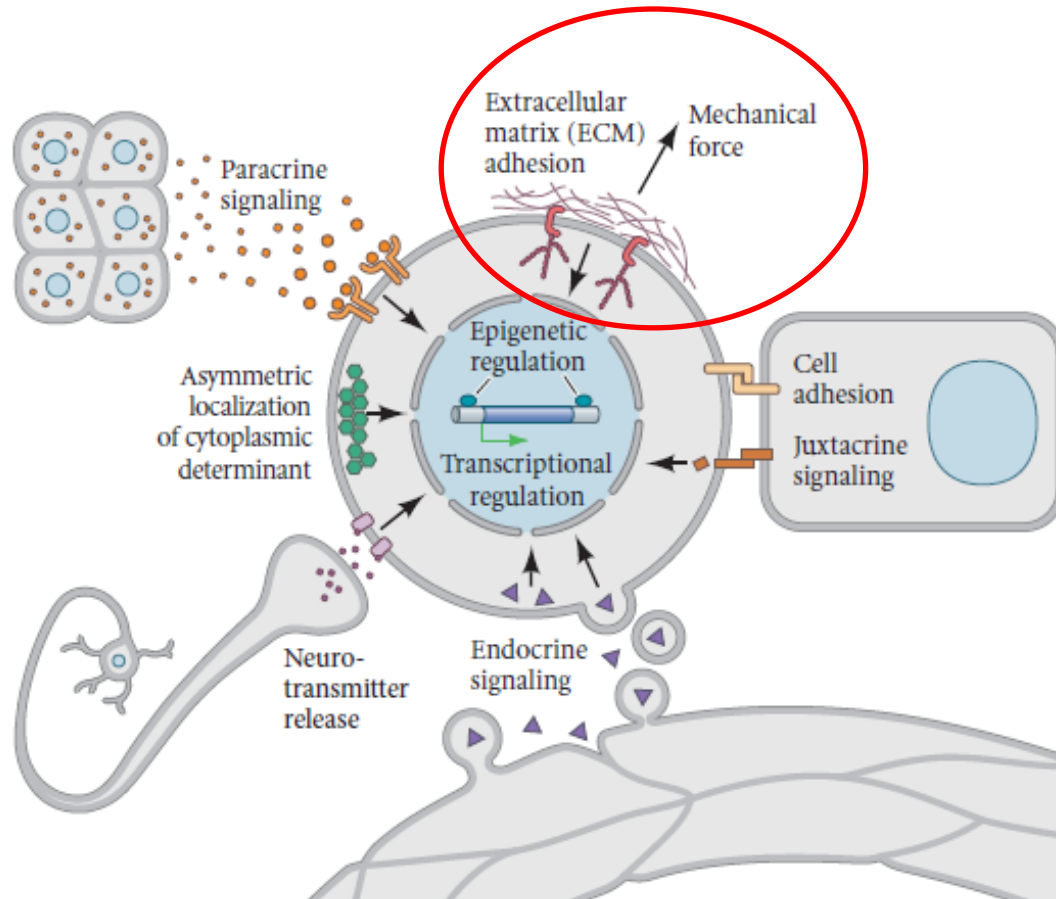


- Glykoproteiny
- Proteoglykany
- Vláknité proteiny
- Polysacharidy
- 
- 
- 
- 
- Nejvíce zastoupen je Kolagen (~30% všech proteinů u savců)



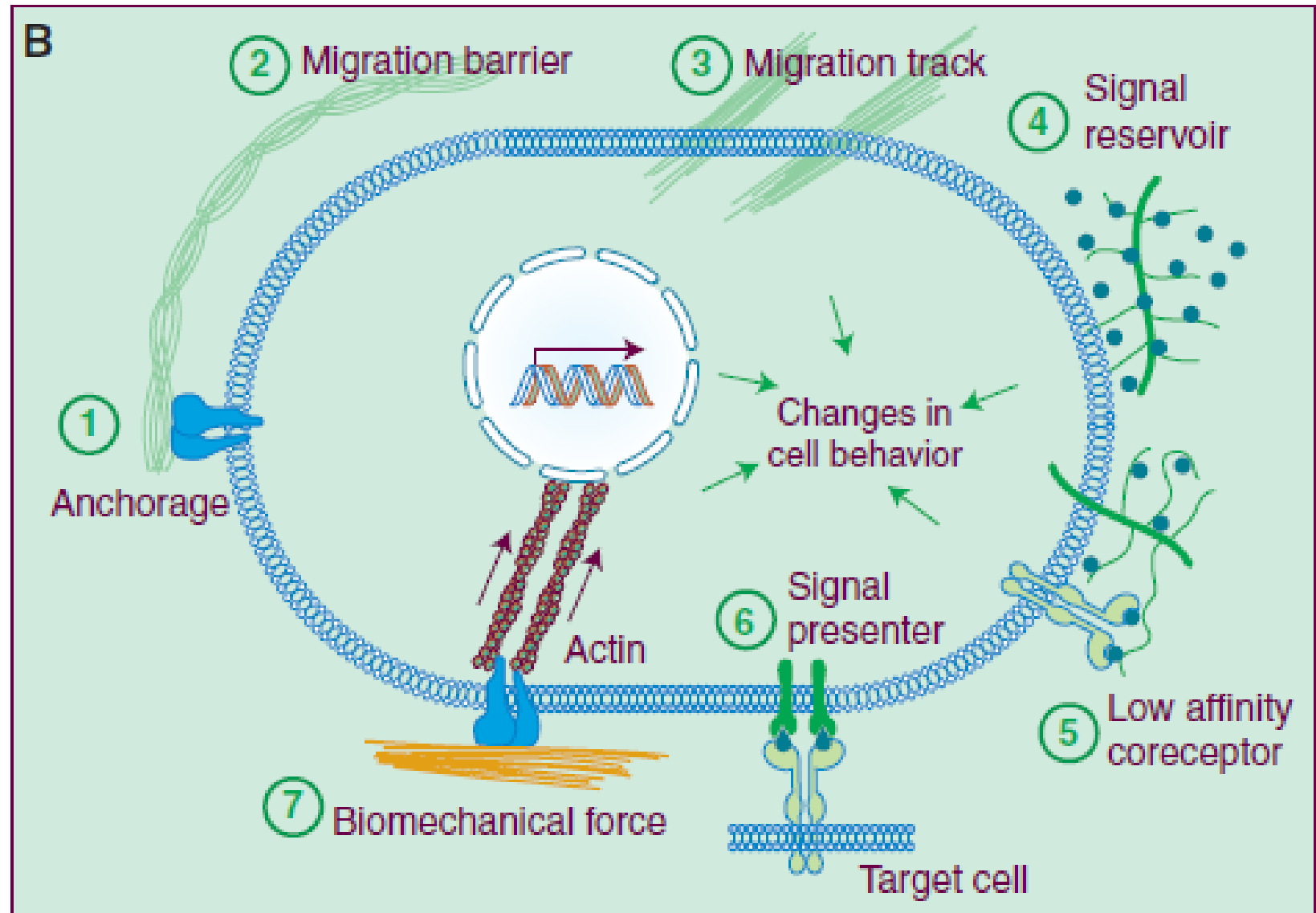
Integriny „propojují“ cytoskelet s ECM

# Návaznost na předchozí přednášku – co už víte





# Co je extracelulární matrix (ECM) - Funkce



# Co je extracelulární matrix (ECM) - Funkce



**Functions as adhesive substrate**

- tracks to direct migratory cells
- concentration gradients for haptotactic migration

**Provides structure**

- defines tissue boundaries
- provides integrity and elasticity to developing organs
- degraded by invasive cells during development and disease

**Presents growth factors to their receptors**

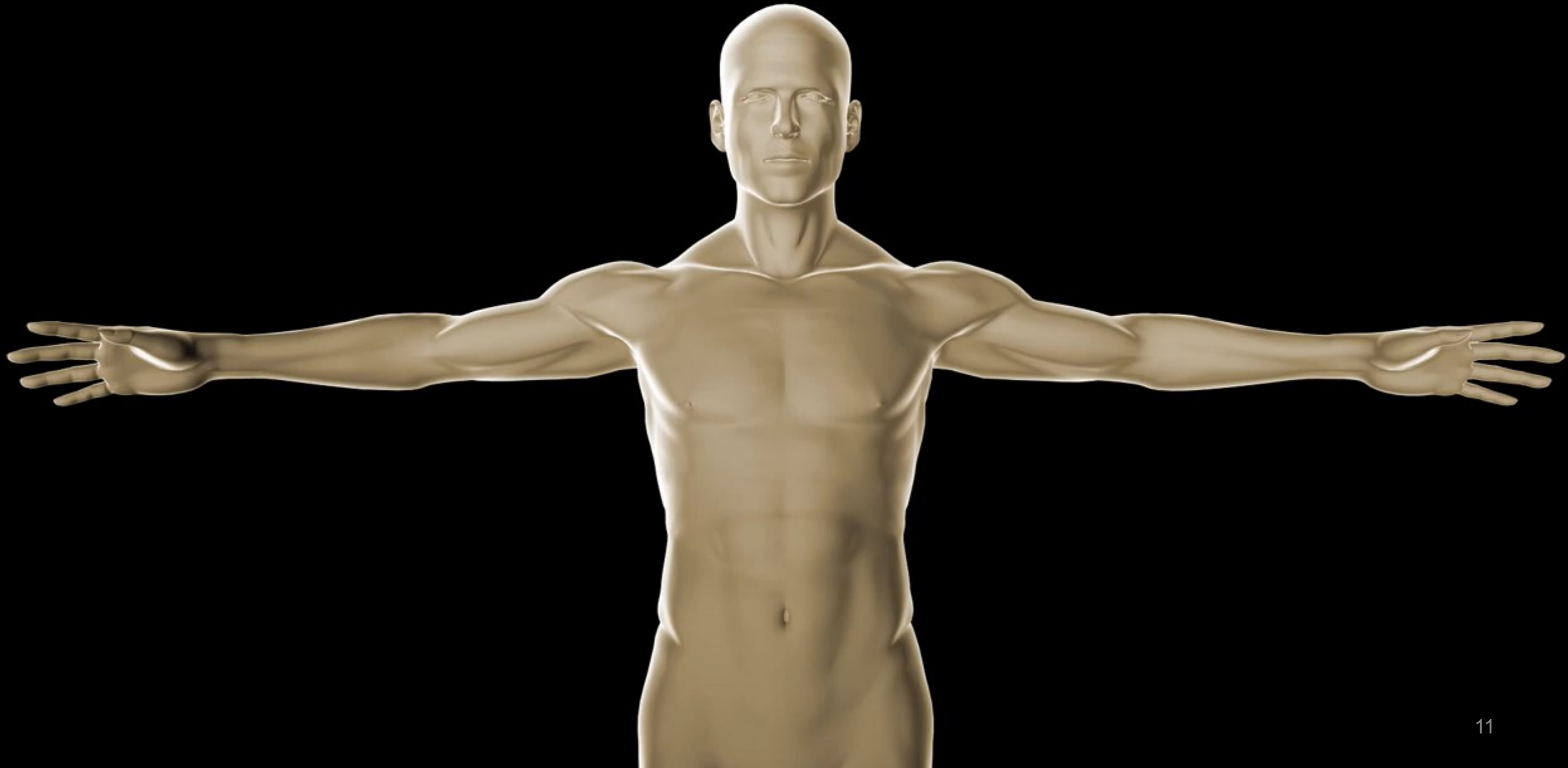
- controls spatial distribution of ECM-bound surface molecules
- facilitates crosstalk between growth factor receptors and ECM receptors

**Sequesters and stores growth factors**

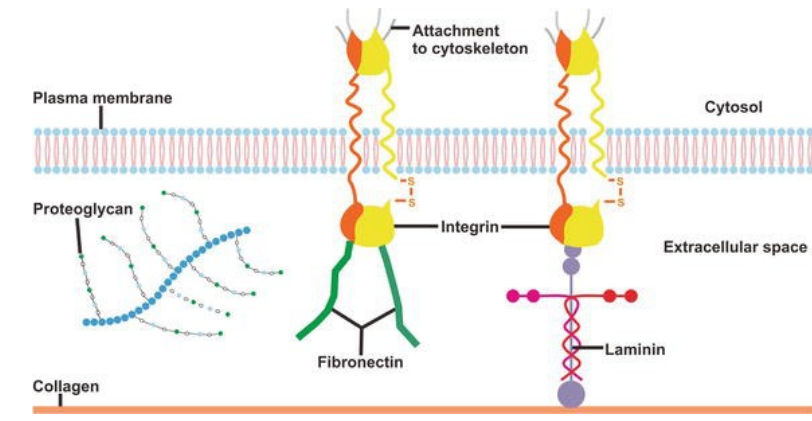
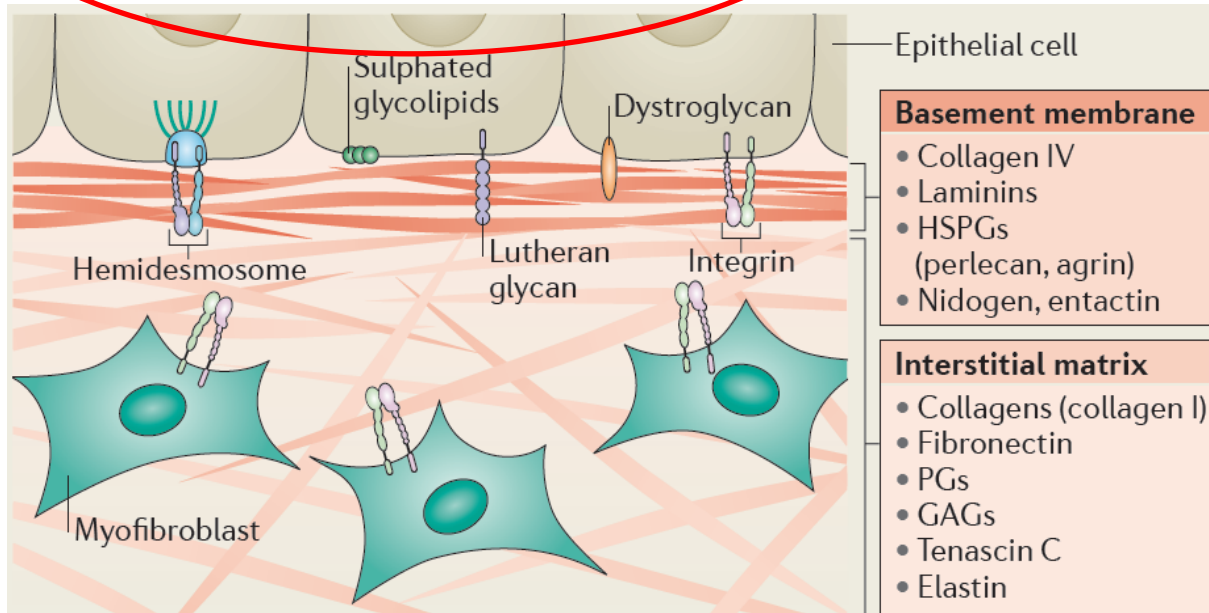
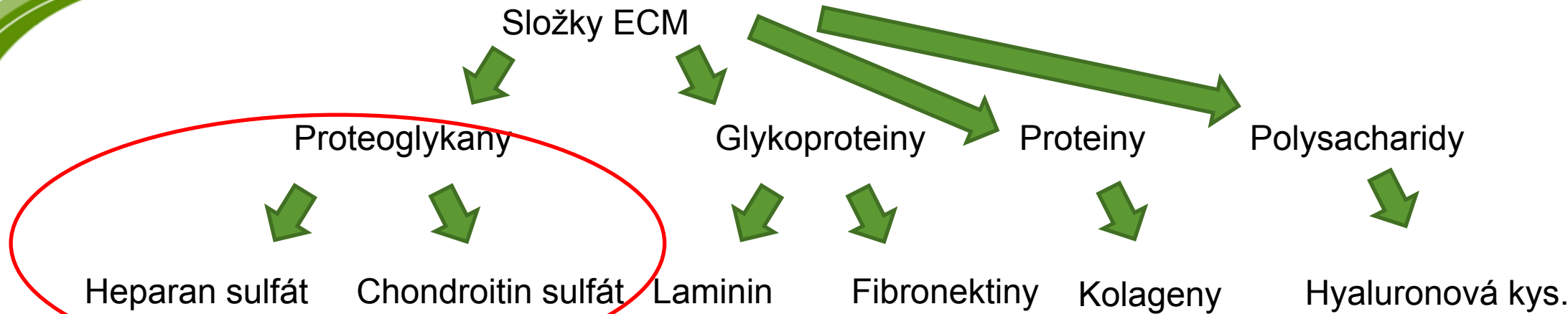
- allows for spatio-temporal regulation of factor release
- organizes morphogen gradients
- mediates release of factors in the presence of appropriate cell-mediated forces or proteolytic degradation

**Senses and transduces mechanical signals**

- defines mechanical properties permissive/instructive to cell differentiation
- activates intracellular signaling through interaction with cell-surface receptors
- engages cytoskeletal machinery and synergizes with growth factor signaling



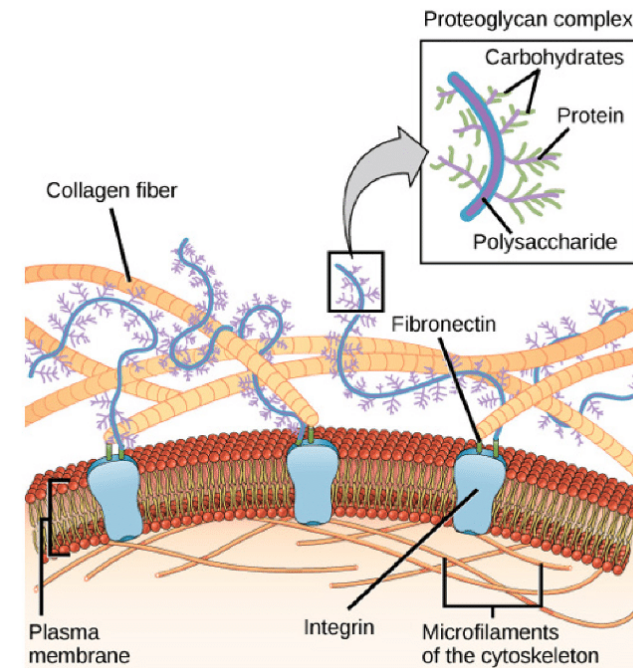
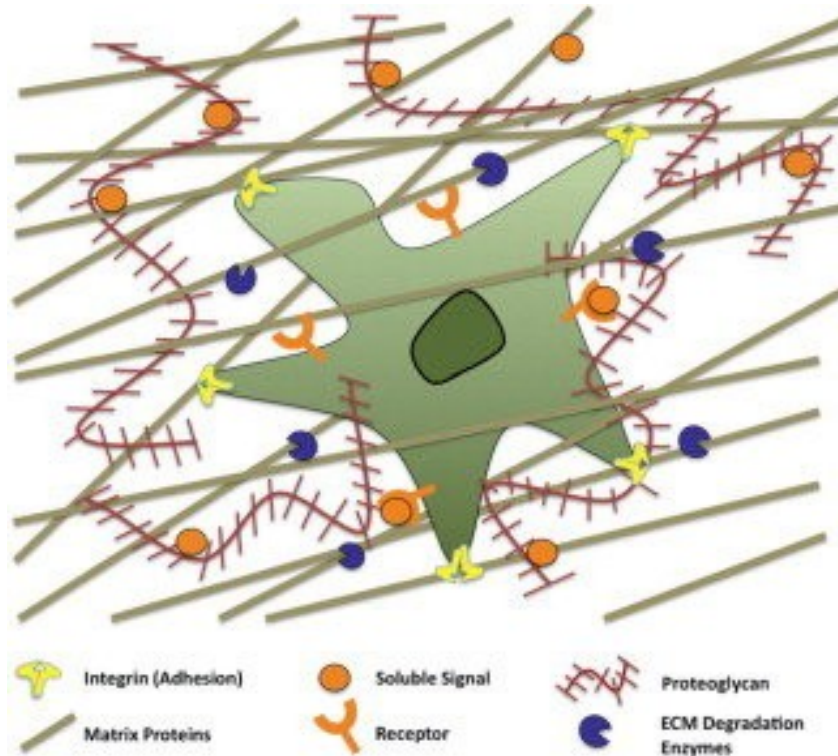
# Složky ECM – jak se v tom vyznat?





## Složky ECM - Proteoglykany

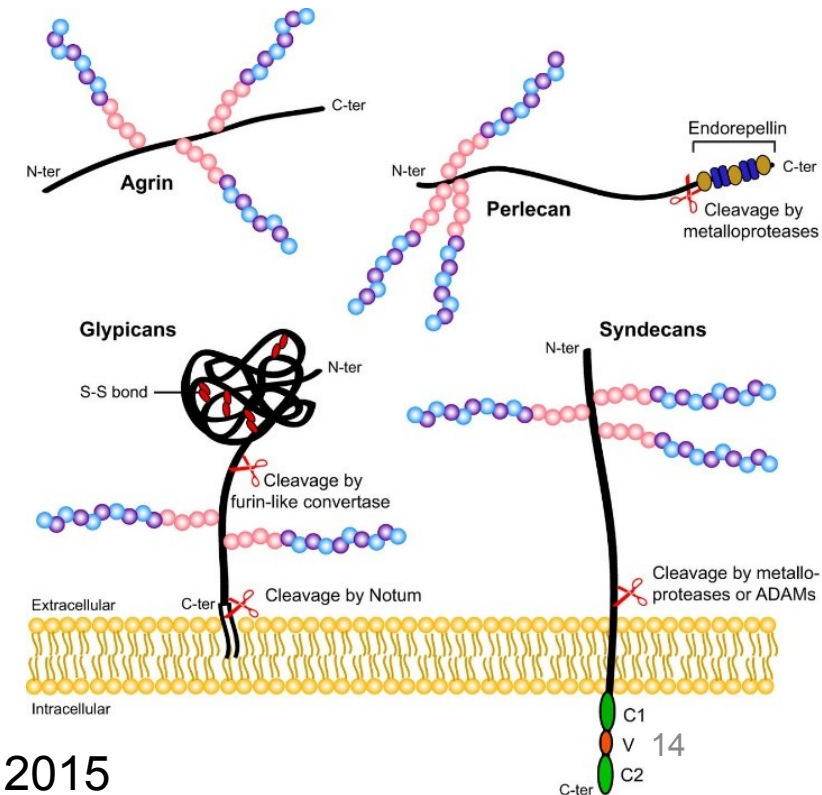
- Klíčová úloha při transportu parakrinních signálů.
- Velké molekuly, které se skládají z centrálního proteinu a kovalentně vázané polysacharidové řetězce.
- Příkladem mohou být: Heparan Sulfát, Chondroitin Sulfát.



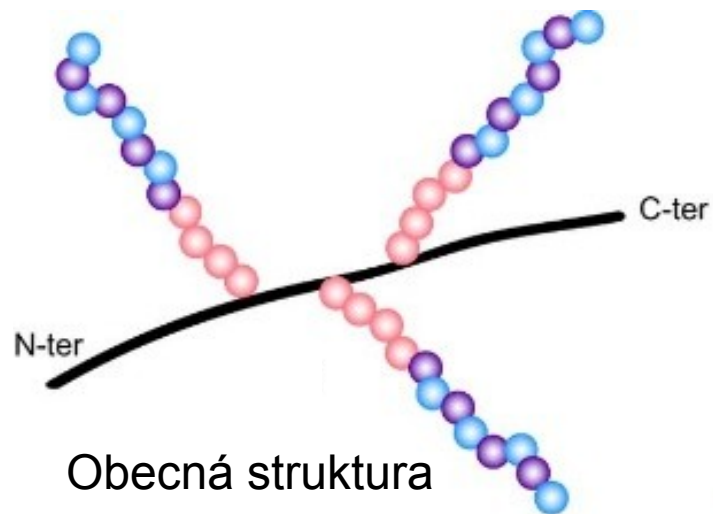
# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát (HS)

## Heparan sulfát (HS)

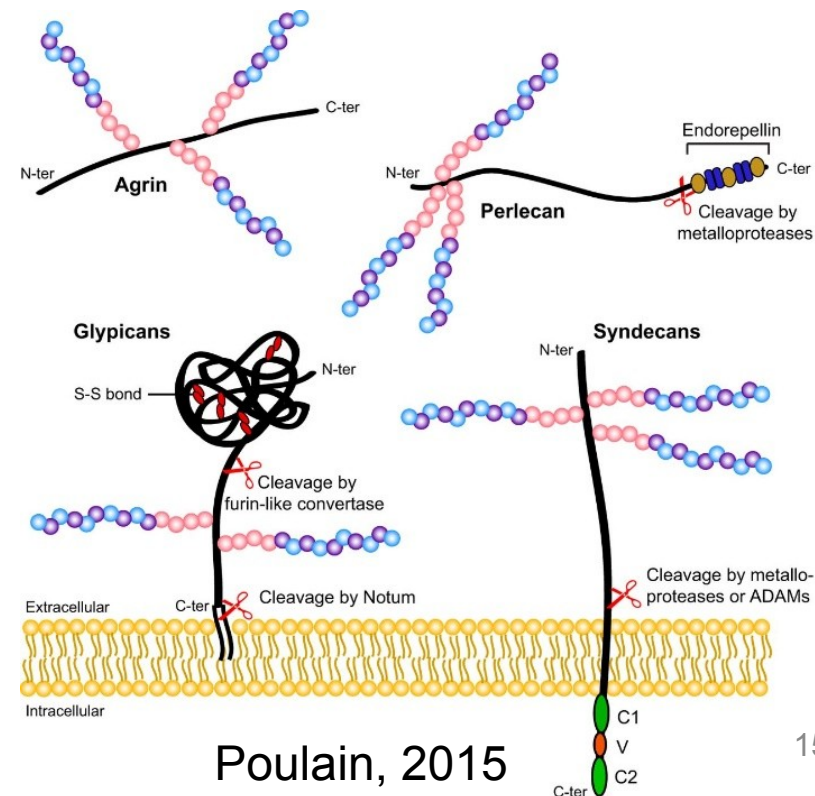
- ▶ Lineární polysacharid, který se vyskytuje ve formě proteoglykanu (protein s kovalentně navázanými řetězci HS) – téměř ve všech živočišných tkáních
  - ▶ Klíčová úloha při vazbě ligandů na receptory -> bez něj nemusí probíhat vazba!
  - ▶ Mutace, které blokují syntézu Heparan sulfátu způsobují různé defekty v migraci buněk, morfogenezi a diferenciaci.
  - ▶ Různé orgány a tkáně v průběhu vývoje produkují různé složení HS
- ⇒ HS se mění v průběhu vývoje => důležitý pro správný vývoj.
- Tyto poznatky vedly k „sugar code“ hypotéze – specifické HS modifikace řídí jednotlivé události v průběhu vývoje prostřednictvím interakcí se signálními drahami.
  - mnoho orgánů, včetně hematopoetické, skeletální systémy a játra, plíce a ledviny, se netvoří správně, pokud chybí HS.



# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát



- Proteiny mají různý počet míst pro vazbu sacharidu
- Některé ještě navíc mohou obsahovat chondroitin sulfát
- HS je syntetizován v Golgi aparátu

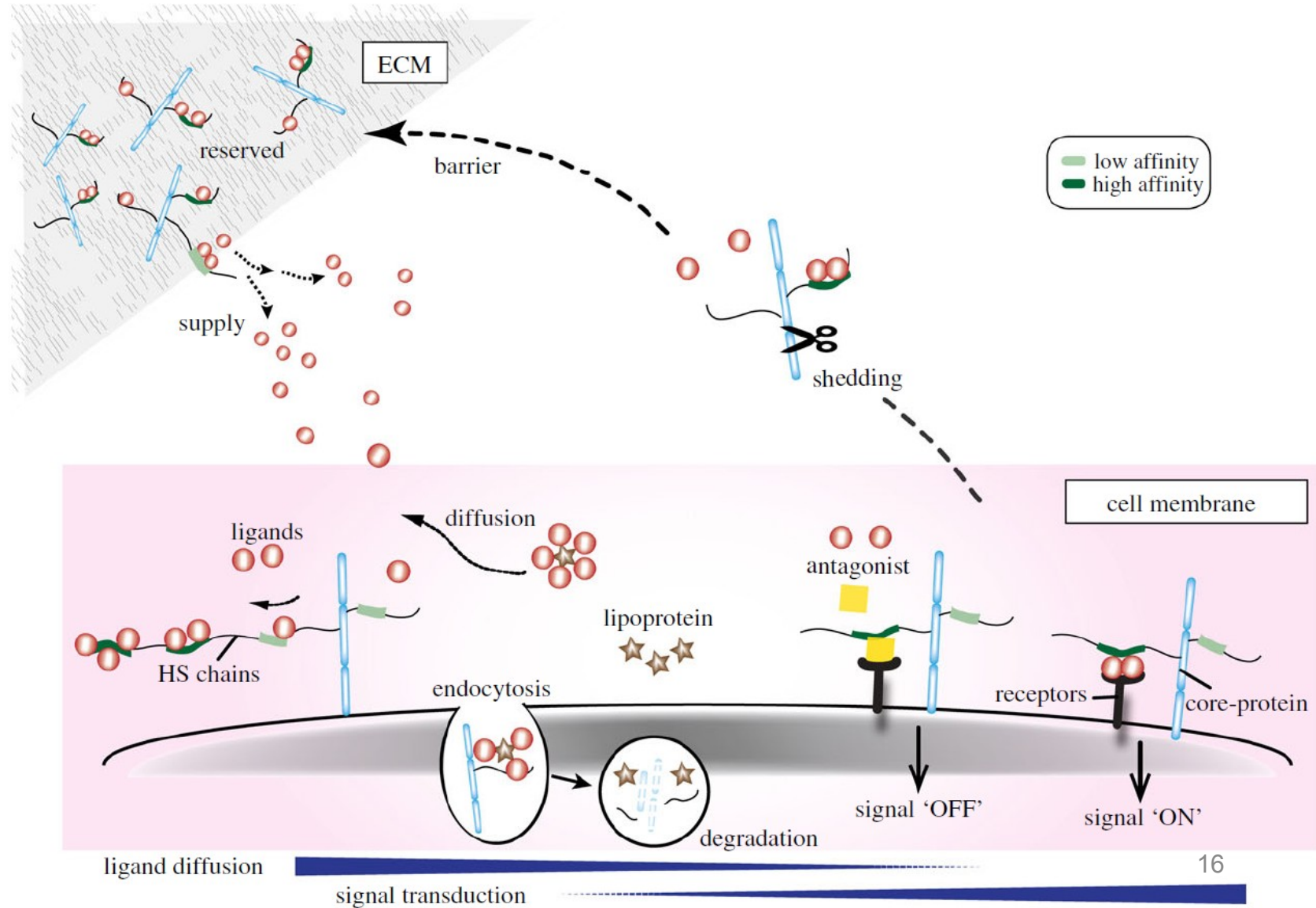


Poulain, 2015



# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát - funkce

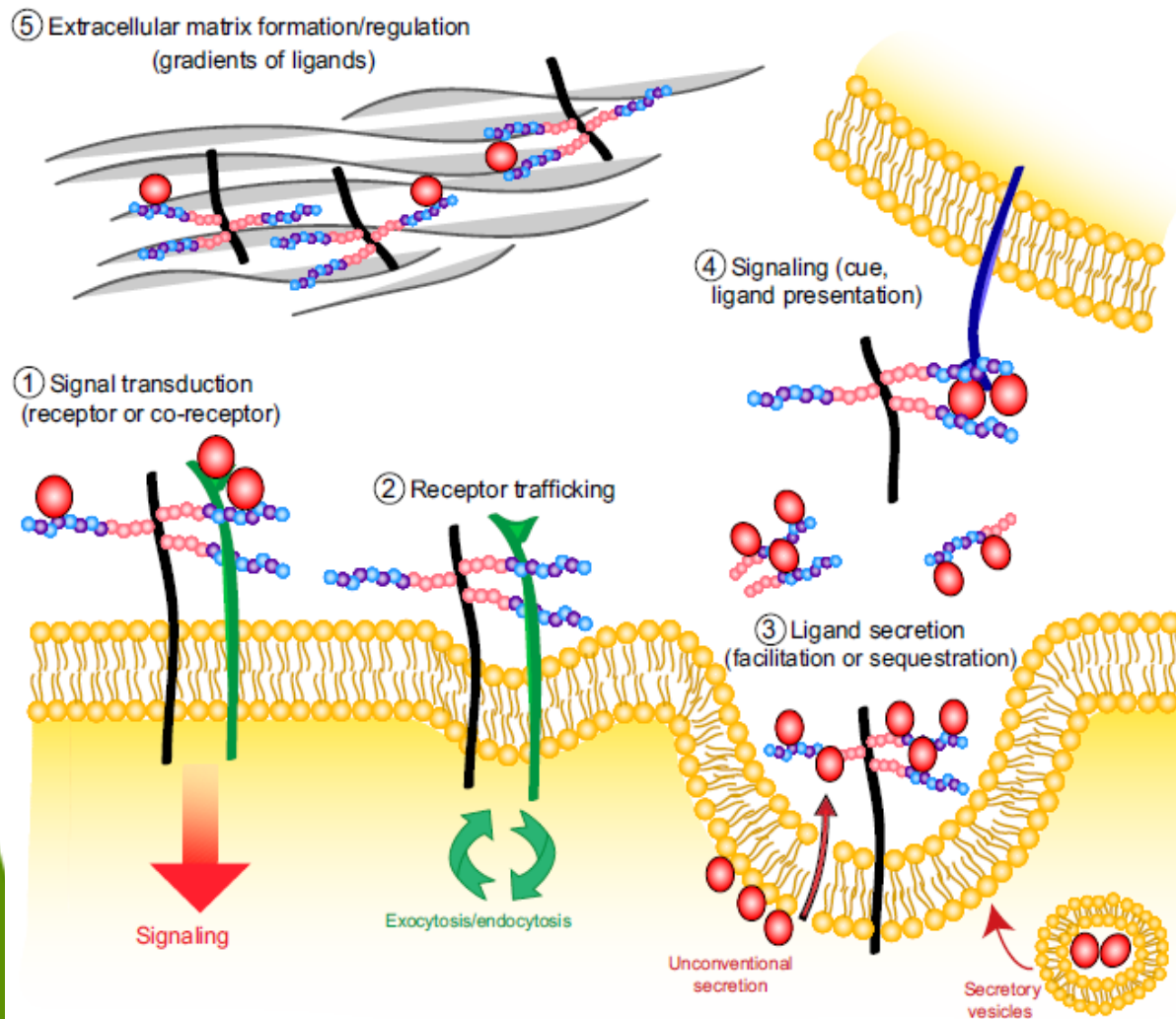
## Funkce





# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát - funkce

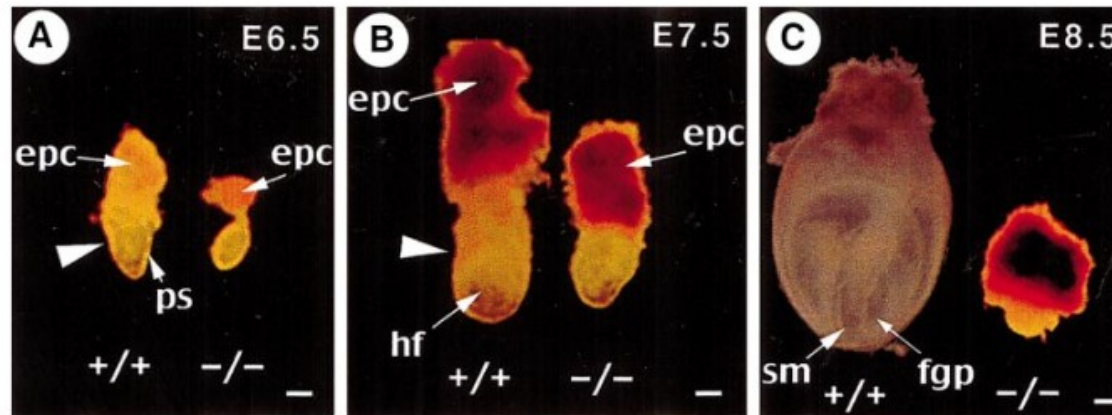
## Funkce



- Jako receptory/koreceptory (Wnt, FGF, Shh)
- Zvýšení koncentrace ligandu, nebo receptoru na povrchu buněk v lipidových raftech
- Regulace přenosu receptoru
- Kontrola sekrece ligandů
- Přímo jako signální molekuly
- Kontrola distribuce gradientů signálu.
- Komponenta ECM

## Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát - funkce

Exostosin Glycosyltransferase 1 Ext1 -/-  
 Inhibice syntézy HS -> narušení gastrulace

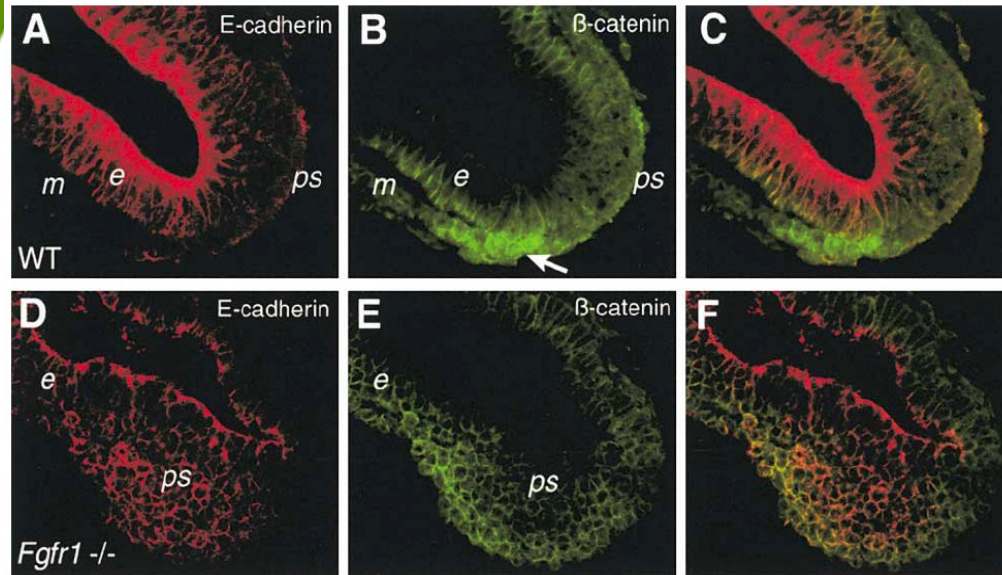


Lin et al., 2000

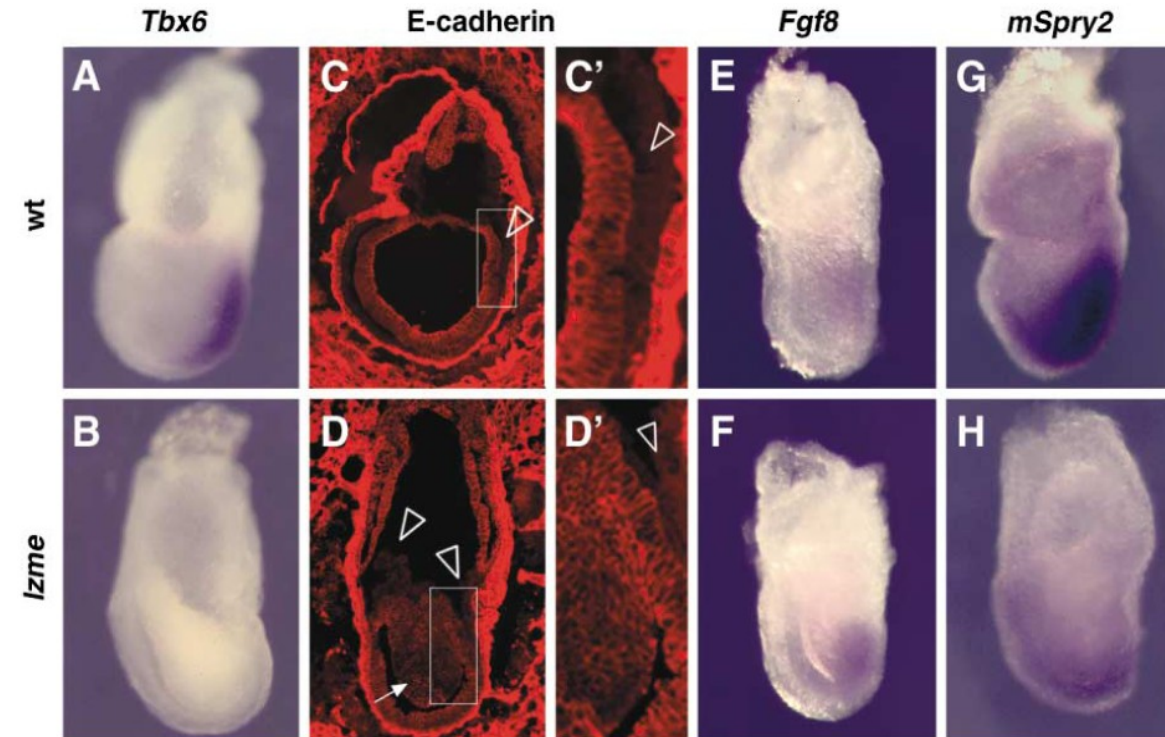
This defect is due to a failure in the production of heparan sulfate to which Hedgehog binds and uses as part of its diffusion mechanism

# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

➤ Návaznost na předchozí přednášku



Ciruna and Rossant, 2001



Garcia-Garcia and Anderson, 2003

➤ => Heparan sulfát je klíčový pro FGF signaling

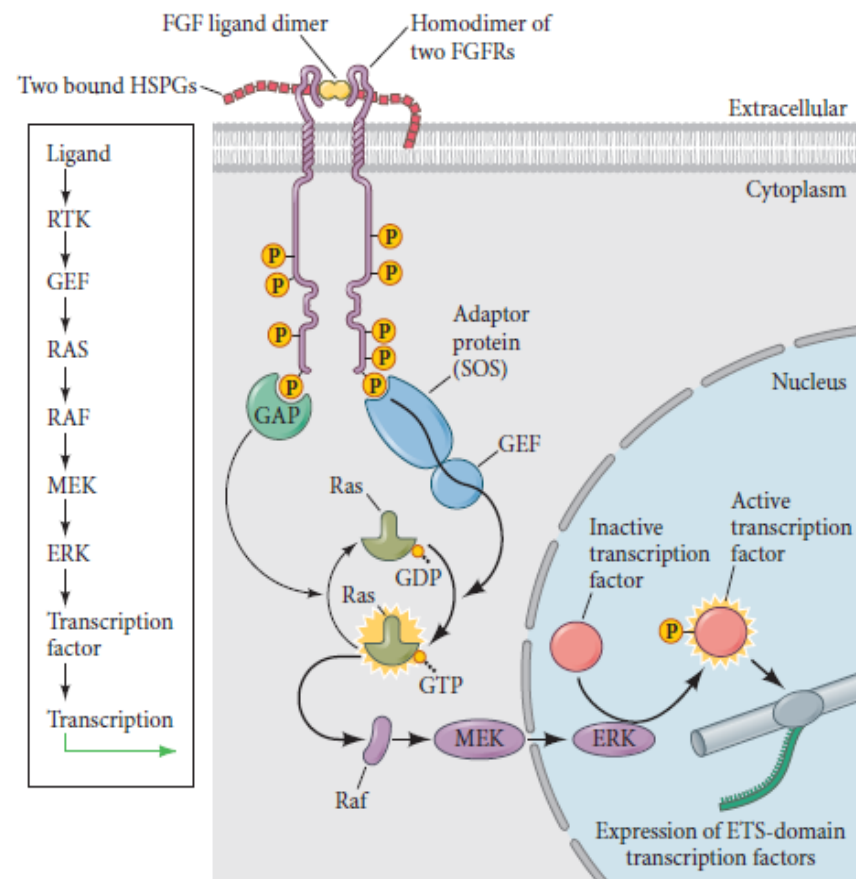
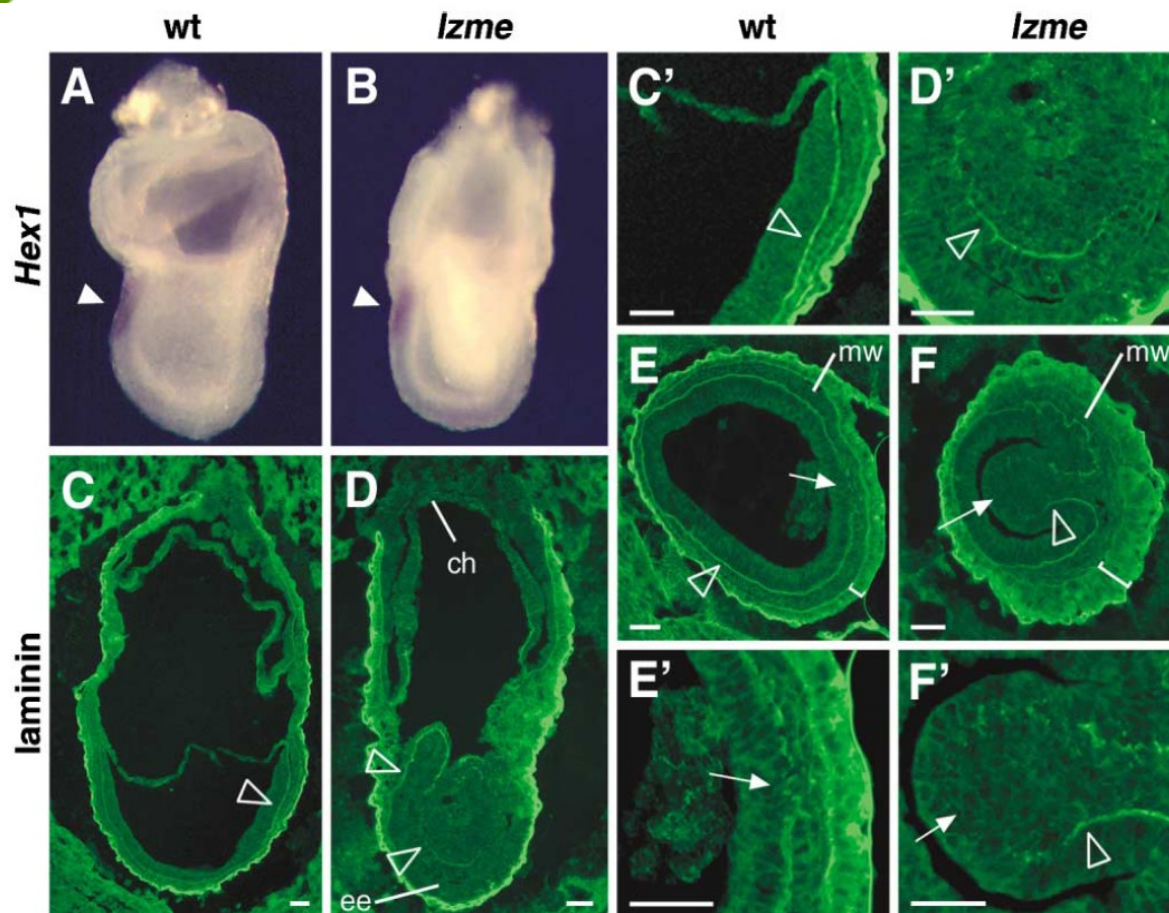
➤ *Izme* = mutace v genu *Ugdh* – UDP-glucose dehydrogenase, která je potřebná pro syntézu bočních glycosaminoglykanových (GAG) řetězců proteoglykanů.

**Bez Heparan sulfátu nebo FGF signalingu nemigruje mezoderm**

Fenotypy mutací v genů pro proteoglykany často mimikují mutace v receptorech pro růstové faktory <sup>19</sup>

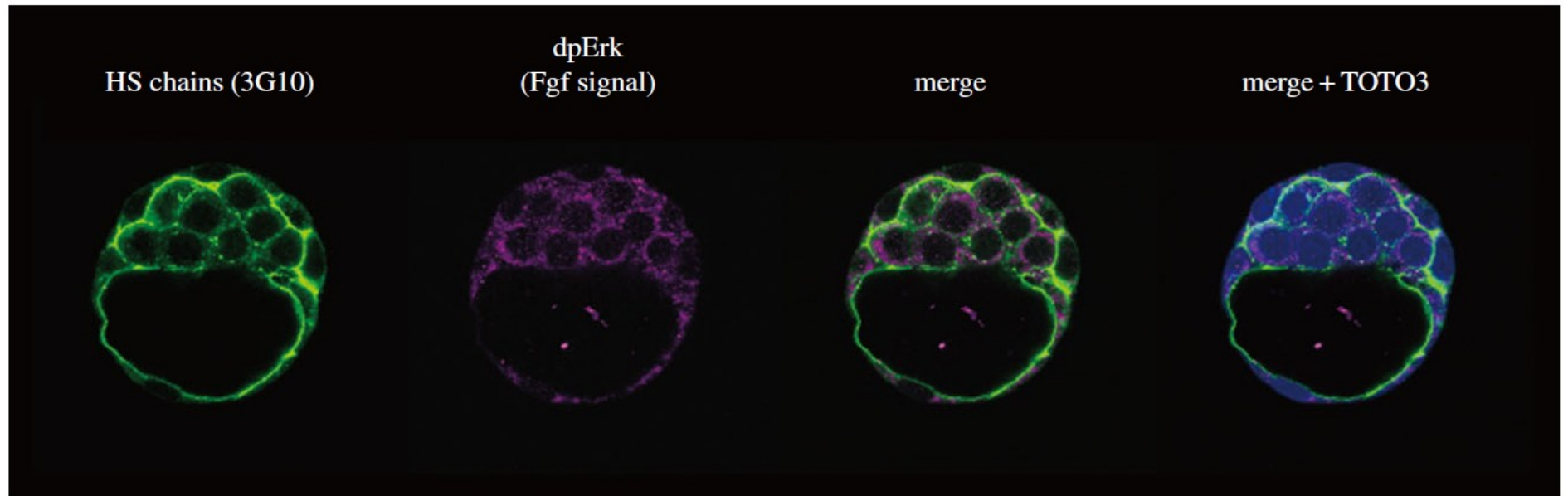


# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát





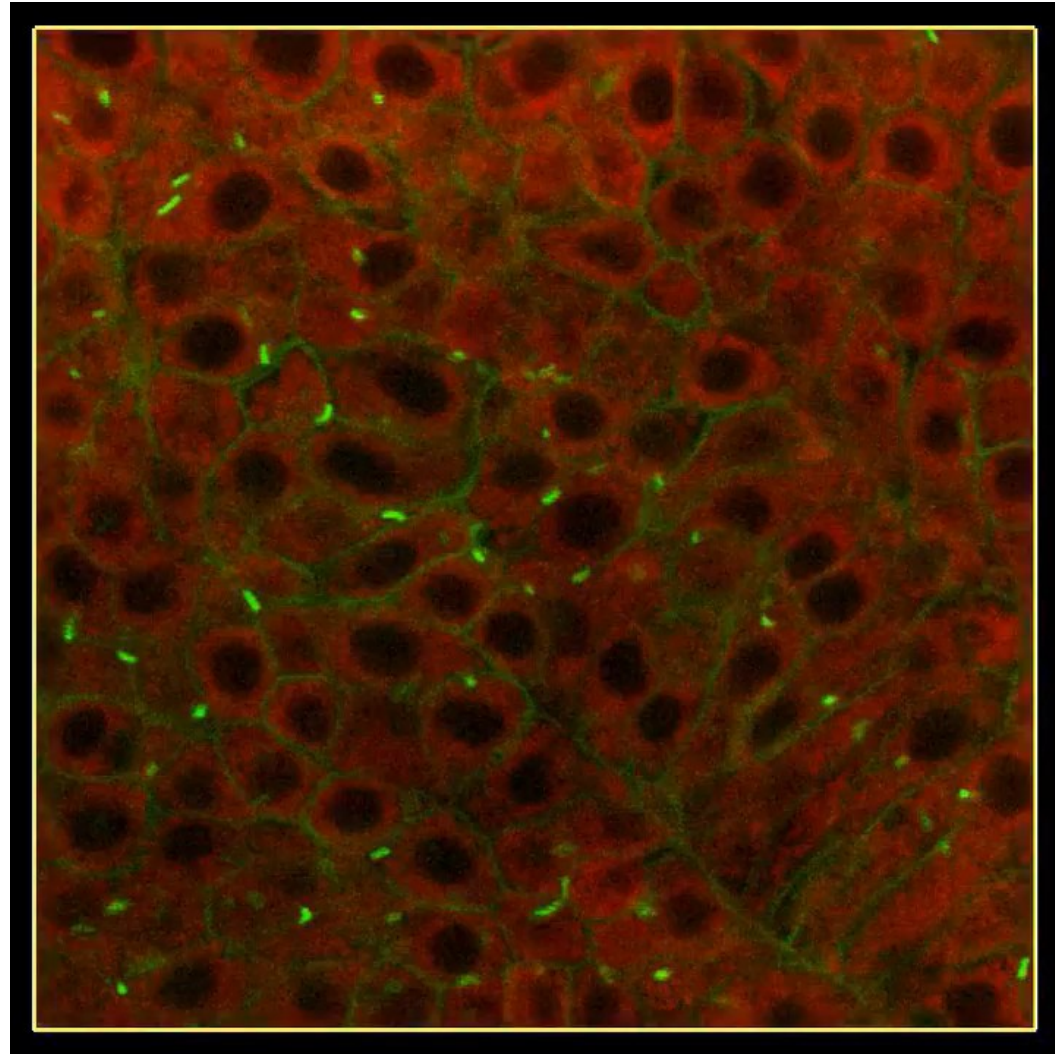
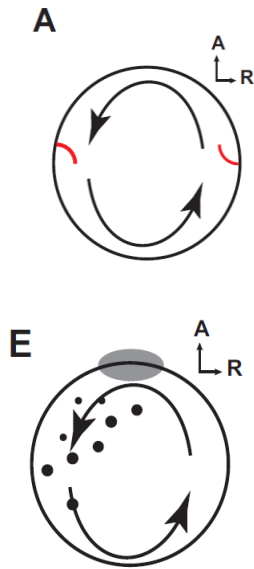
# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát



# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

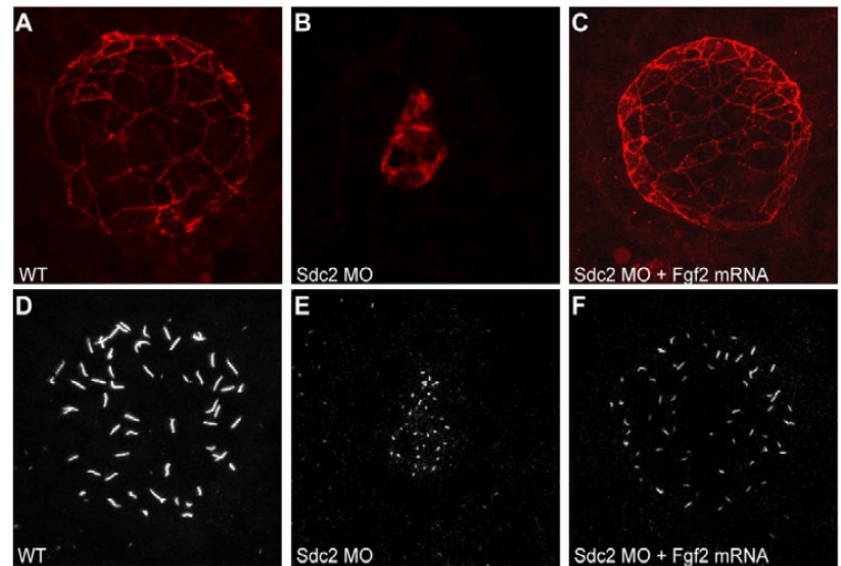
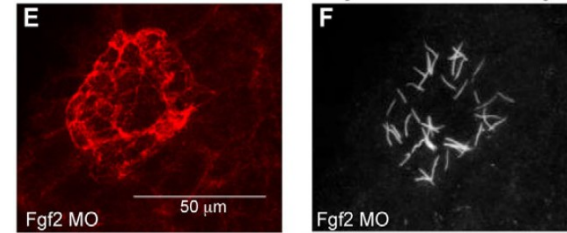
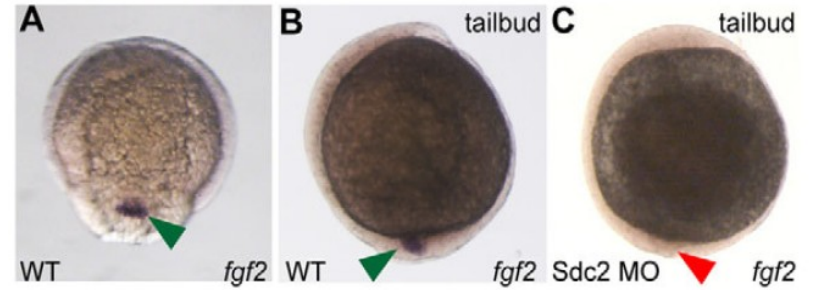
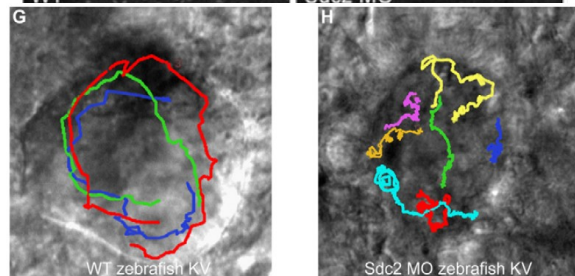
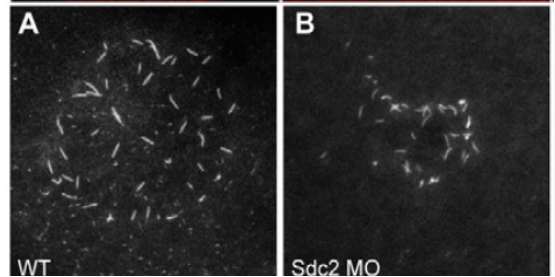
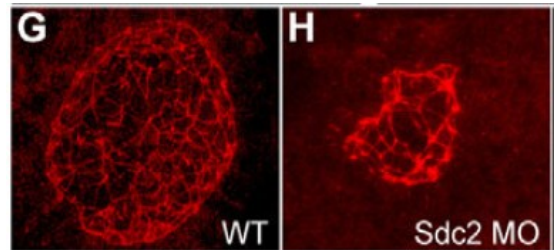
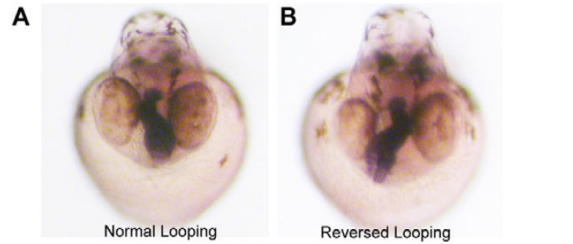
Pravo-levá symetrie

Kupffer's vesicle - is a ciliated organ that controls left-right (LR) patterning



# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

## Pravo-levá symetrie – Sdc2 MO

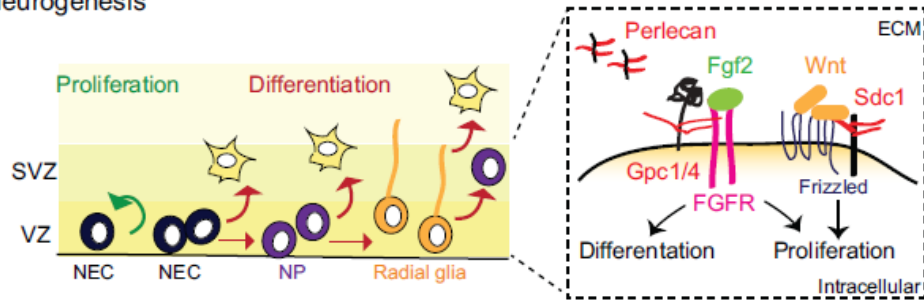


Arrington et al., 2013

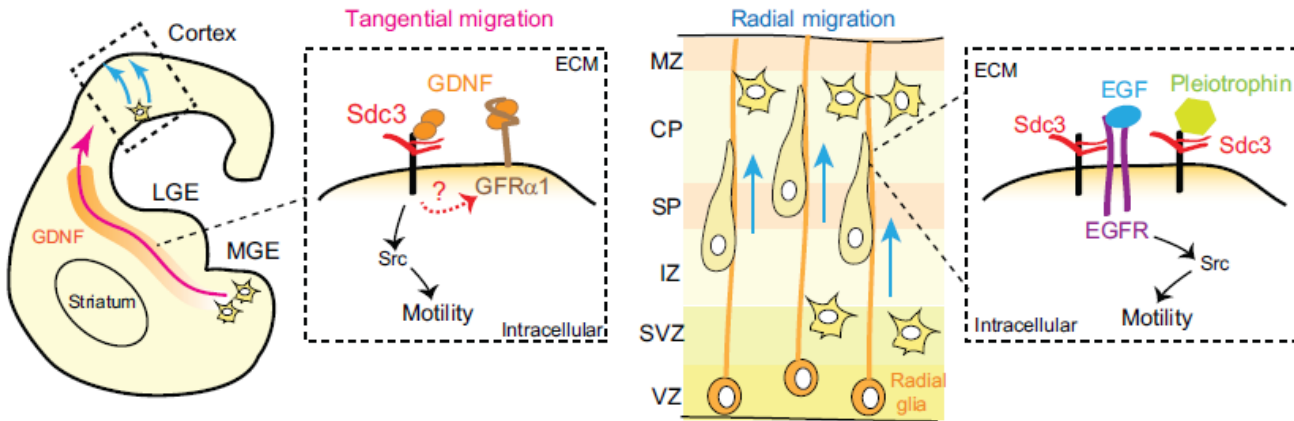


# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

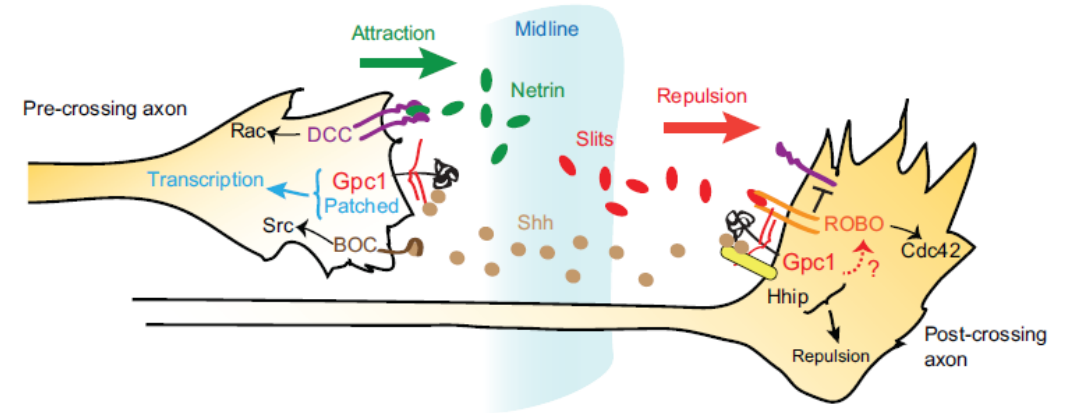
## A Neurogenesis



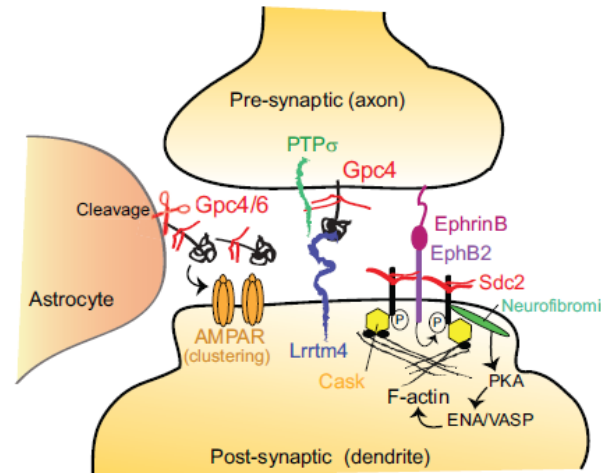
## B Neuronal migration



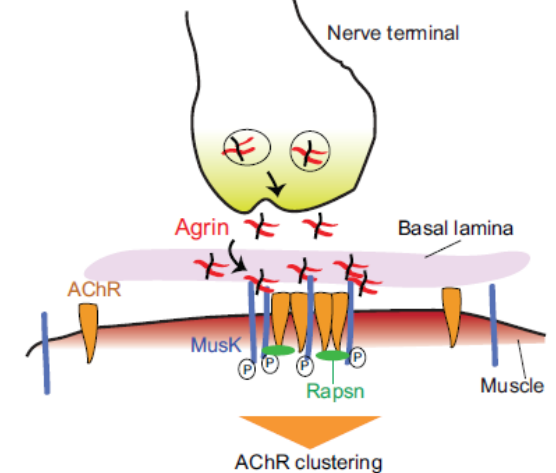
## C Axon elongation and growth cone guidance



## D Synapse formation

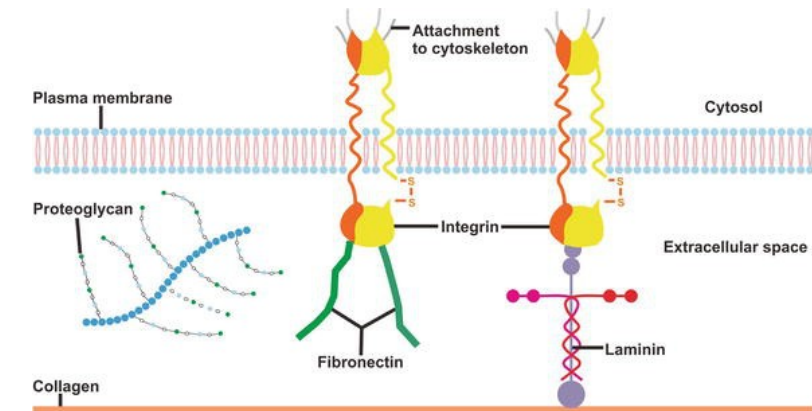
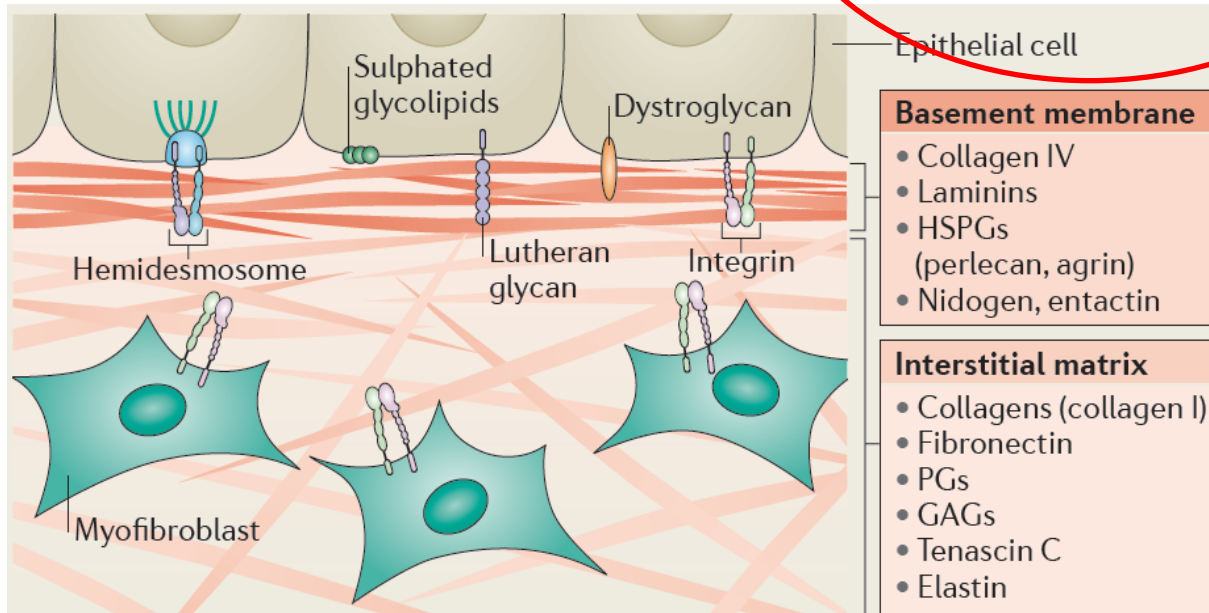
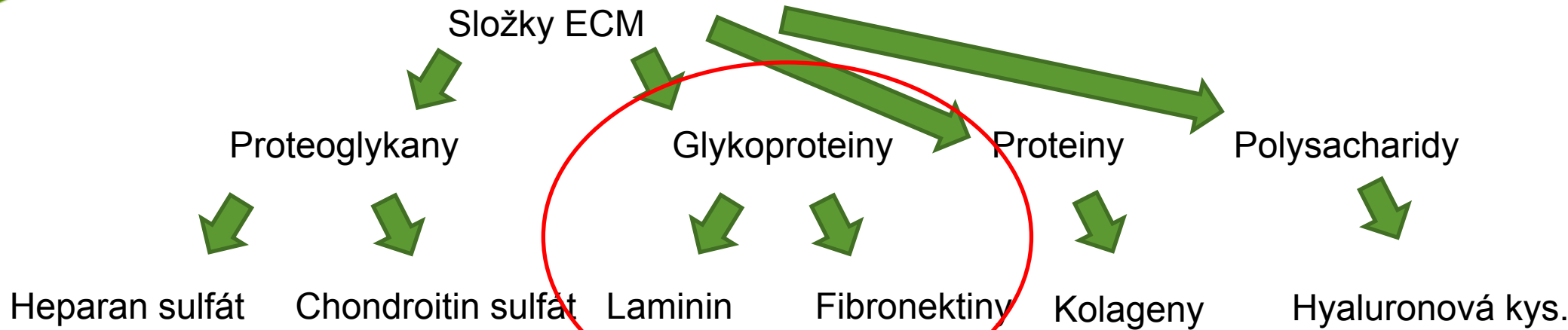


## E Neuromuscular junction



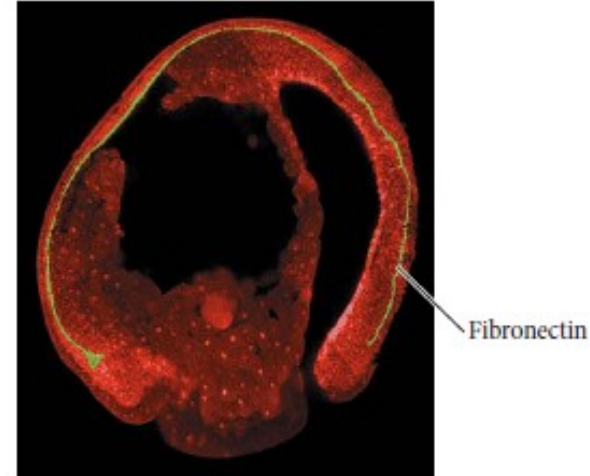


# Složky ECM – jak se v tom vyznat?



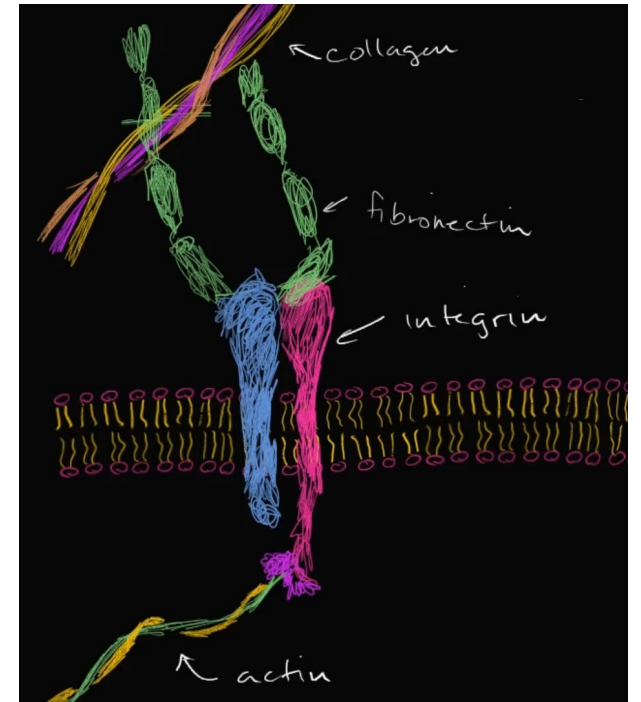
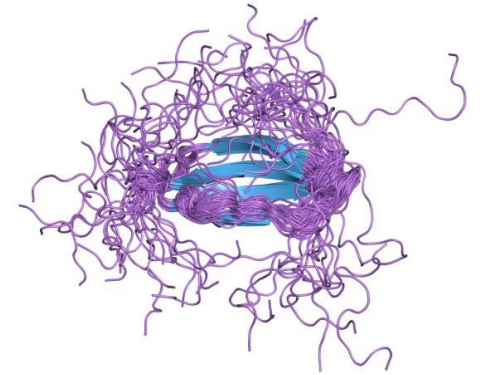
## Složky ECM – Glykoproteiny

- Fibronektin, Laminin
- Odpovědné za samotnou organizaci ECM a buněk do uspořádaných struktur



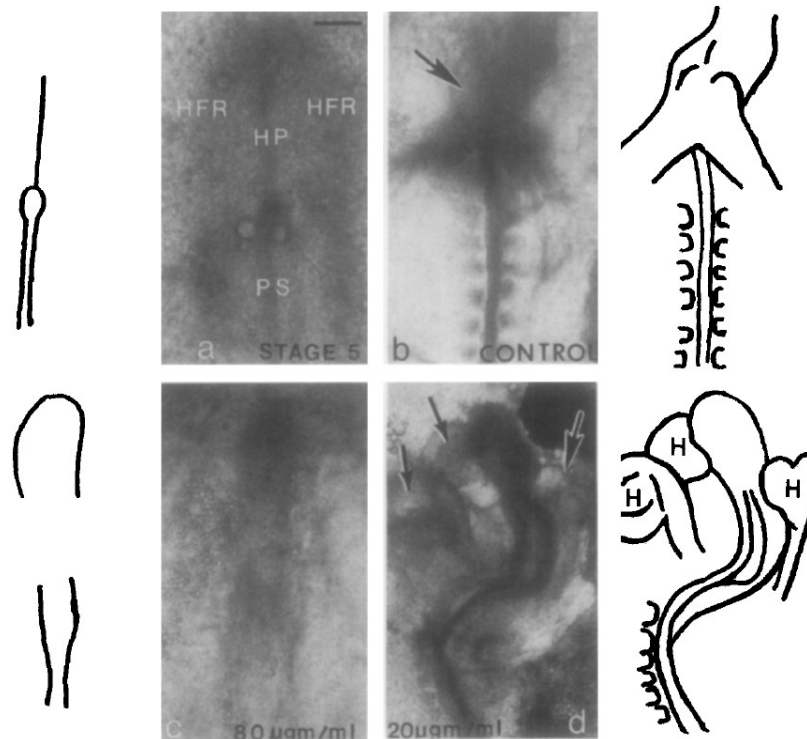
## Složky ECM – Glykoproteiny - Fibronektiny

- Velké glykoproteiny (cca 460 kDa) – heterodimery složené z 2 podjednotek spojených disulfidickou vazbou
- Dvě skupiny fibronektinů:
  - Rozpustný fibronektin (plasmatický – 300 µg/ml) – vyrábí ho hepatocyty
  - Nerozpustný, buněčný fibronektin
- Váže se na: kolagen, fibrin, heparin, DNA, aktin, integriny. **„Link mezi buňkou (integrinem) a složkami ECM“**
- Funkce: buněčná adheze (kontakt buňka-buňka a také zprostředkovává kontakt buňka-kolagen, proteoglykan), udržování tvaru buněk => vývoj a morfogeneze
- Má několik odlišných vazebných míst a jejich interakce s příslušnými molekulami vede ke správnému uspořádání buněk v rámci ECM.



# Složky ECM – Glykoproteiny - Fibronektiny

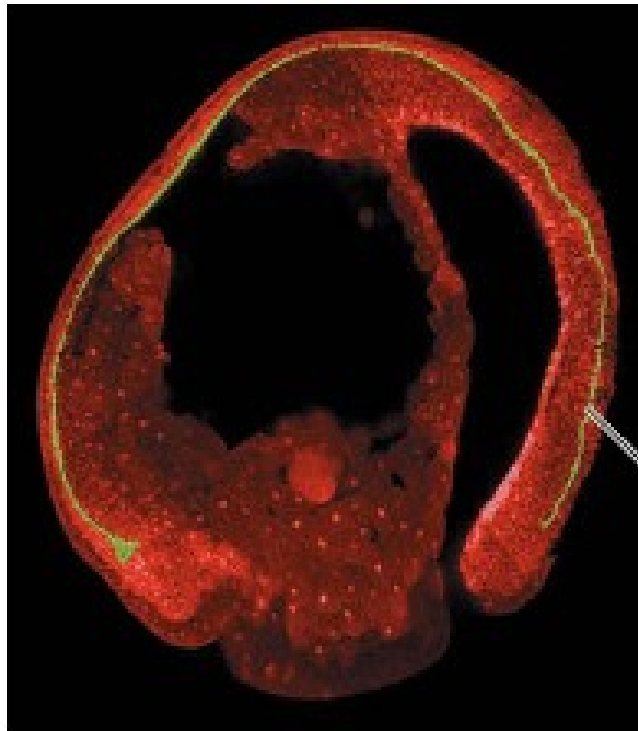
- Důležitá úloha v migraci buněk
  - Fibronektin označuje cesty kudy migrují buňky – např. migrace zárodečných buněk do gonád, migrace srdečních buněk do střední části embrya.



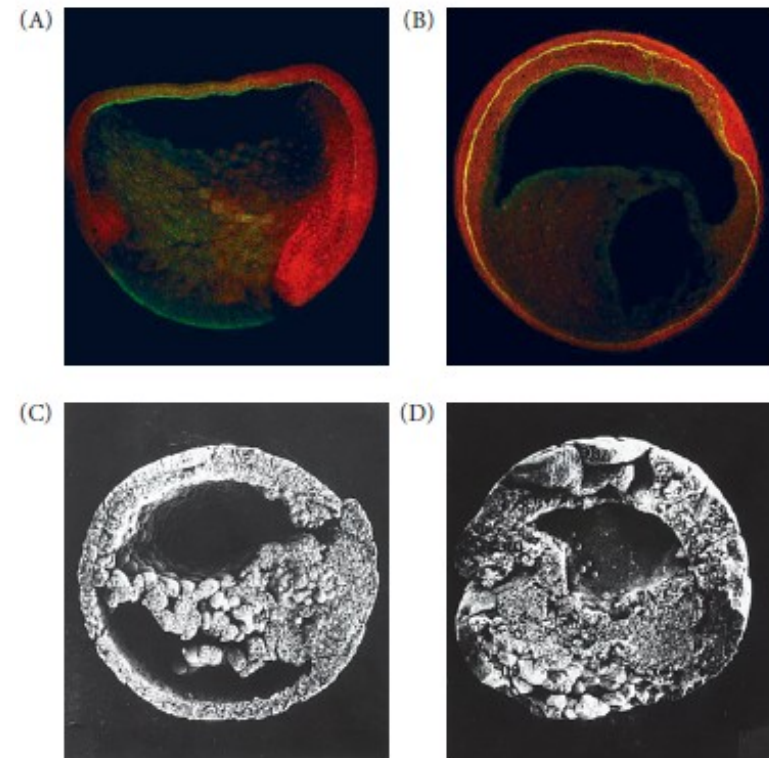


## Složky ECM – Glykoproteiny - Fibronektiny

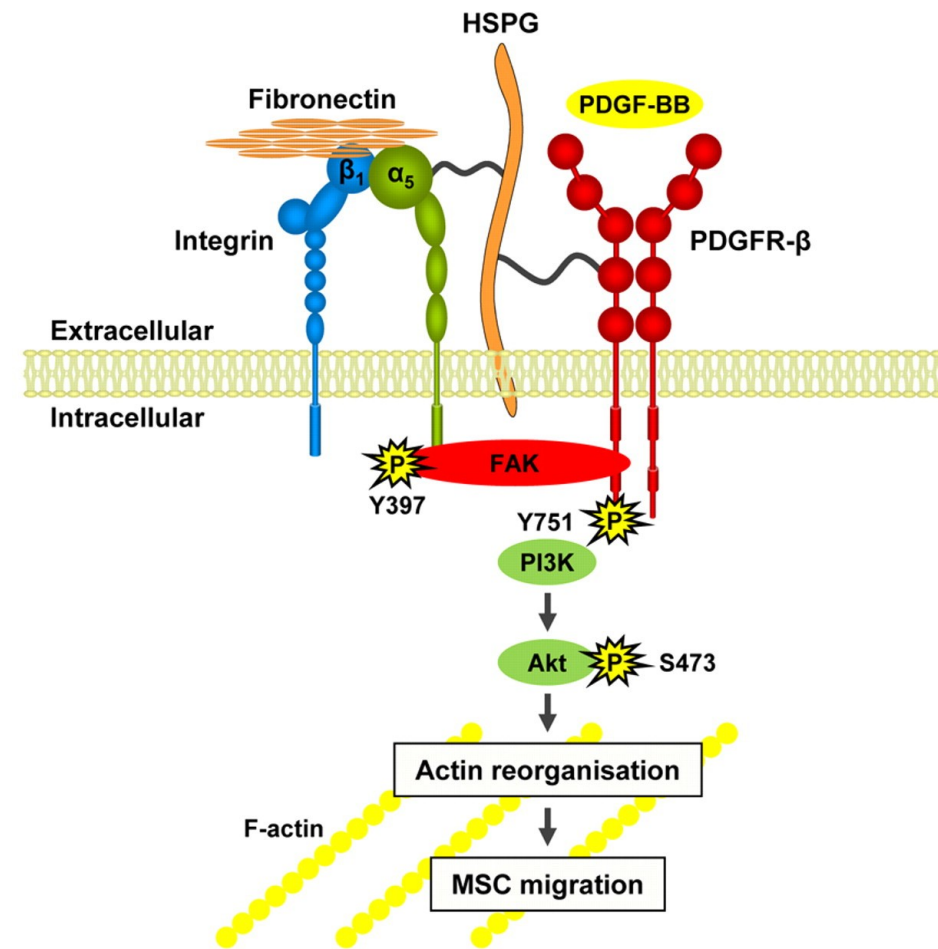
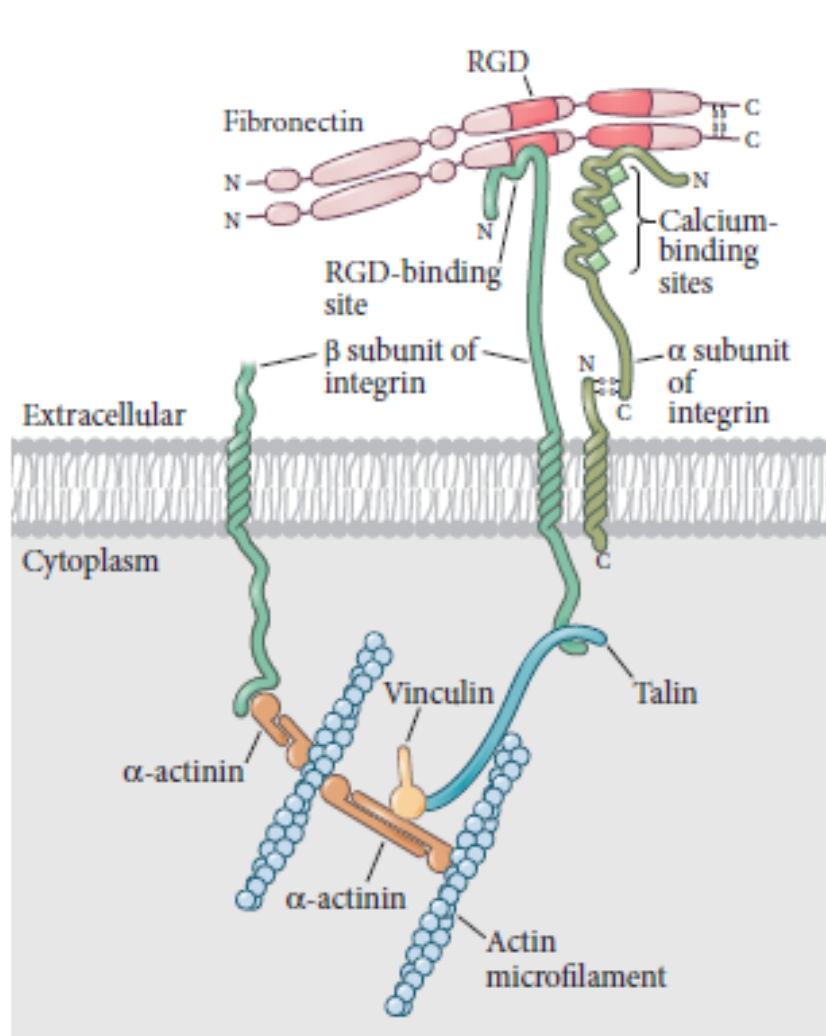
- Důležitá úloha v migraci buněk
  - Fibronektin označuje cesty kudy migrují buňky – v průběhu gastrulace je klíčový pro migraci buněk mezodermu.



Fibronectin

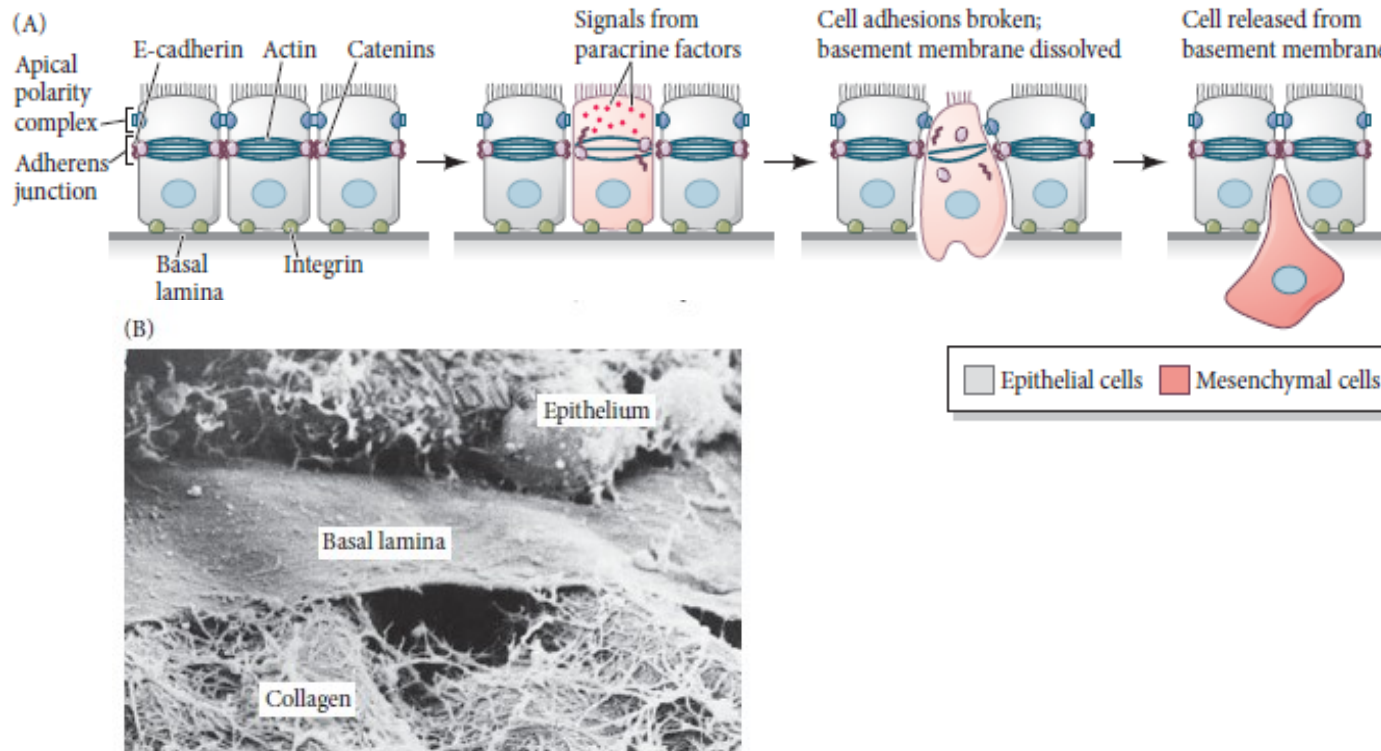


# Složky ECM – Glykoproteiny - Fibronektiny

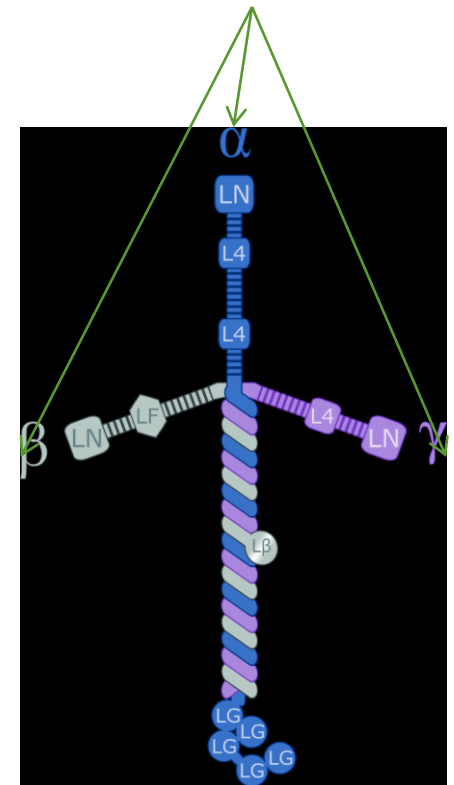


# Složky ECM – Glykoproteiny - Laminin

- Spolu s kolagenem je základní složkou basální laminy



Vazba na ostatní lamininy a složky ECM

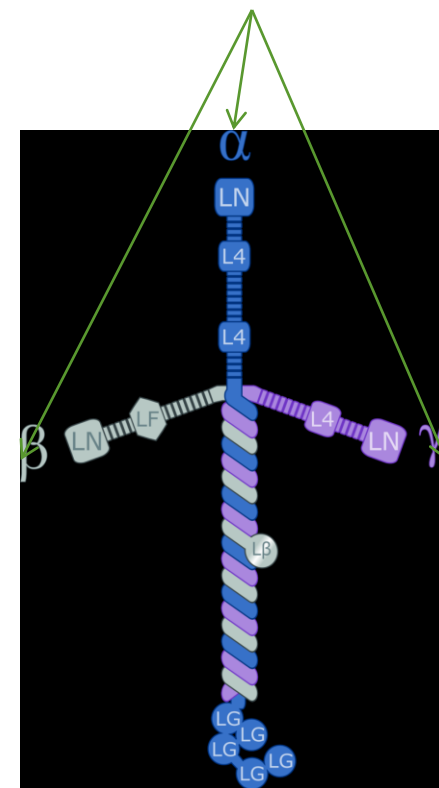


Vazba na buňku  
Přes integriny, dystroglykan

# Složky ECM – Glykoproteiny - Laminin

- Nomenklatura:  
Laminin-521 obsahuje  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  řetězce.

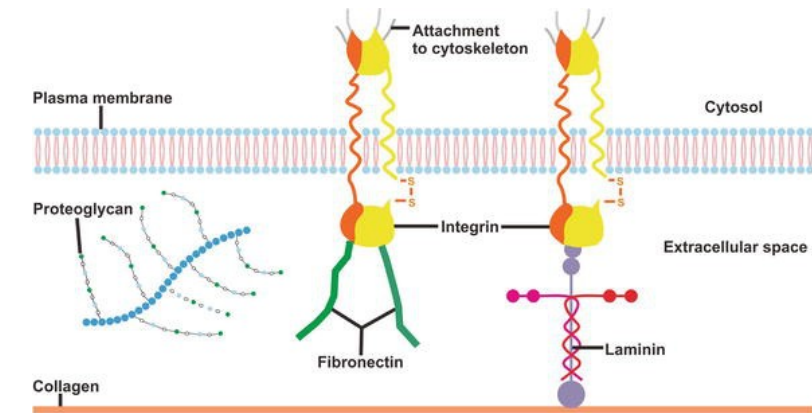
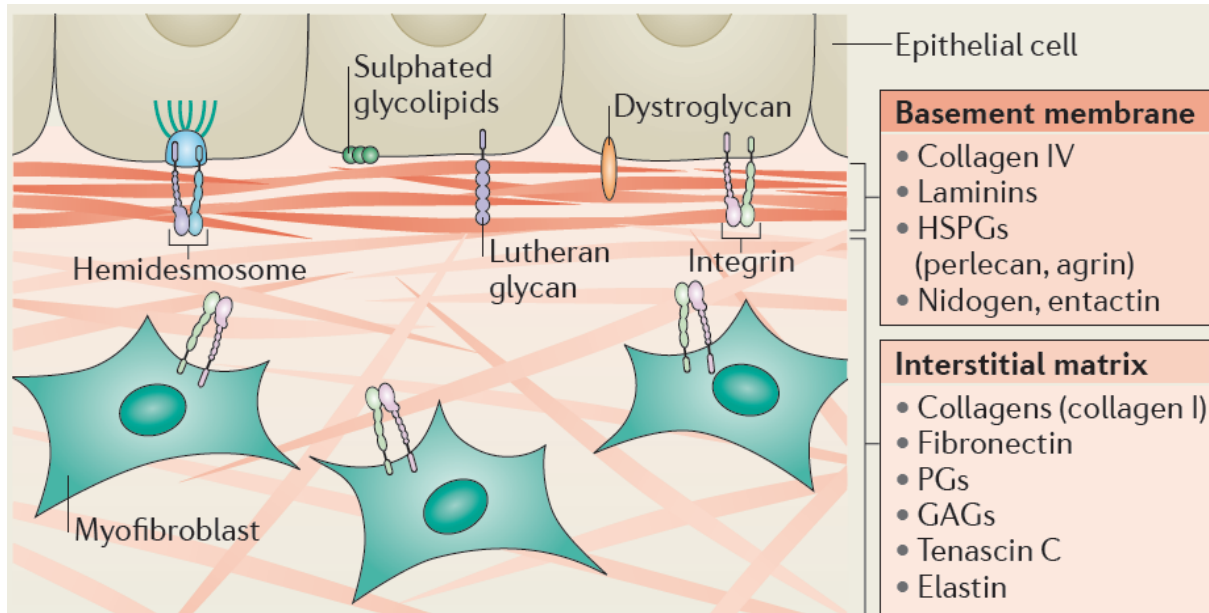
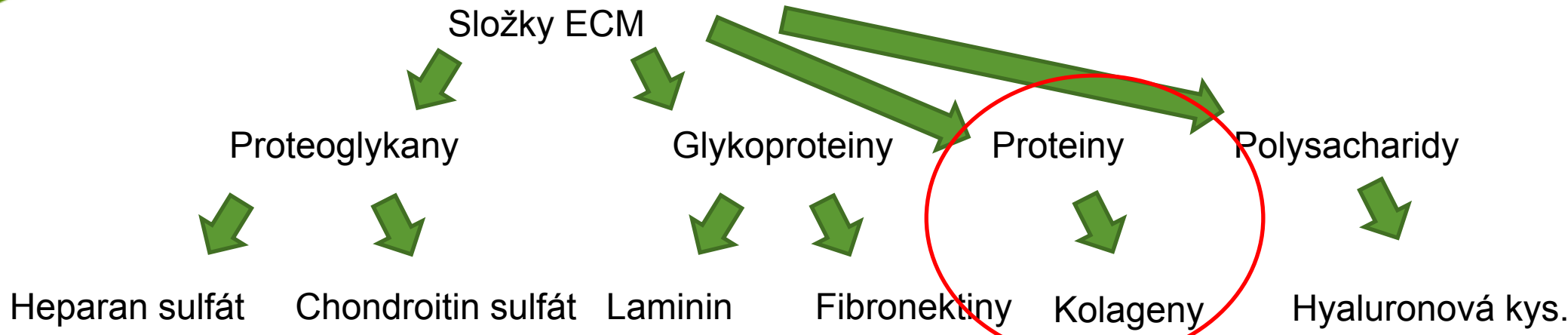
Vazba na ostatní lamininy a složky ECM



Vazba na buňku  
Přes integriny, dystroglykan

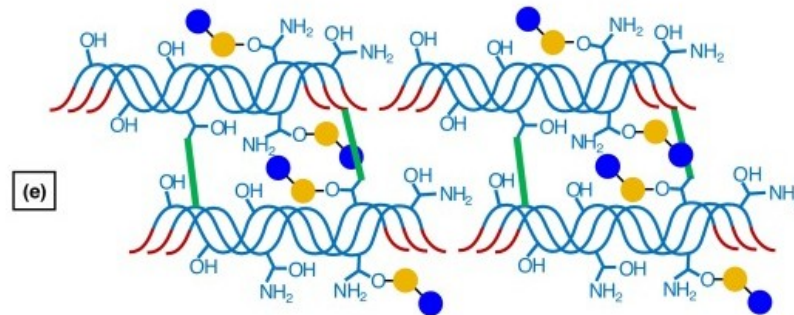


# Složky ECM – jak se v tom vyznat?



## Složky ECM – Proteiny - Kolageny

- Hlavní strukturální protein ECM (cca 30% všech proteinů u savců)
- Produkován převážně fibroblasty
- Želatina je v podstatě hydrolyzovaný kolagen.
- 90% kolagenu tvoří Kolagen I, celkem cca 30 typů kolagenu
- Kolagen je glykosilován prostřednictvím prolyl-4-hydroxylázy and lysyl-hydroxylázy – potřebují Vitamin C jako kofaktor. Nedostatek vitamínu C pak vede ke Kurdějím



Current Opinion in Structural Biology

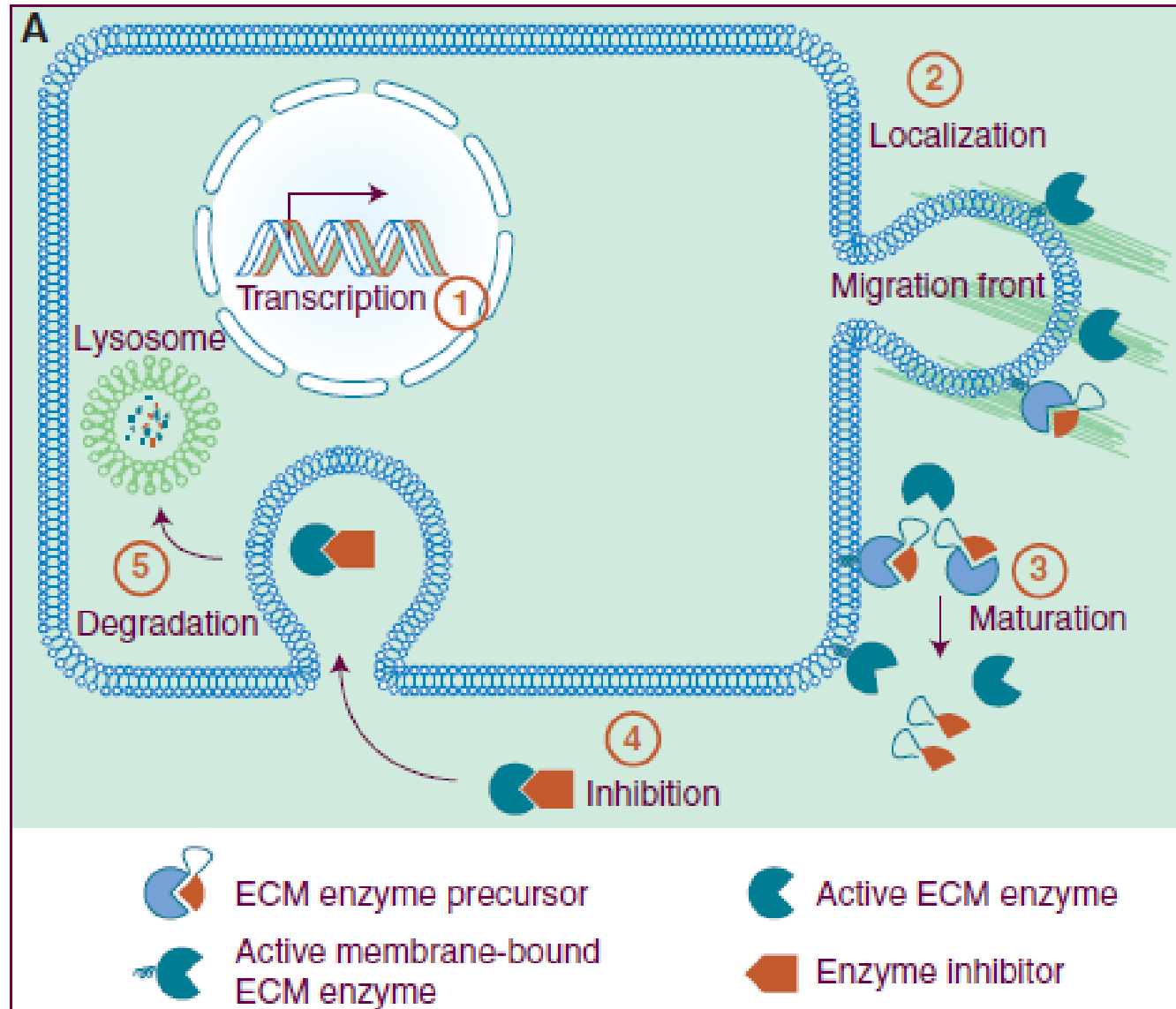


## ECM - remodelace

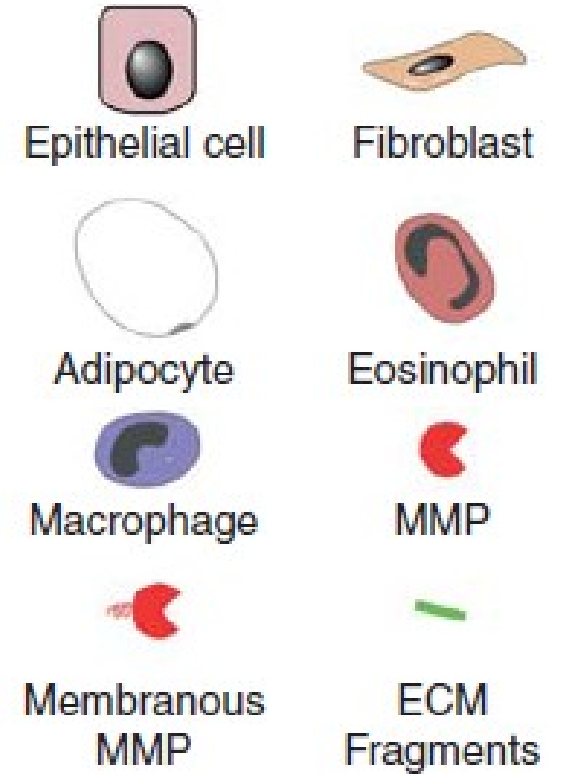
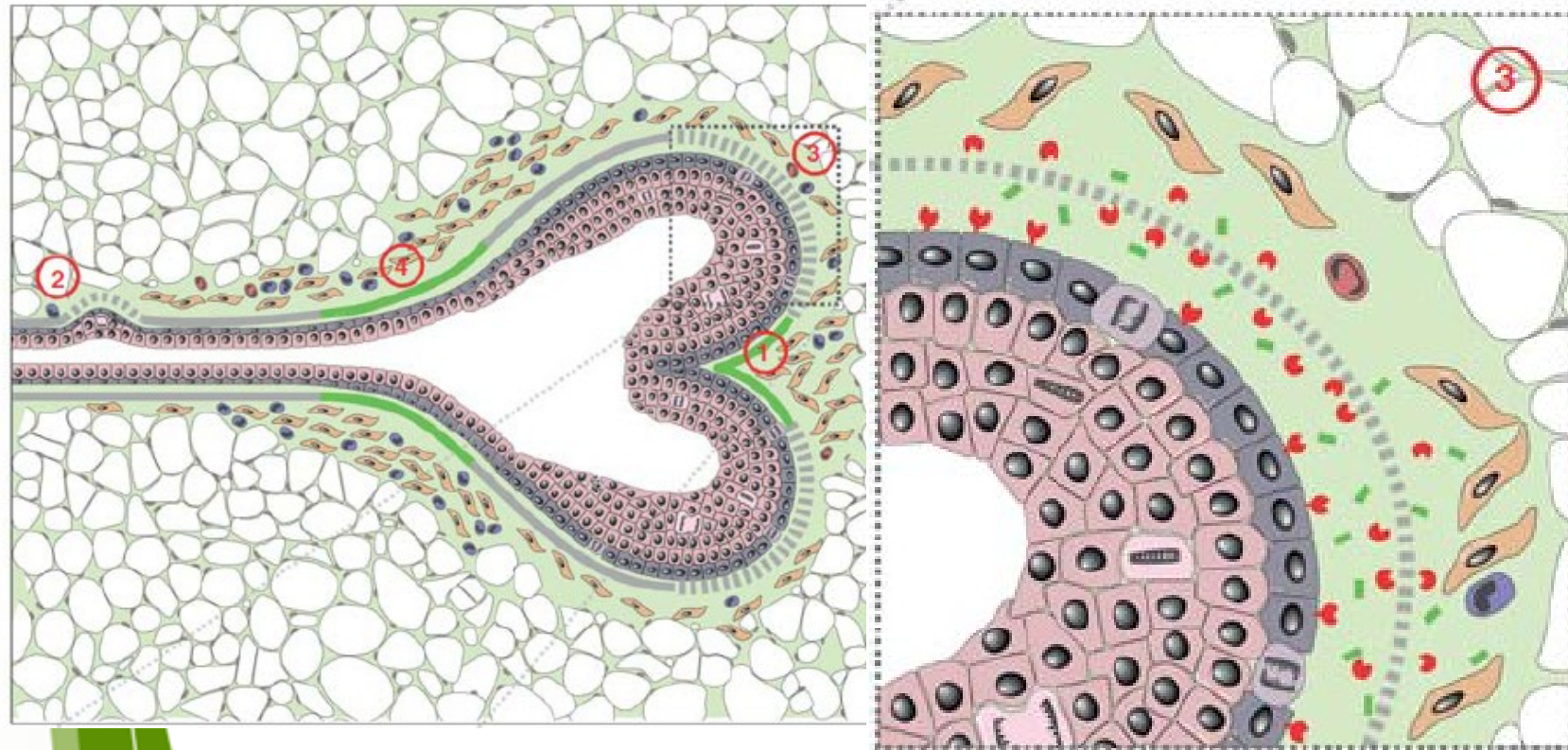
- Štěpení ECM komponent je klíčovým procesem v průběhu ECM remodelace.
  - Regulace množství ECM
  - Regulace složení ECM
  - Regulace struktury
  - Uvolnění růstových faktorů (a dalších regulačních molekul)
- **Matrix metaloproteinázy (MMP)**
  - Hlavní enzymy, které degradují ECM
  - Volné (sekretované) nebo vázané na buněčnou membránu.
  - Sekretované v podobě zymogenu – aktivace až v ECM (jinou MMP nebo oxidací thiol. skupiny).
- **Adamalysins (ADAMTS), Meprins**



# ECM - remodelace

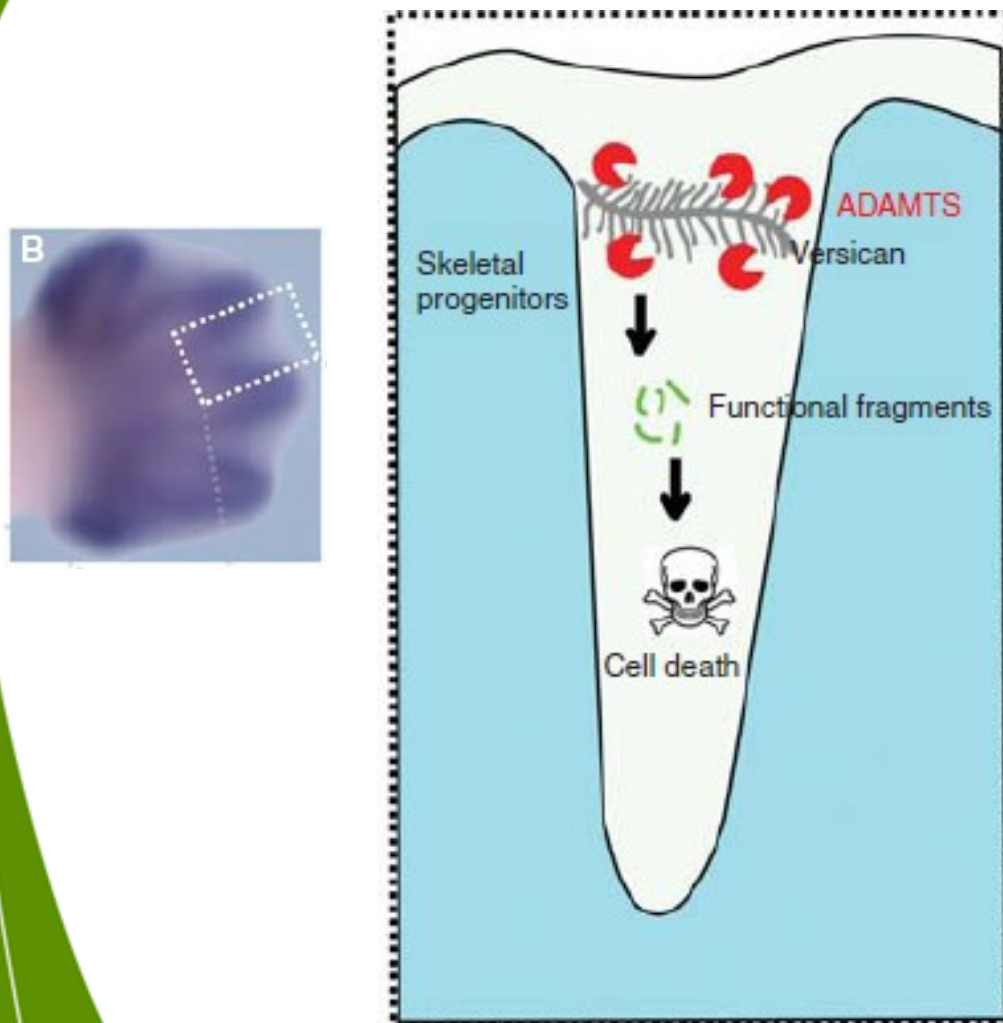


# ECM - remodelace



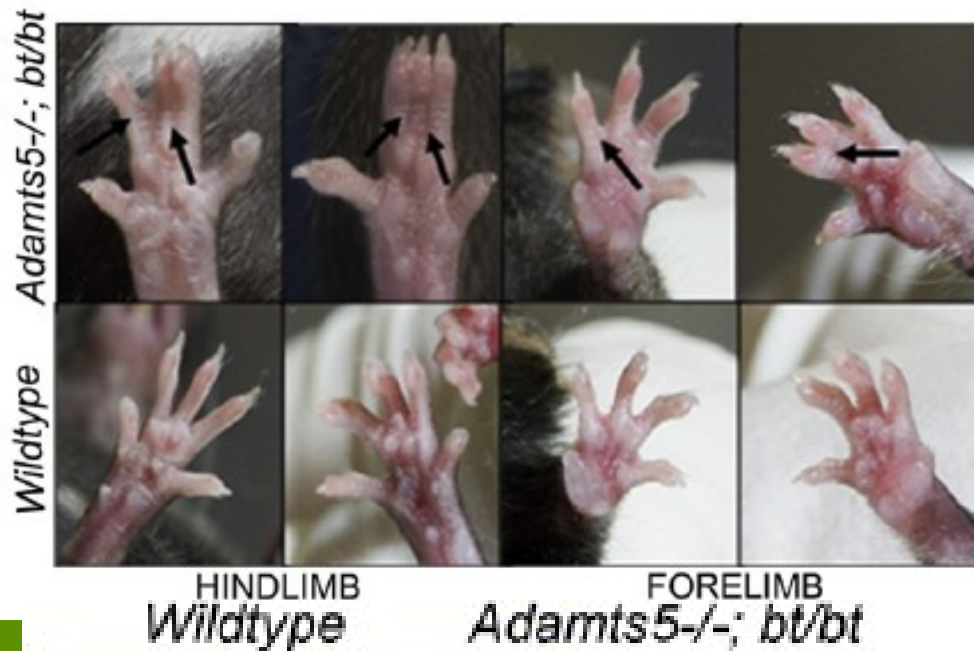
## ECM – remodelace - apoptóza

ADAMTS - a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

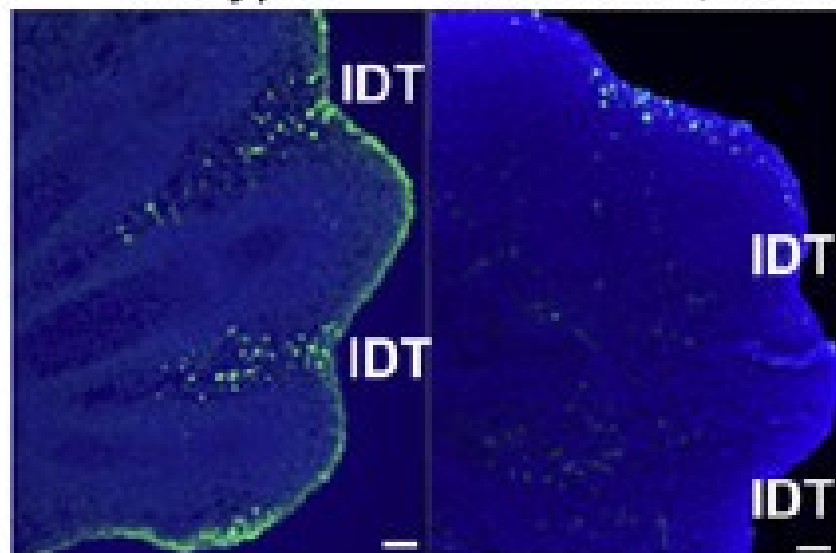


- Degradace interdigitální (mezi prsty) tkáně zahrnuje intenzivní remodelaci ECM.
- Remodelace pomocí ADAMTS5 a jejího substrátu – složky ECM versicanu.
- Produkt štěpení versicanu indukuje apoptózu
- V případě absence ADAMTS5 dochází k syndaktylii.

# ECM – remodelace - apoptóza



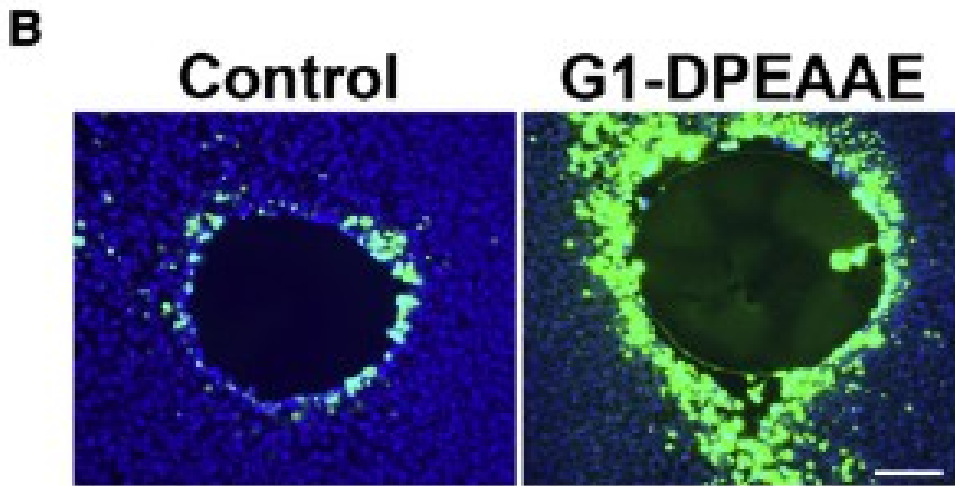
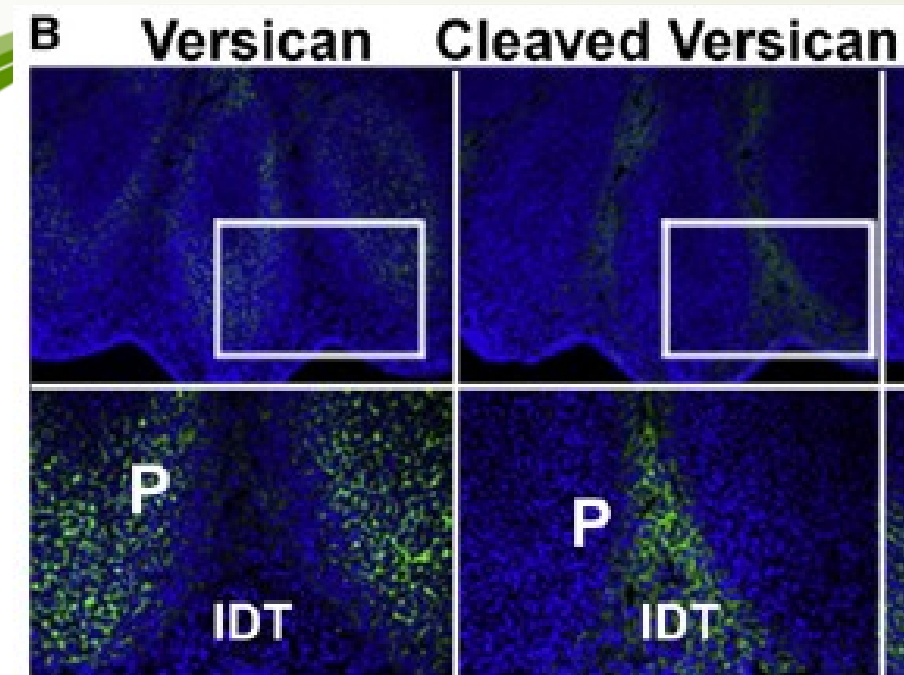
Při absenci ADAMTS5 dochází k syndaktylii...



....Protože nedochází k apoptóze

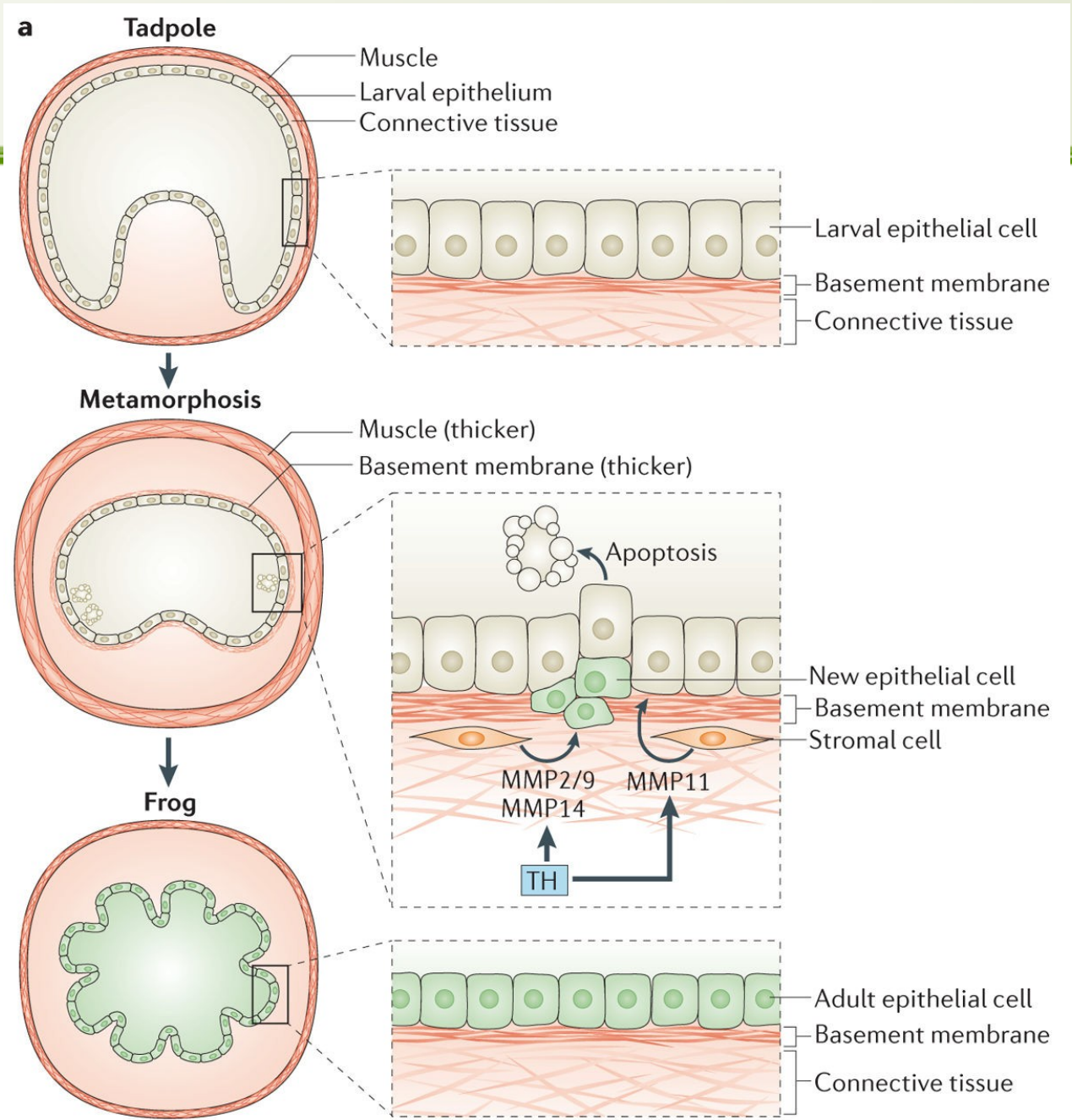


# ECM – remodelace - apoptóza

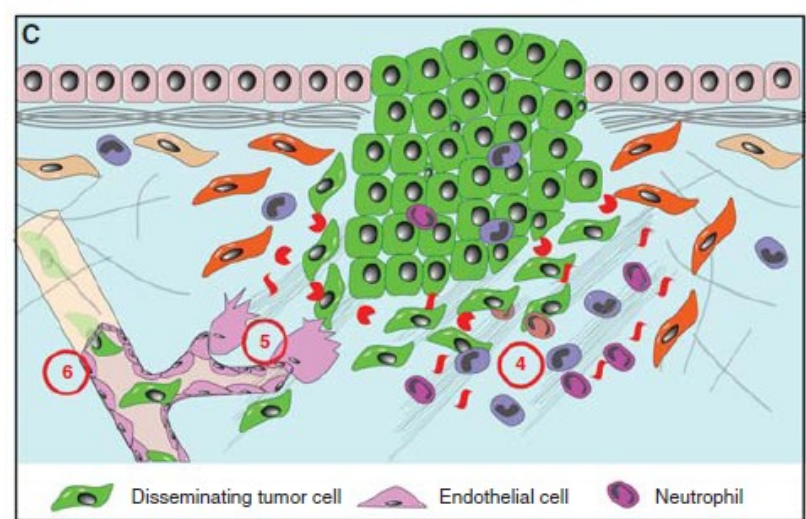
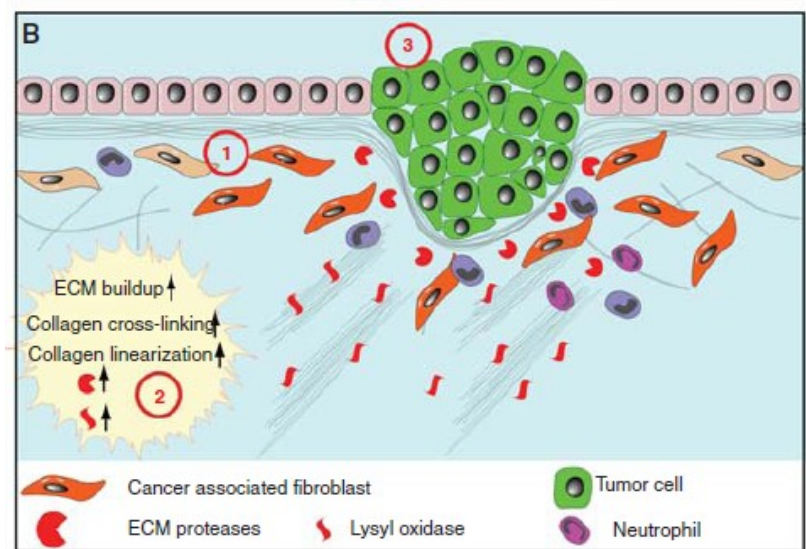
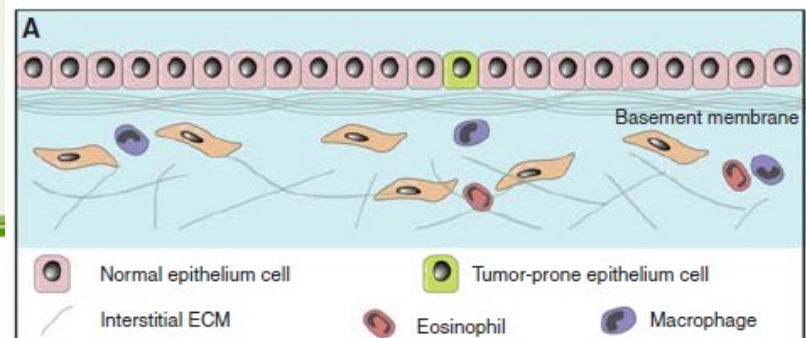


Samotná přítomnost štěpené formy Versicanu je schopna indukovat apoptózu

# ECM - remodelace



# ECM - remodelace



## Složky ECM – Závěr

- Znat základní složky ECM, skladba, funkce + uvést funkční příklady
- Znat principy remodelace ECM + uvést příklady

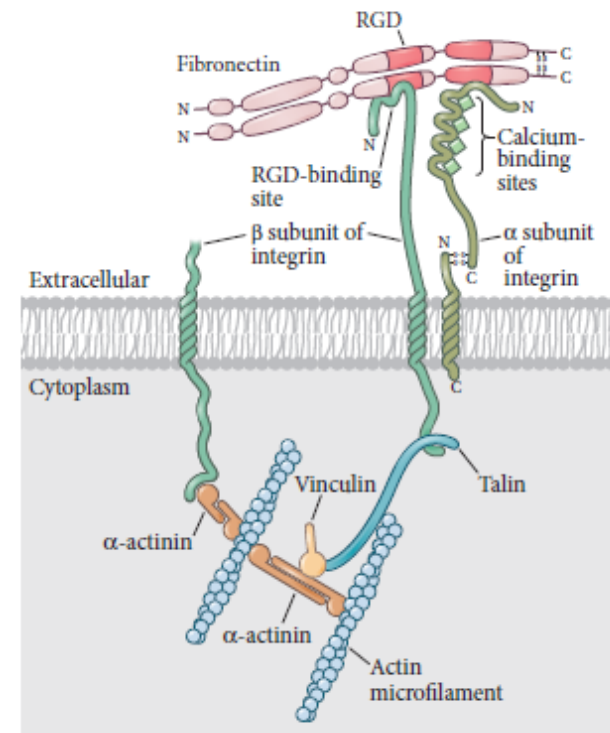


## Složky ECM – Receptory

Buňka musí nějak „vnímat“ jestli a jak je ukotvena v ECM => je to pro ni důležitý zdroj signálů a informací

## Složky ECM – Receptory - Integriny

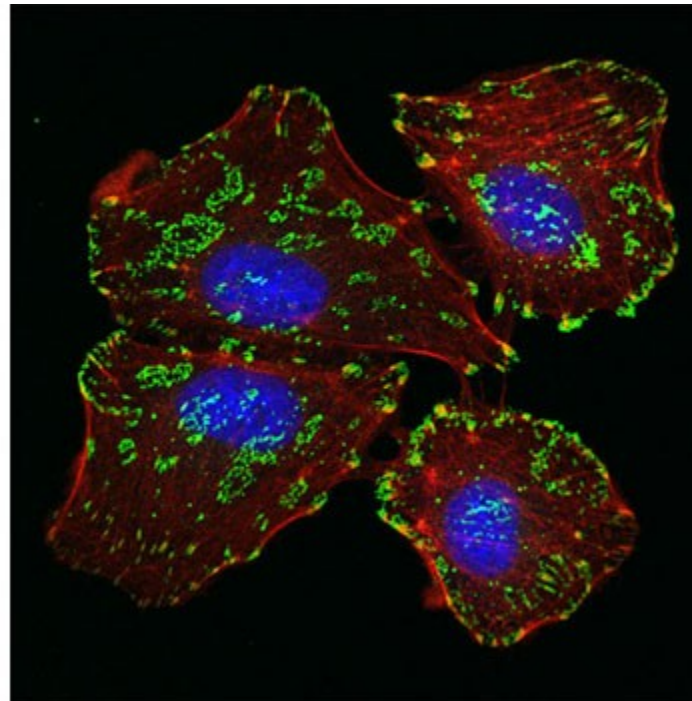
- Schopnost buňky vázat adhesivní glykoproteiny ECM (laminin, fibronektin) závisí na expresi membránových receptorů.
- Integriny = integrují extracelulární a intracelulární matrix, tak aby spolu pracovaly.
- V ECM se vážou na arginine-glycine-aspartate (RGD) motiv – přítomen u adhesivních proteinů ECM – fibronektin, laminin, vitronektin.



Uvnitř buňky se vždy váže na cytoskelet.

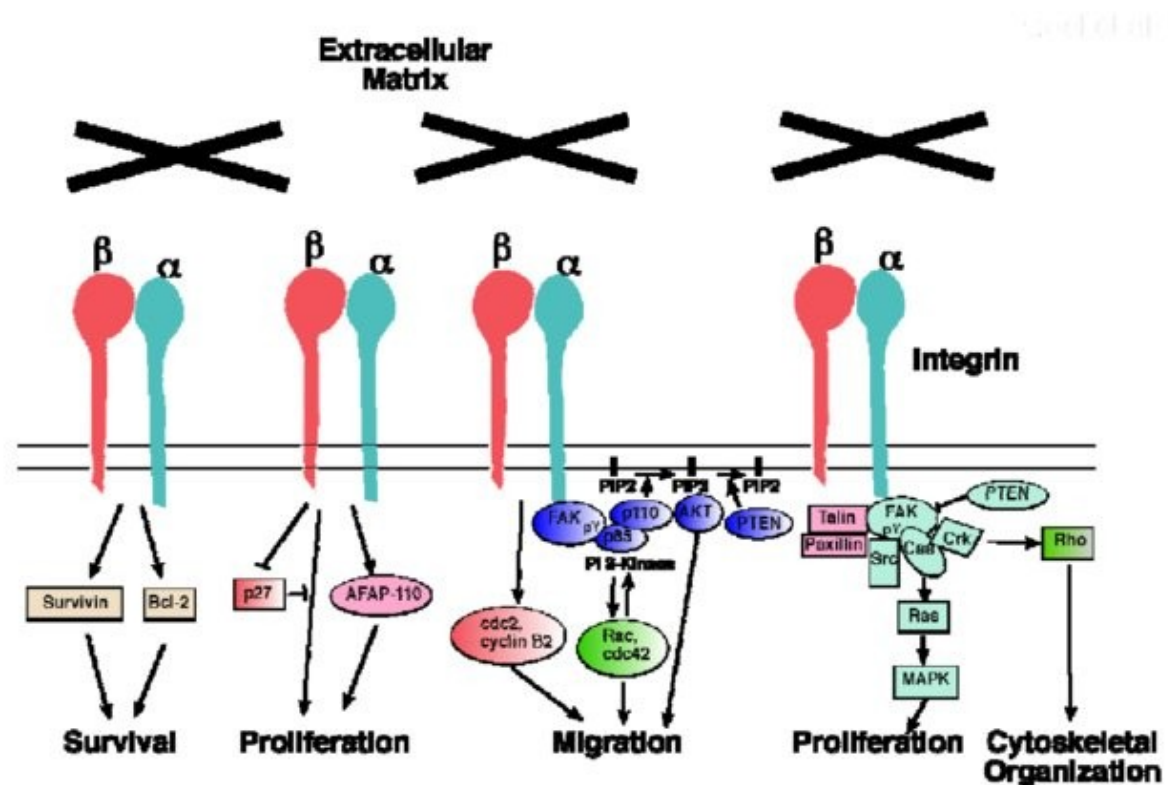
## Složky ECM – Receptory - Integriny

- Mají schopnost signalizovat z vnějšku buňky dovnitř, což vede ke změně genové exprese.
- Vnímají napětí (tlak, tuhost) ECM, aktivují/deaktivují různé signální dráhy.
- Klíčový k řízení exprese genů v průběhu vývoje tkání (mléčná žláza - schopnost signalizovat expresi genů estrogenového receptoru a kaseinového proteinu)



## Složky ECM – Receptory - Integriny

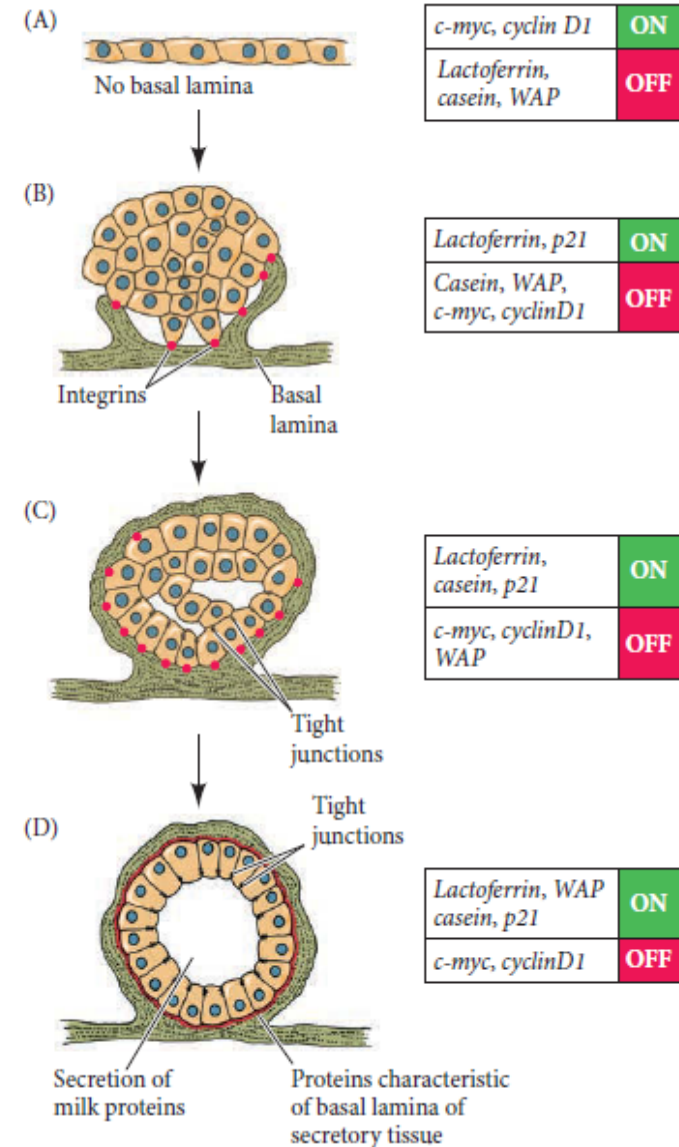
- Aktivace integrinů může:
  - Stimulovat proliferaci
  - Inhibovat apoptózu
  - Aktivovat procesy nutné ke změně tvaru buňky, nebo polarity
  - Změnit motilitu buňky





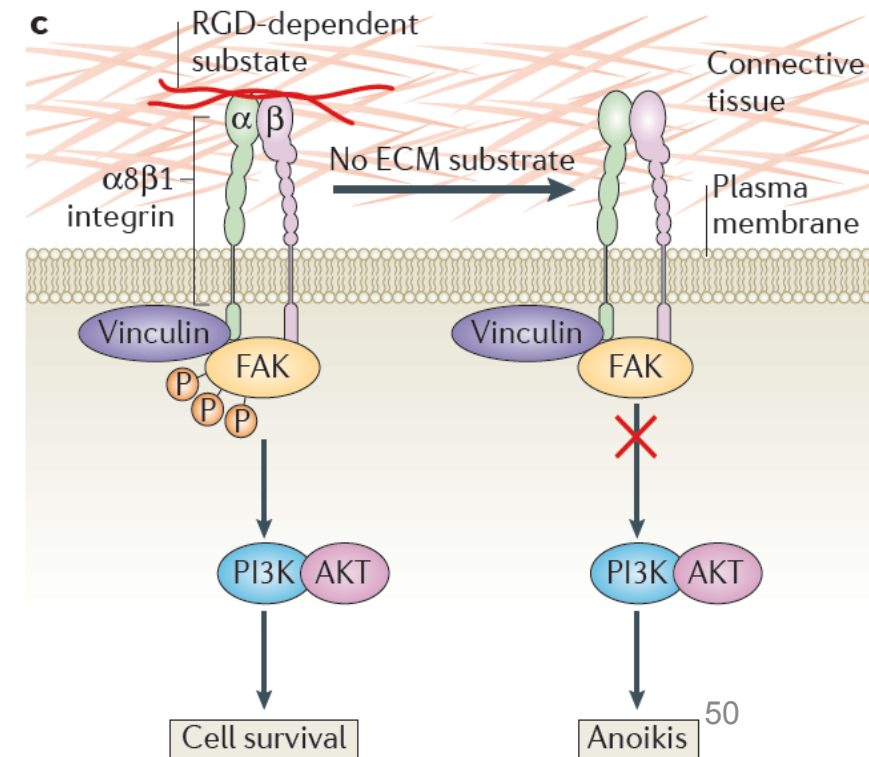
# Složky ECM – Receptory - Integriny

- Příklad:
- Které geny jsou regulovány?

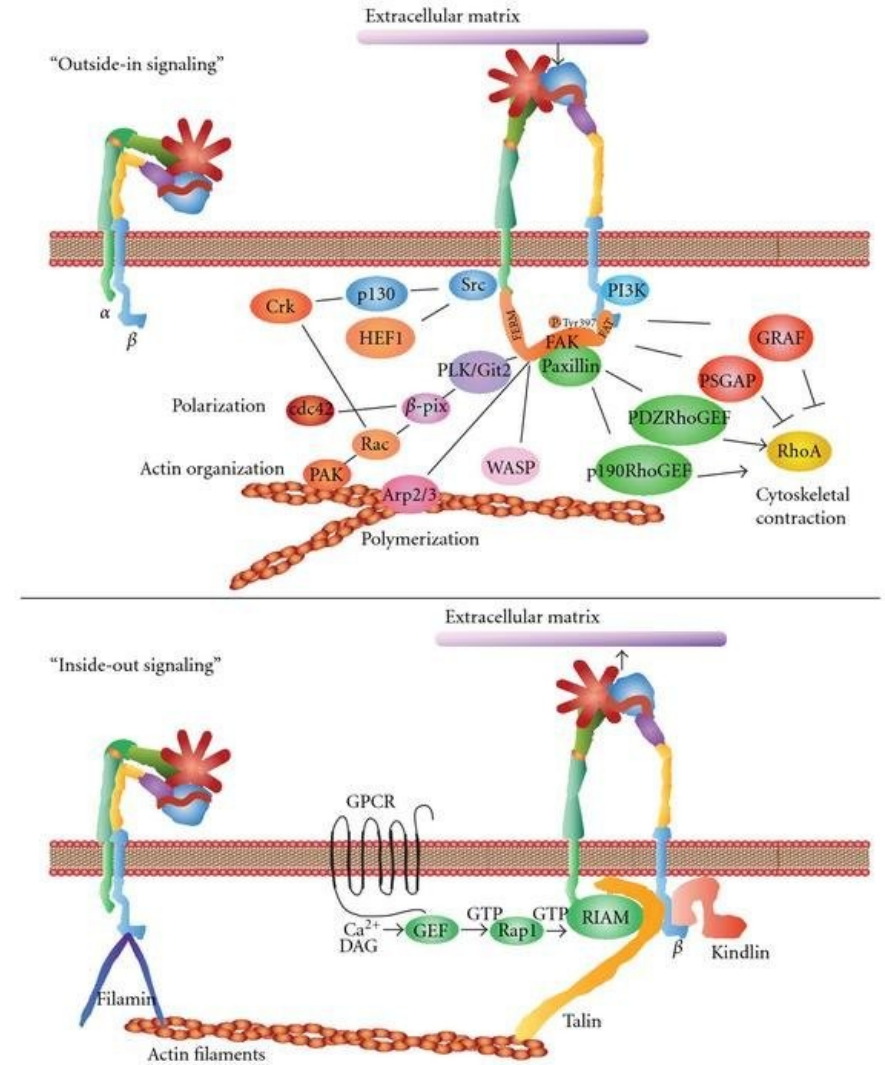
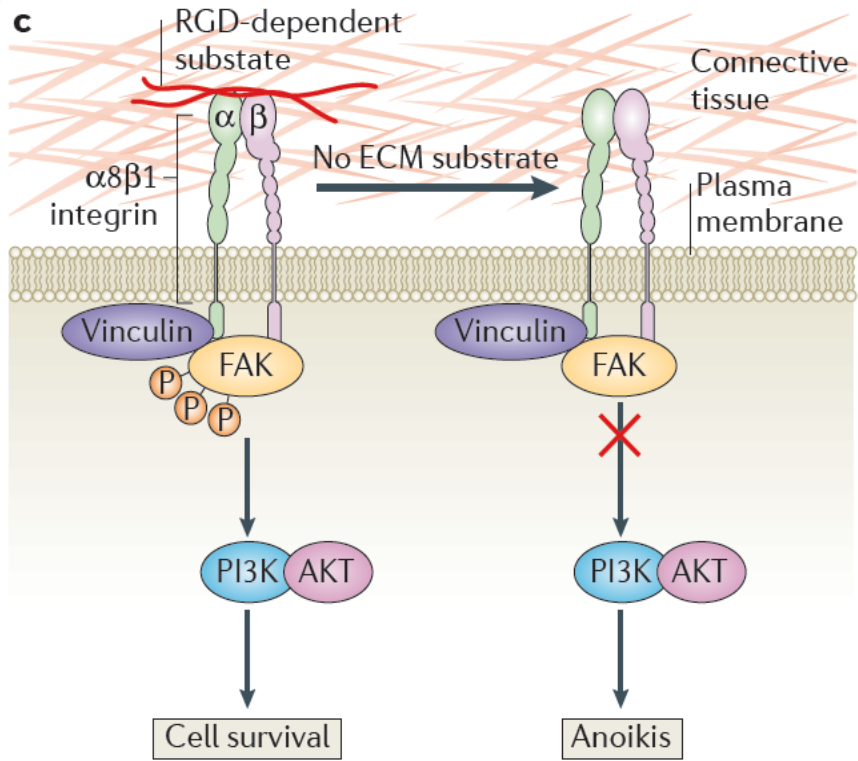


# Anoikis

- Pokud se buňka oddělí od epitelu (nebo od ECM), je potenciálně nebezpečná – ztrácí důležitou regulační složku (basální laminu/ECM).
- Proto existuje **anoikis** = programovaná buněčnou smrt, pokud se buňka oddělí od ECM, dochází ke spuštění signální dráhy, která vede k programované buněčné smrti.
- Vazba integrinů na složky ECM zabraňuje Anoikis – stále neznámý mechanismus.



# Integriny - Signalling



## ECM receptory - závěr

- Znat základní složky ECM
- CO se stane, když některá složka ECM chybí.
- Vědět co jsou to Integriny, jejich strukturu a funkci.
- Jak buňka „vnímá“ kontakt s ECM.
- ANOIKIS – i apoptóza je důležitá v průběhu vývoje.



## ECM – Dotazy?

**Děkuji za pozornost**

Tomáš Bárta  
tbarta@med.muni.cz