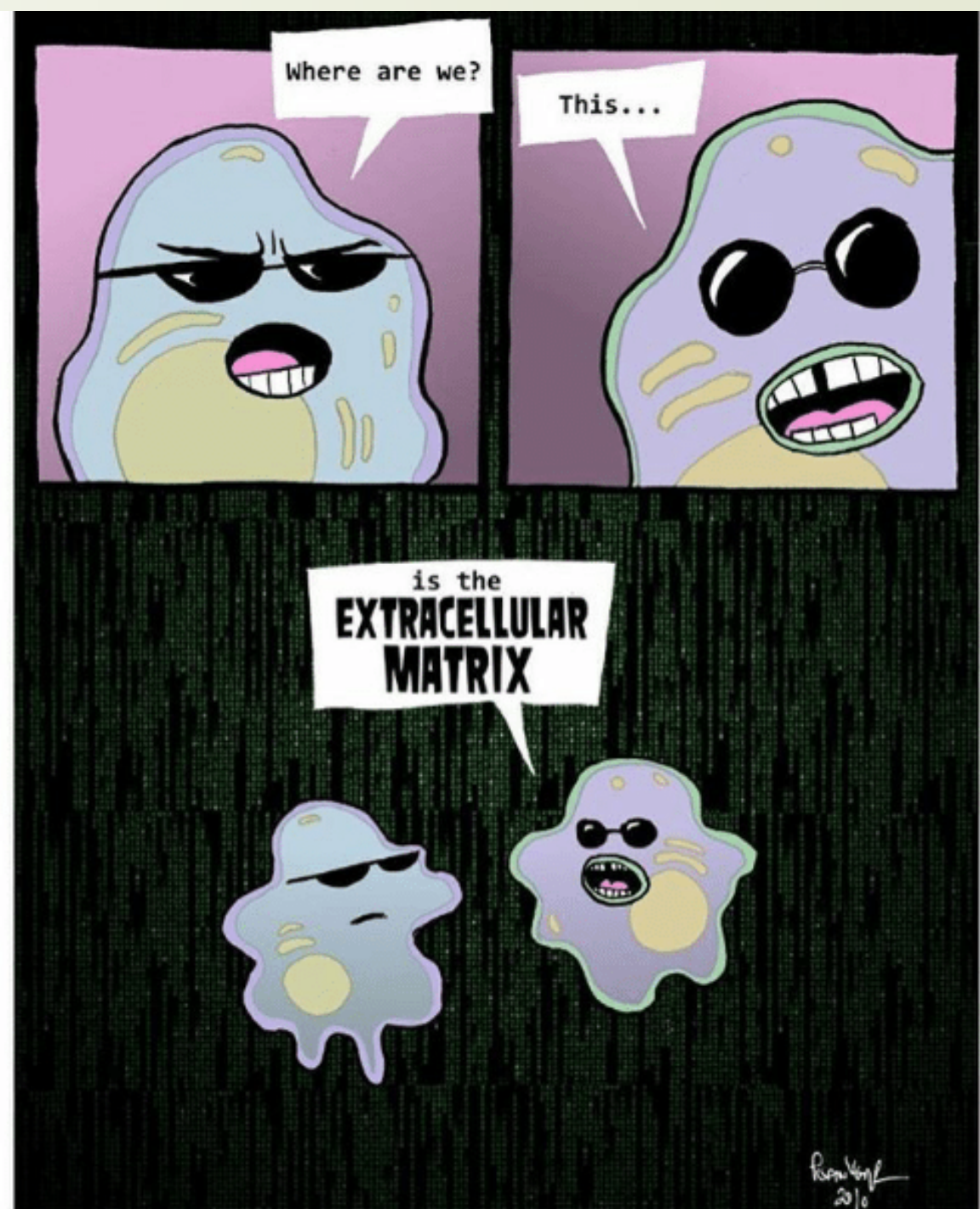


# Úloha extracelulární matrix ve vývoji

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 utvořily tkáň?
- Jak spolu buňky a tkáně interagují, koordinují se, aby utvořily celého jedince?

?

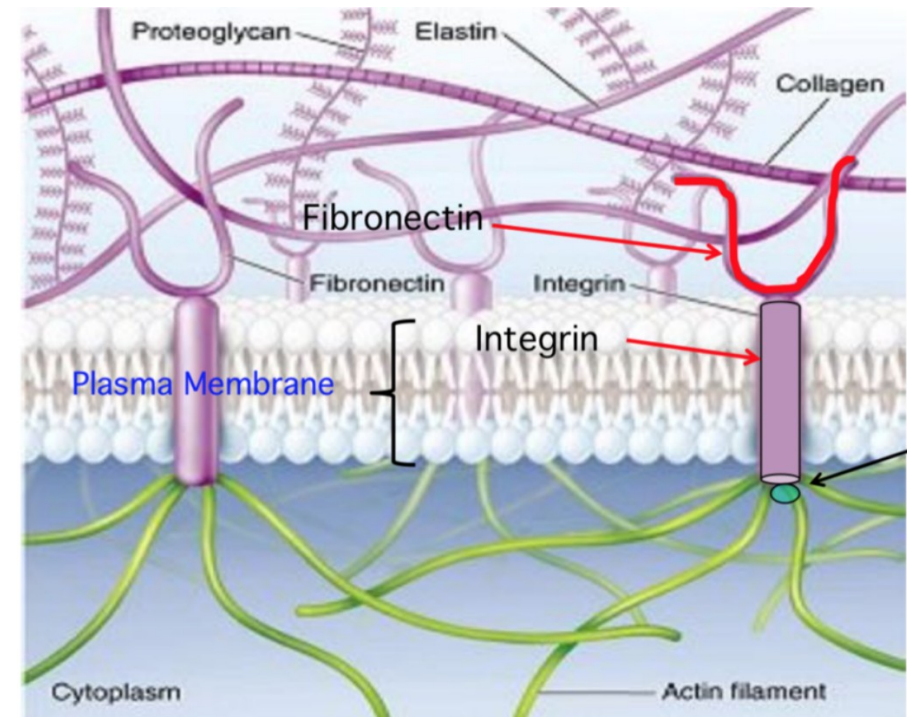
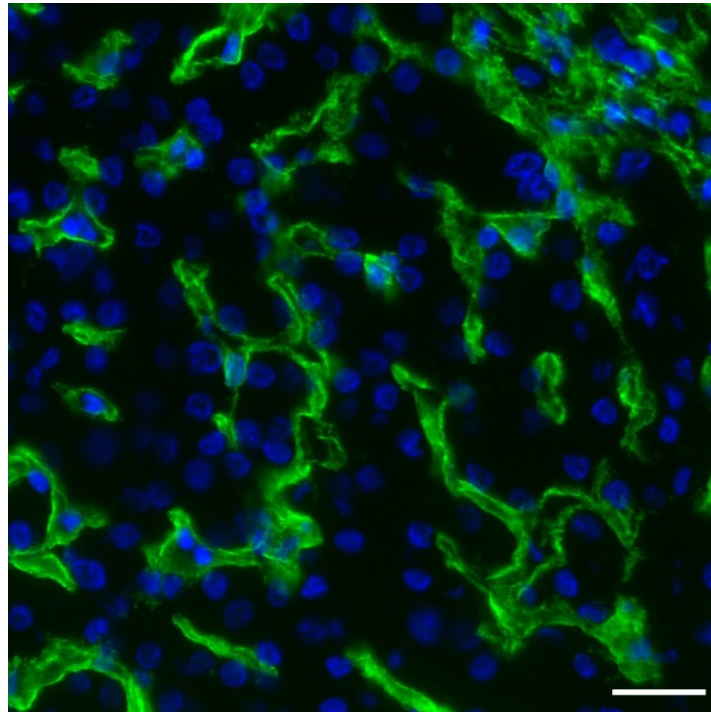
ECM – ExtraCelulární Matrix

## 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.

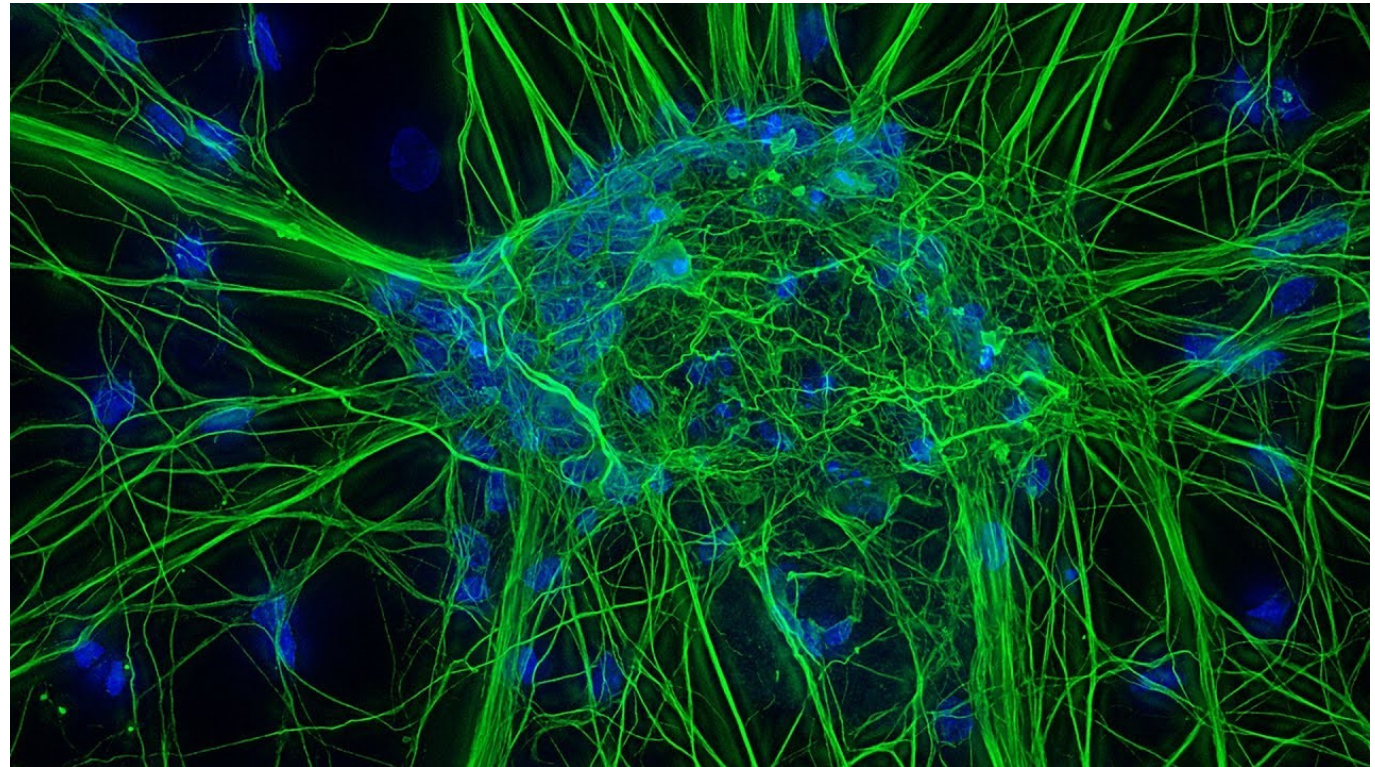
## Úvod - Extracelulární matrix (ECM)

- 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).

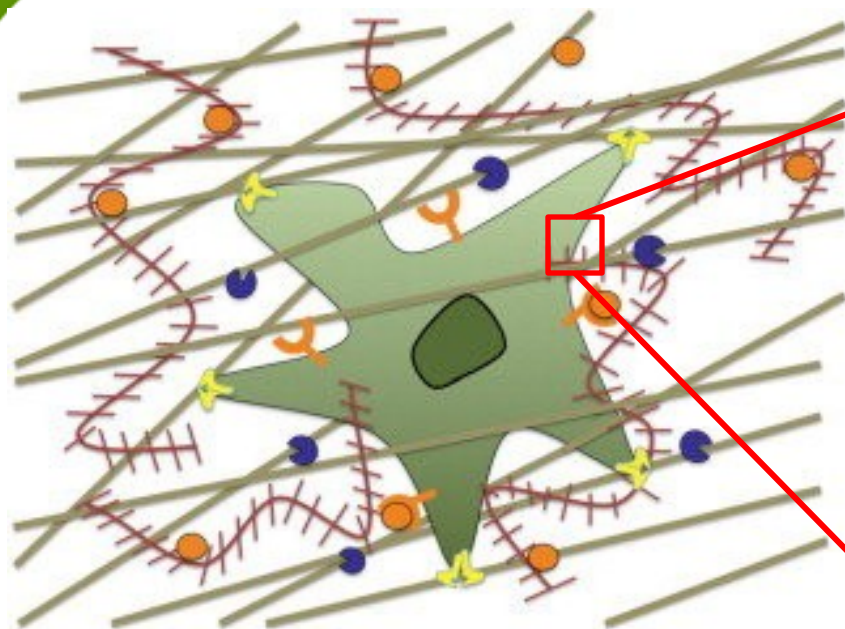


## Úvod - Extracelulární matrix (ECM)

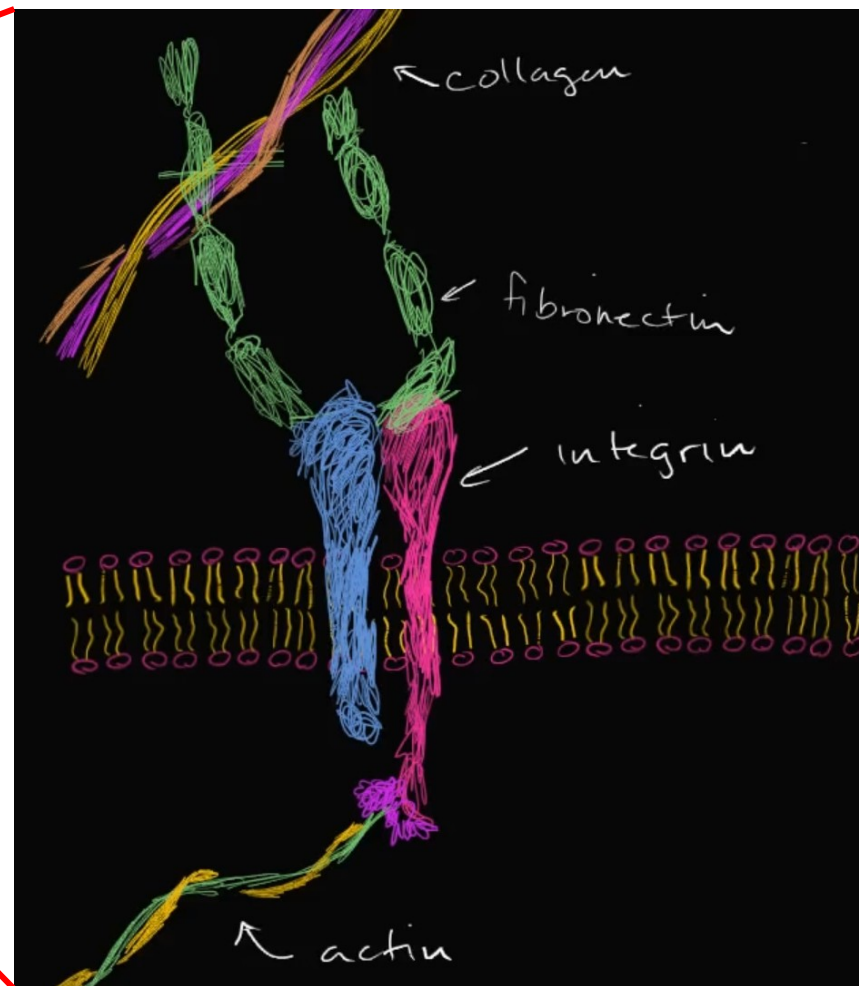
- Všechny komponenty ECM napomáhají přichycovat buňky a strukturovat buňky do tkání.
- **Ale také dávají buňkám signál, kdy růst, kdy se dělit, kdy produkovat určité molekuly a dokonce i kdy umřít.**



# Extracelulární matrix (ECM)

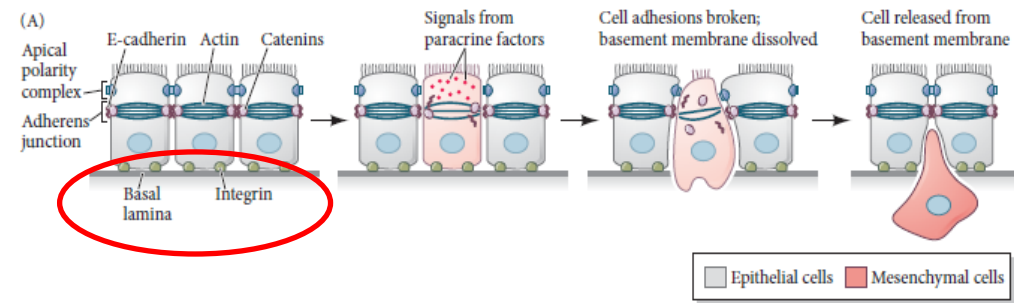
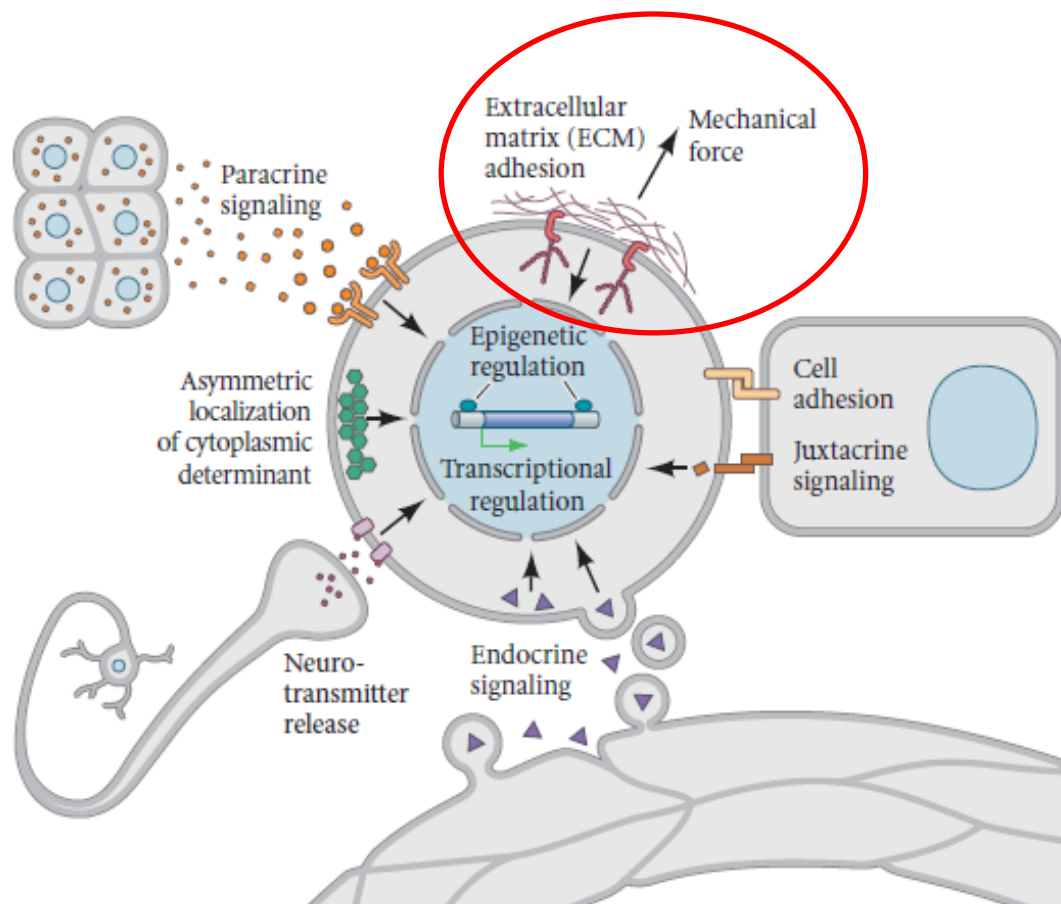


- Glykoproteiny
- Proteoglykany
- Vláknité proteiny
- Polysacharidy
- 
- 
- 
- 
- Nejvíce zastoupen je Kolagen (~30% všech proteinů u savců)



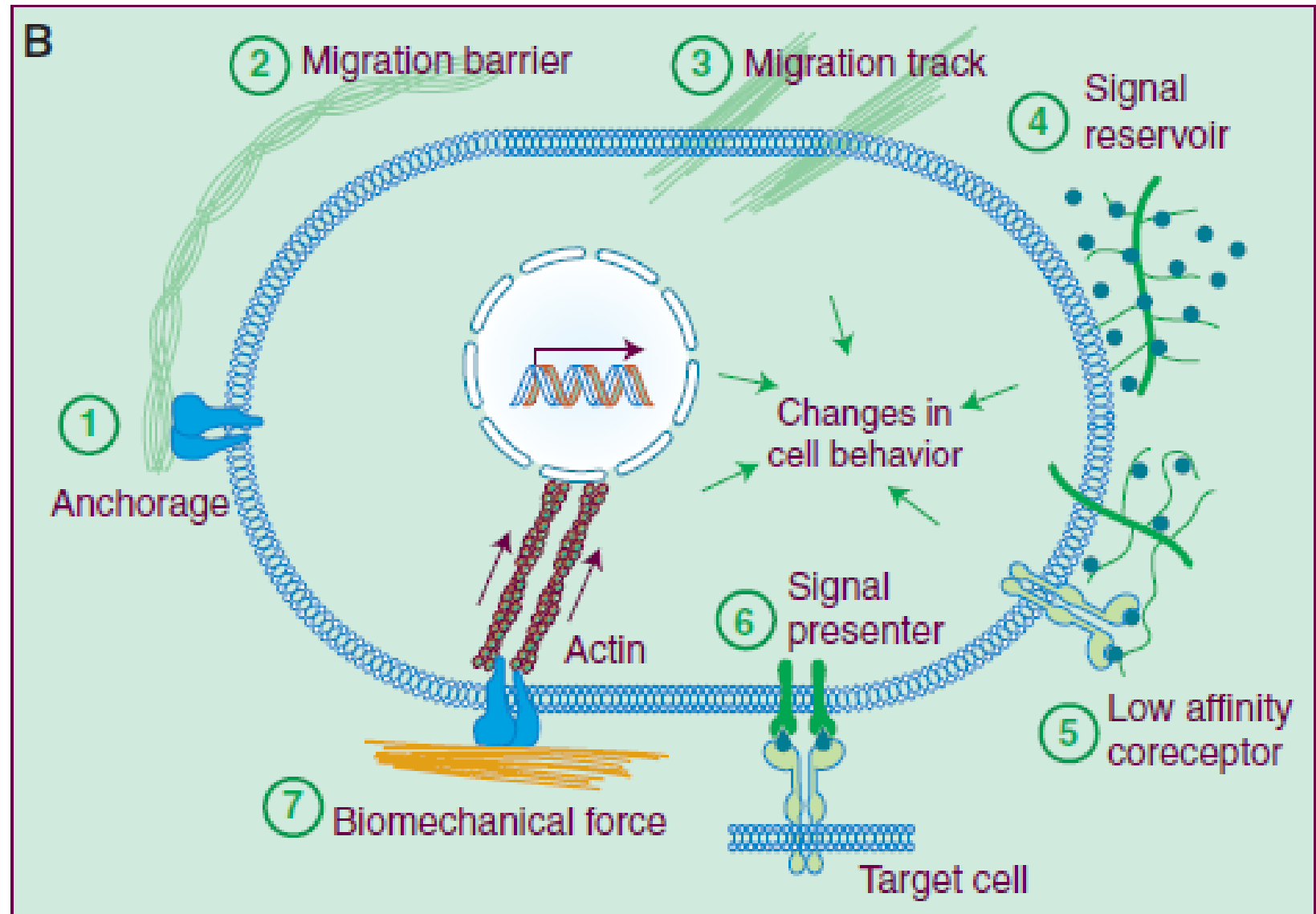
Integriny „propojují“ cytoskelet s ECM

# 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**

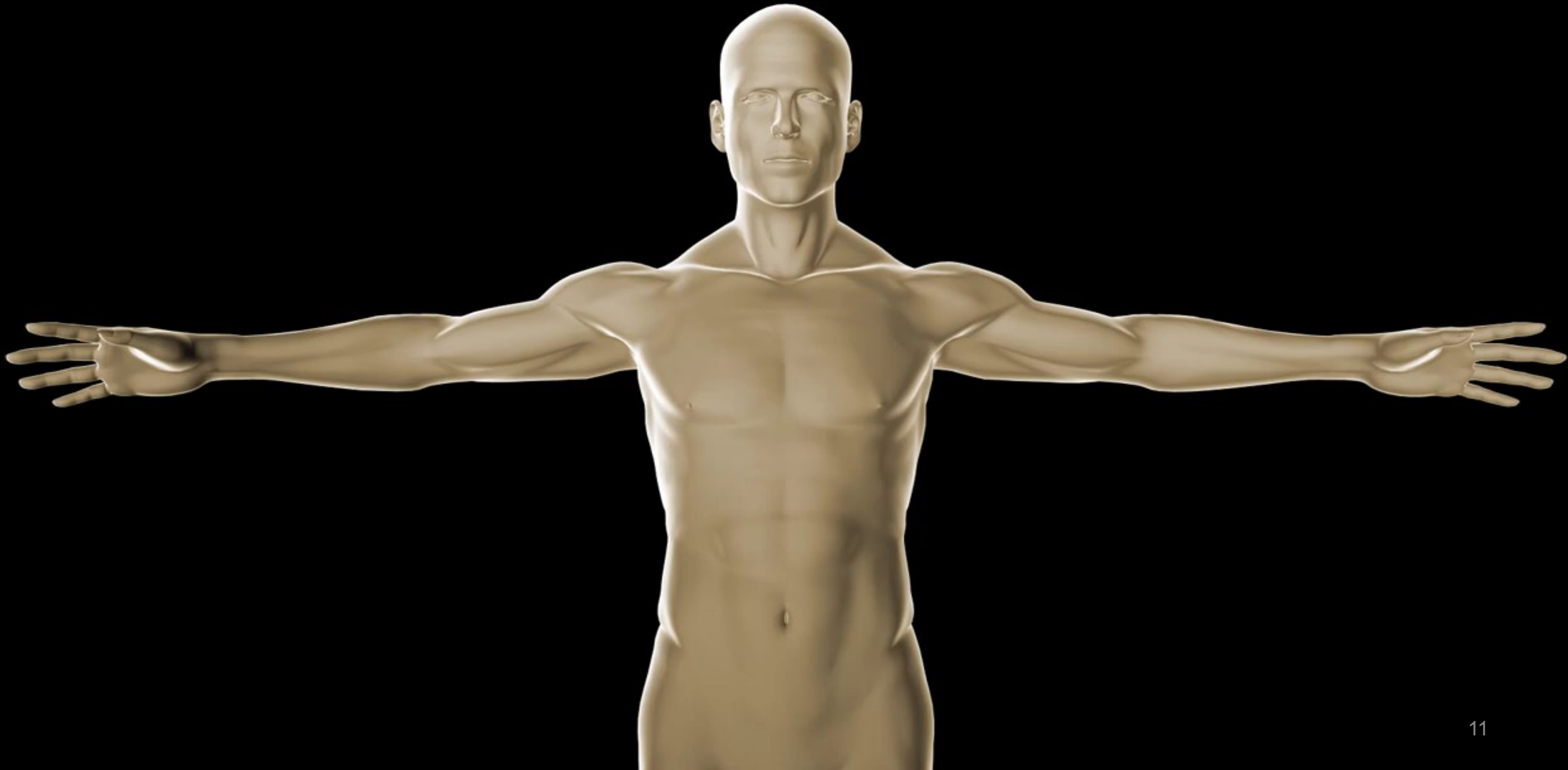
- controls spatial distribution of ECM-bound surface molecules
- facilitates crosstalk between growth factor receptors and ECM receptors

**Sequesters and stores growth factors**

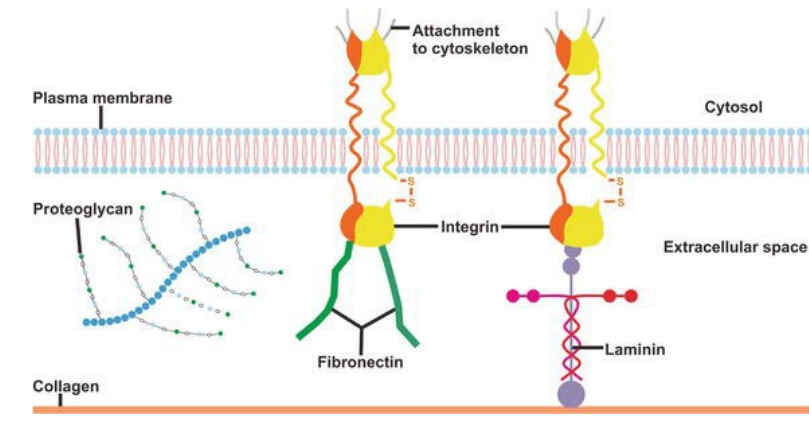
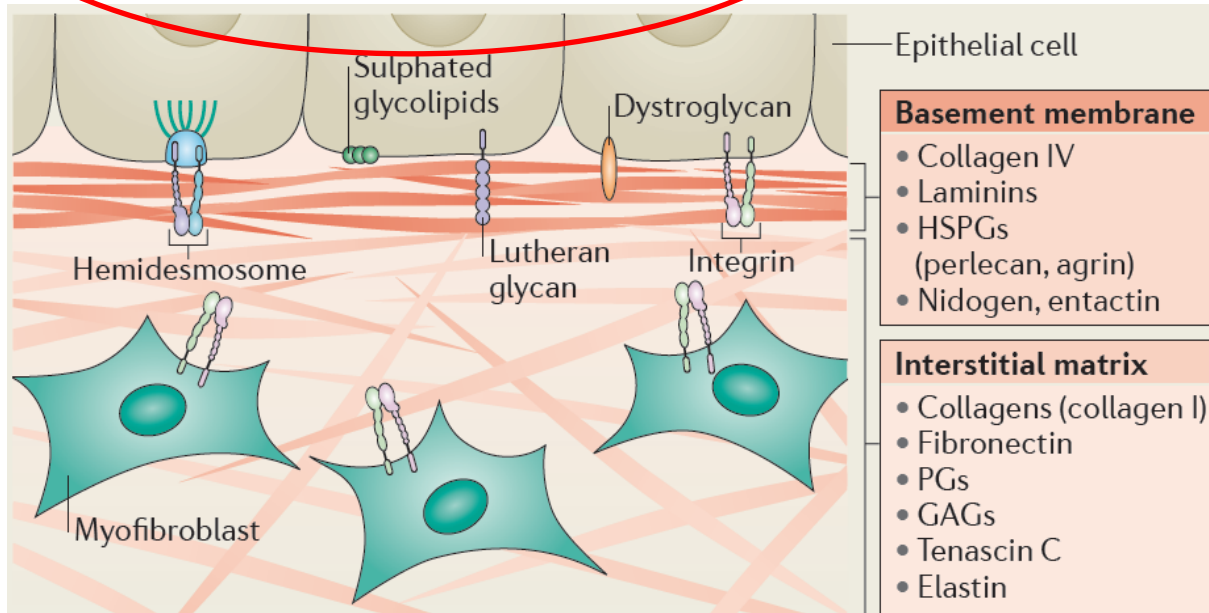
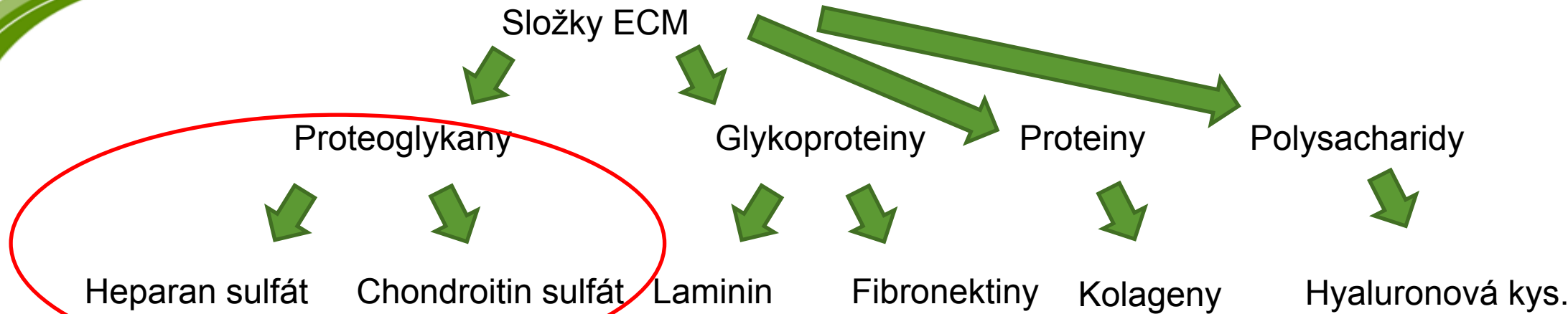
- allows for spatio-temporal regulation of factor release
- organizes morphogen gradients
- mediates release of factors in the presence of appropriate cell-mediated forces or proteolytic degradation

**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

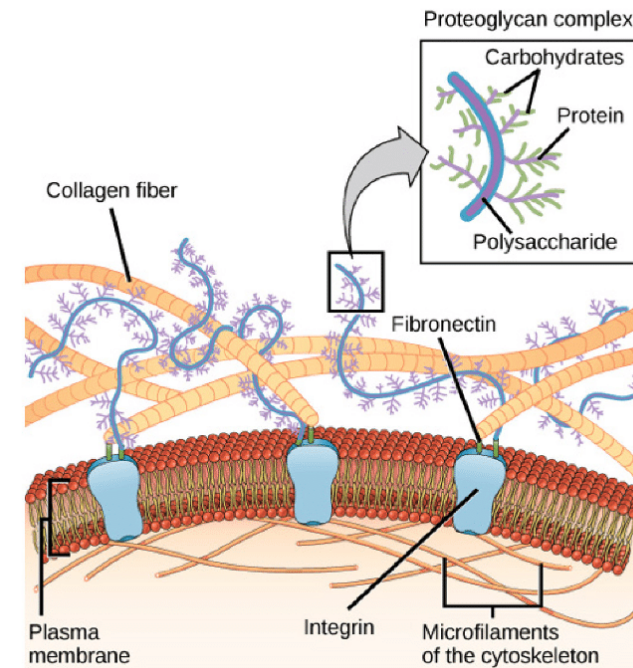
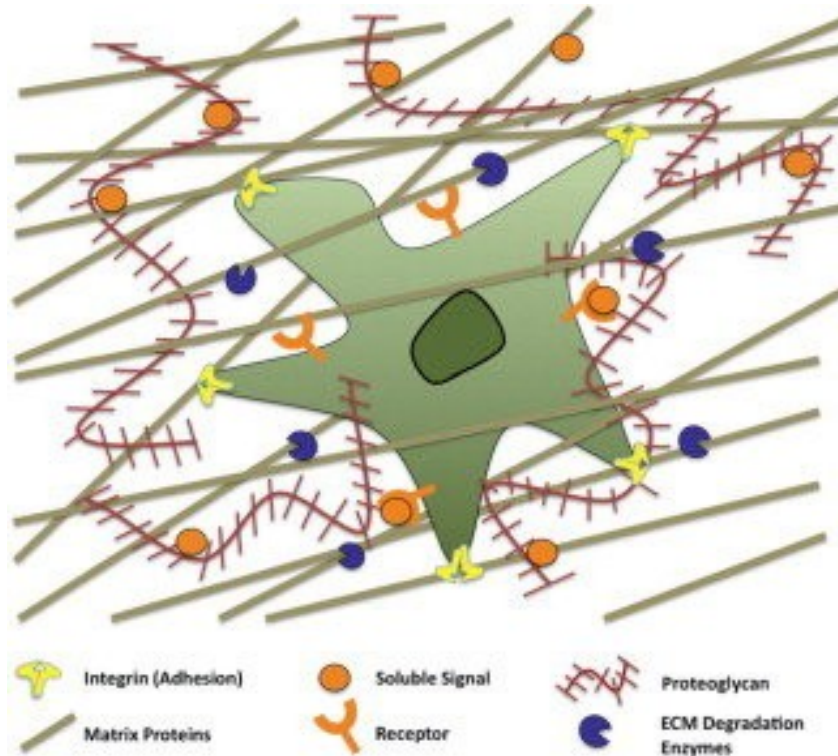


# Složky ECM – jak se v tom vyznat?



## Složky ECM - Proteoglykany

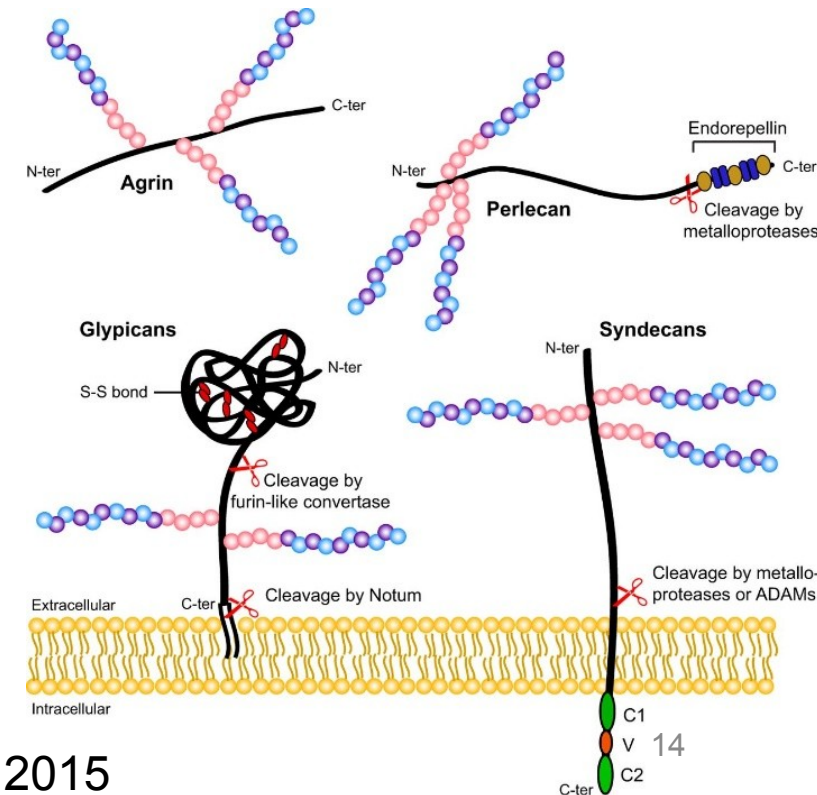
- Klíčová úloha při transportu parakrinních signálů.
- Velké molekuly, které se skládají z centrálního proteinu a kovalentně vázané polysacharidové řetězce.
- Příkladem mohou být: Heparan Sulfát, Chondroitin Sulfát.



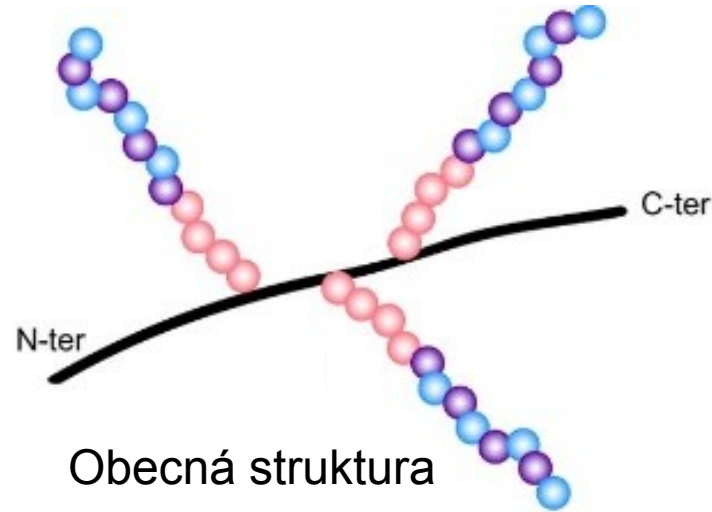
# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát (HS)

## Heparan sulfát (HS)

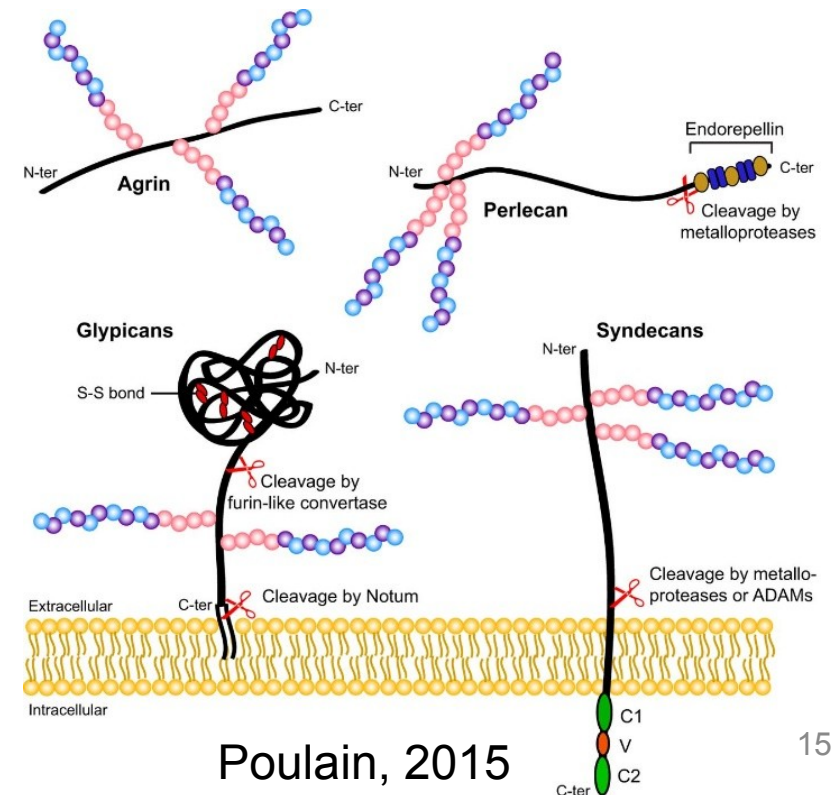
- ▶ Lineární polysacharid, který se vyskytuje ve formě proteoglykanu (protein s kovalentně navázanými řetězci HS) – téměř ve všech živočišných tkáních
  - ▶ Klíčová úloha při vazbě ligandů na receptory -> bez něj nemusí probíhat vazba!
  - ▶ Mutace, které blokují syntézu Heparan sulfátu způsobují různé 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



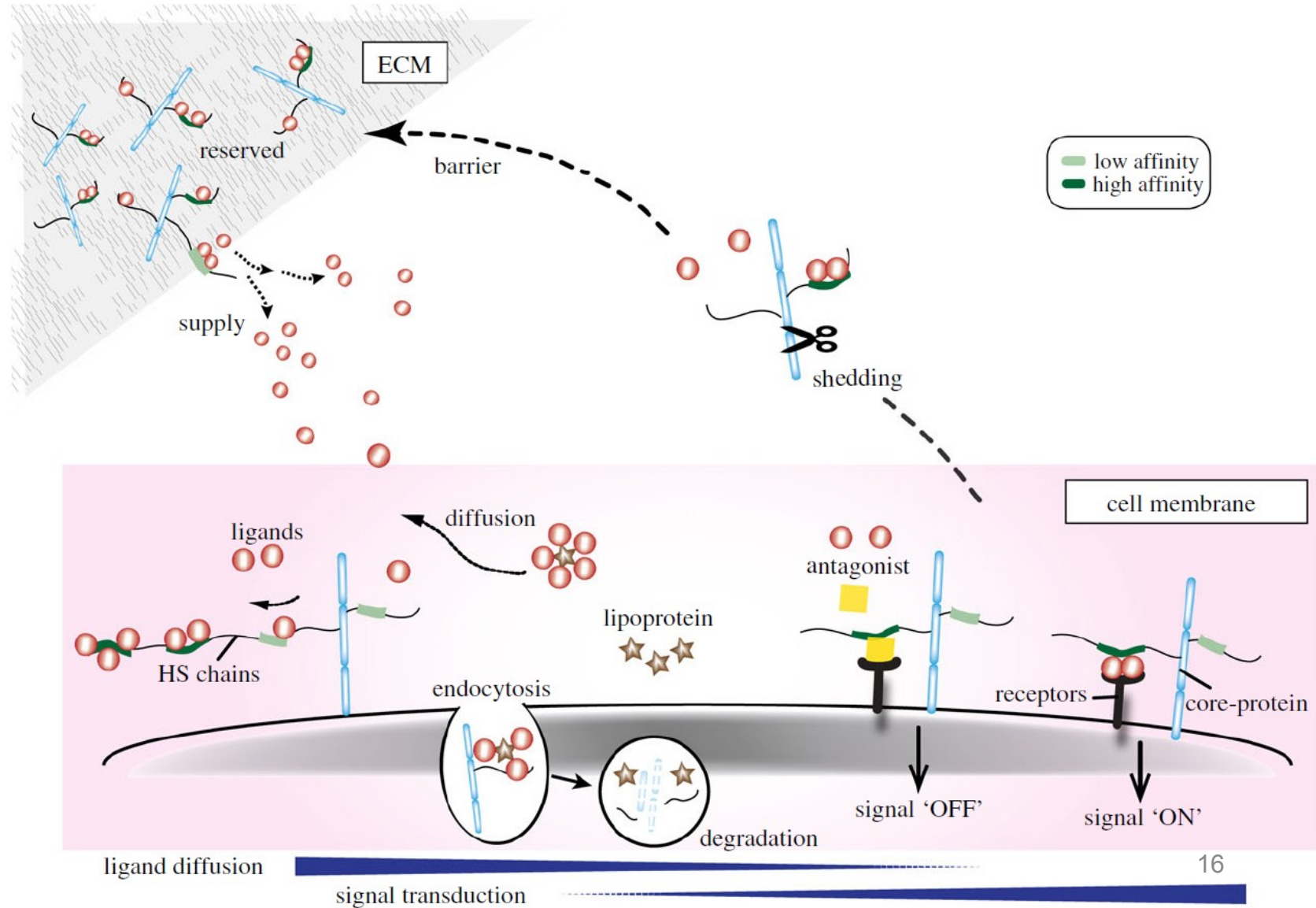
- Proteiny mají různý počet míst pro vazbu sacharidu
- Některé ještě navíc mohou obsahovat chondroitin sulfát
- HS je syntetizován v Golgi aparátu



Poulain, 2015

# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát - funkce

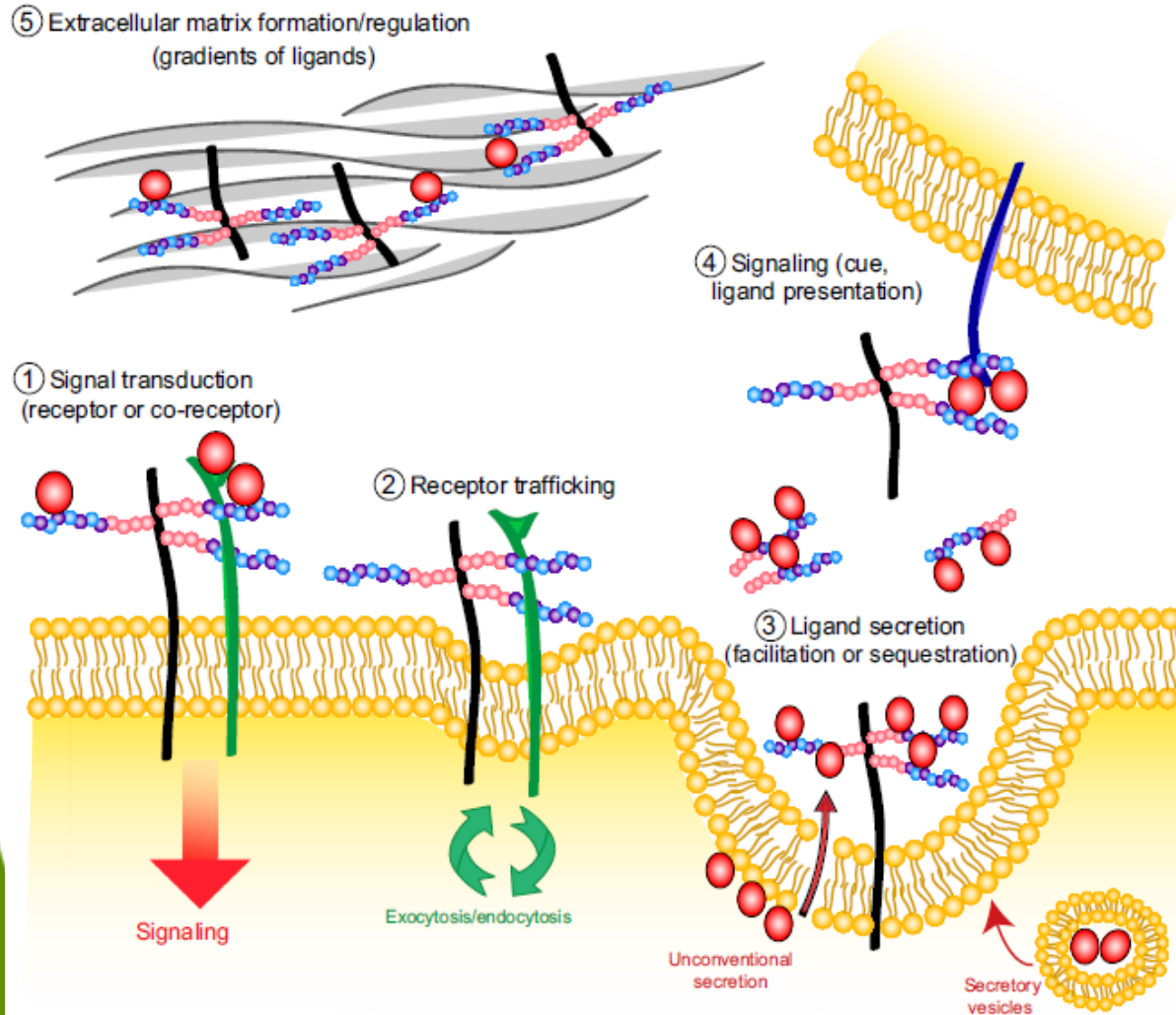
## Funkce





# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát - funkce

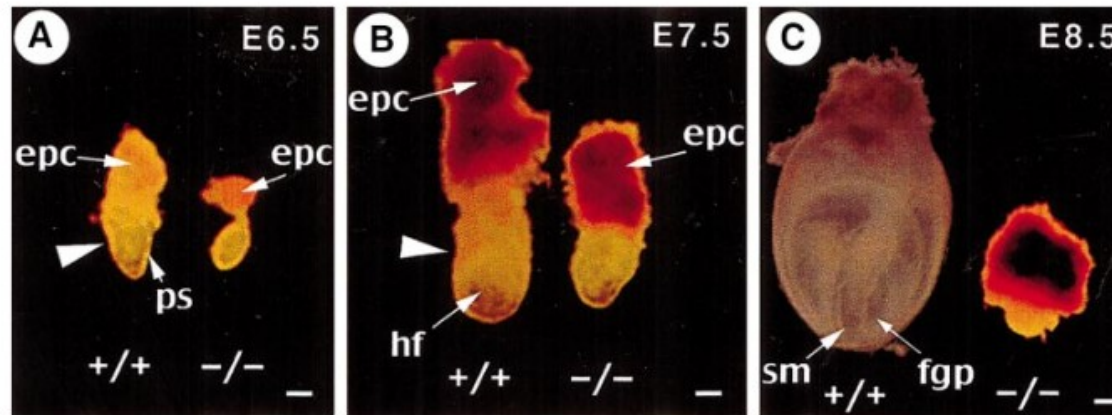
## Funkce



- 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

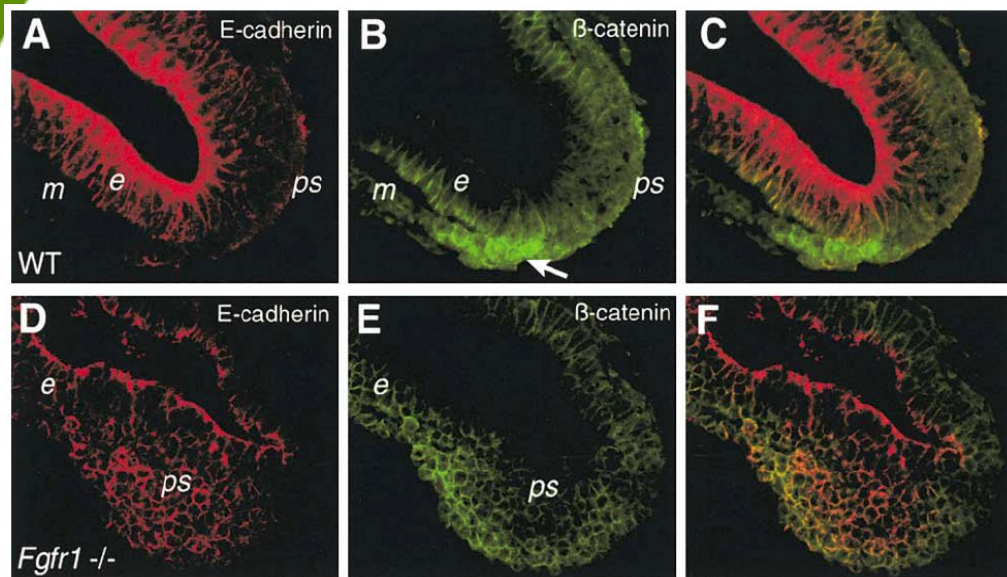


Lin et al., 2000

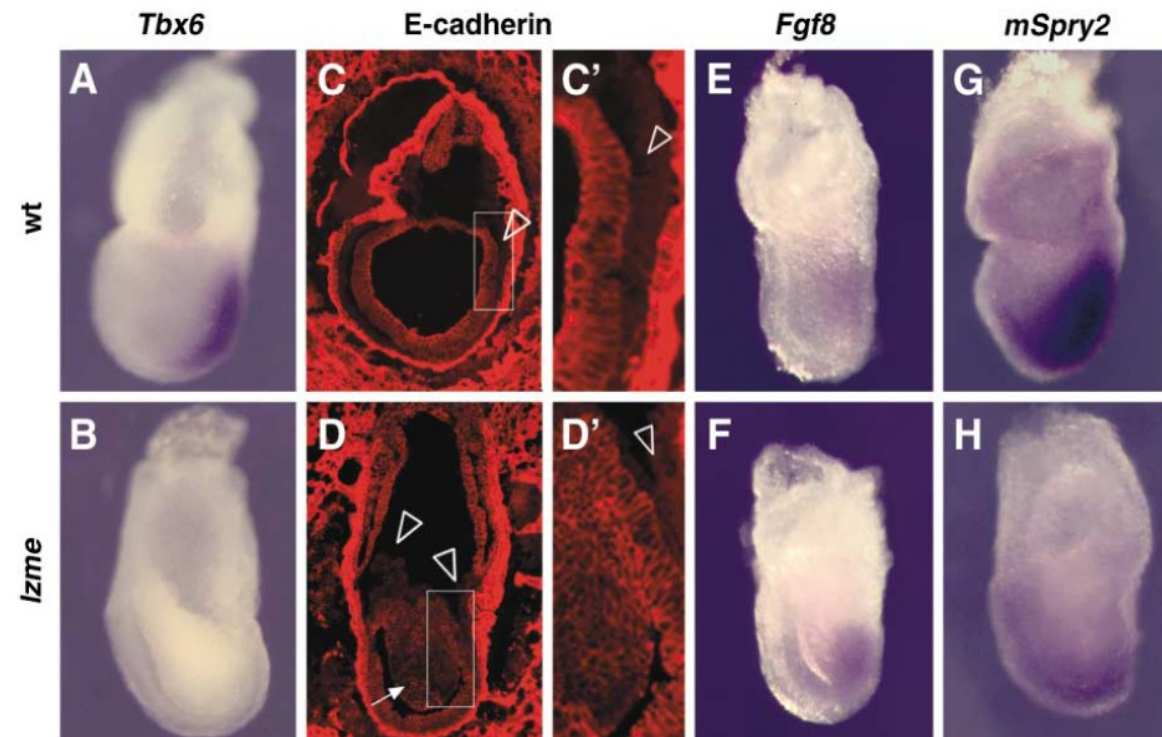
This defect is due to a failure in the production of heparan sulfate to which Hedgehog binds and uses as part of its diffusion mechanism

# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

➤ Návaznost na předchozí přednášku



Ciruna and Rossant, 2001



Garcia-Garcia and Anderson, 2003

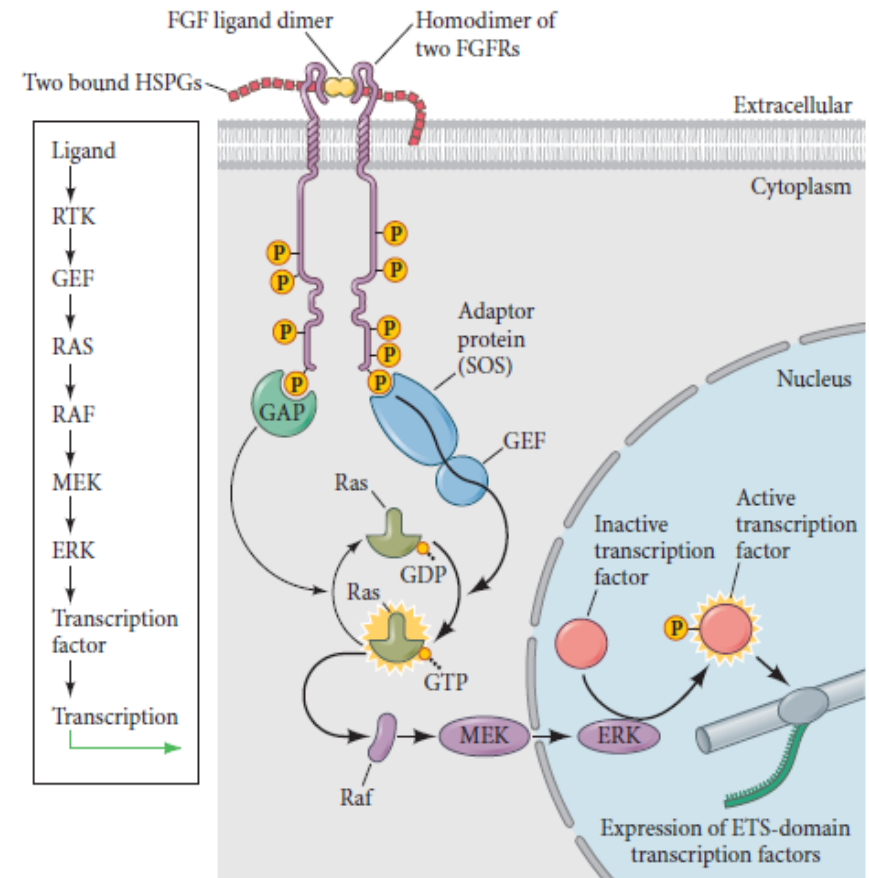
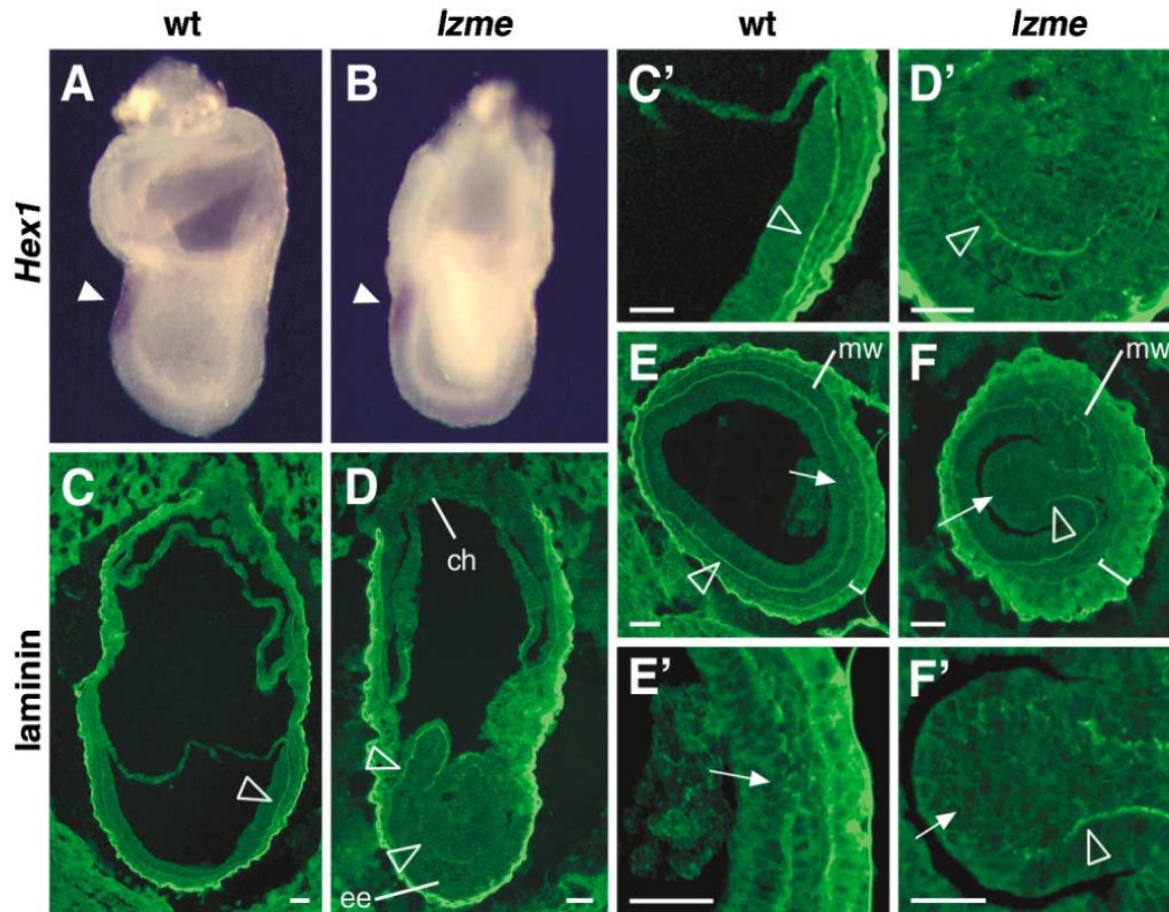
➤ => Heparan sulfát je klíčový pro FGF signaling

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

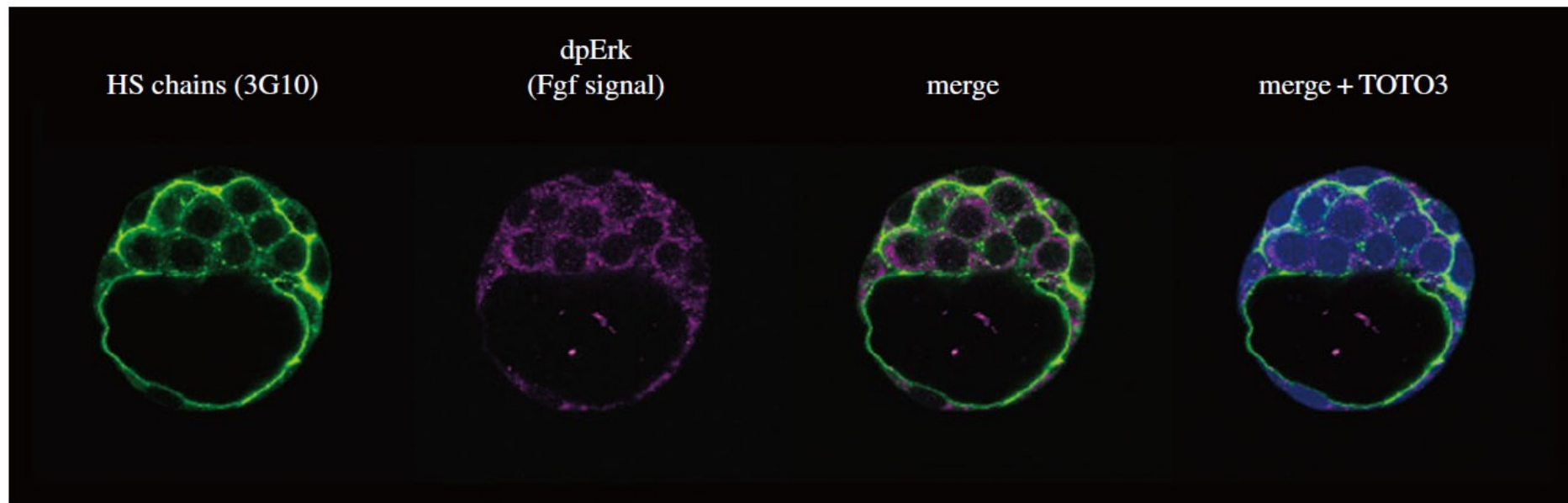
**Bez Heparan sulfátu nebo FGF signalingu nemigruje mezoderm**

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

# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát



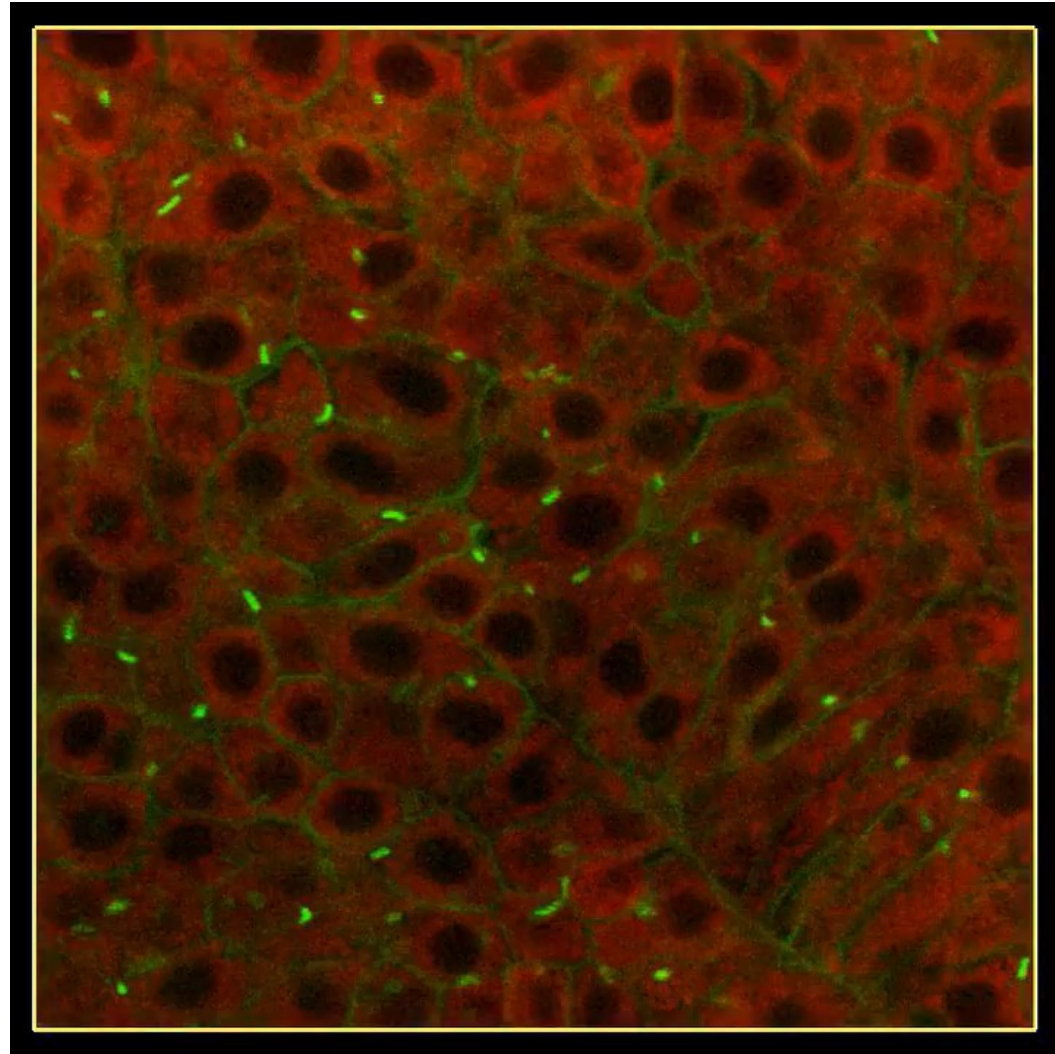
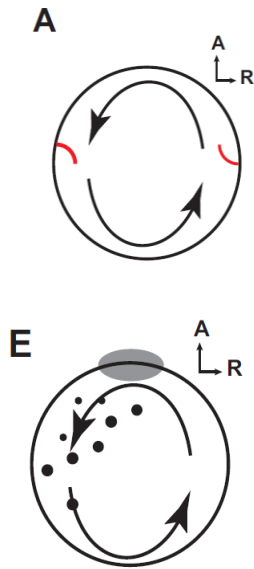
## Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát



# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

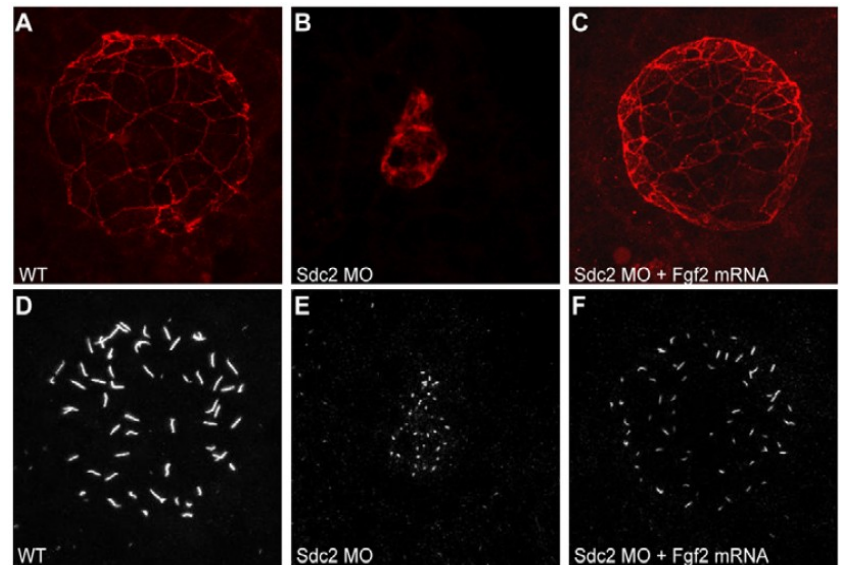
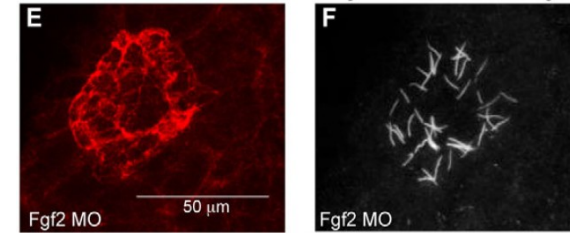
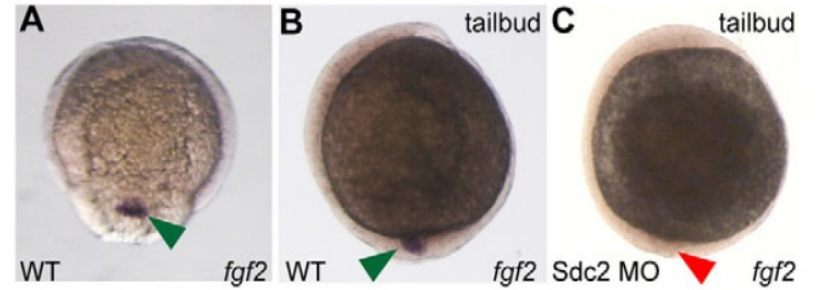
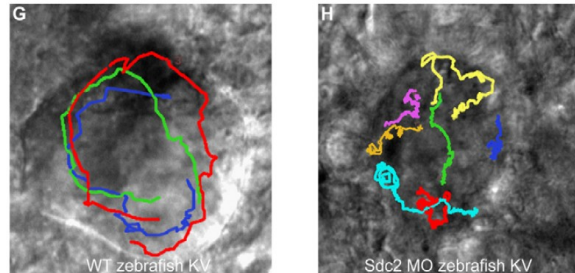
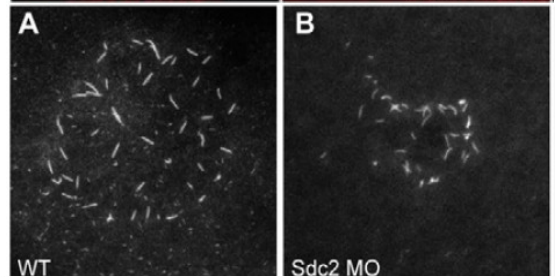
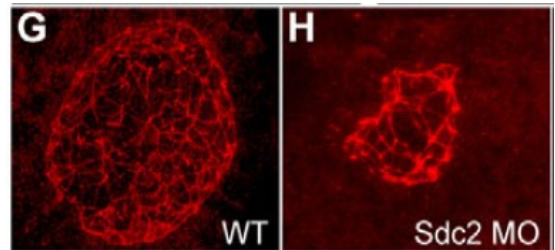
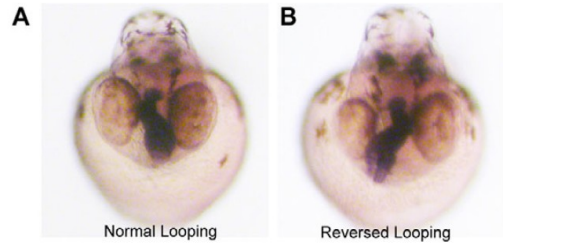
Pravo-levá symetrie

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



# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

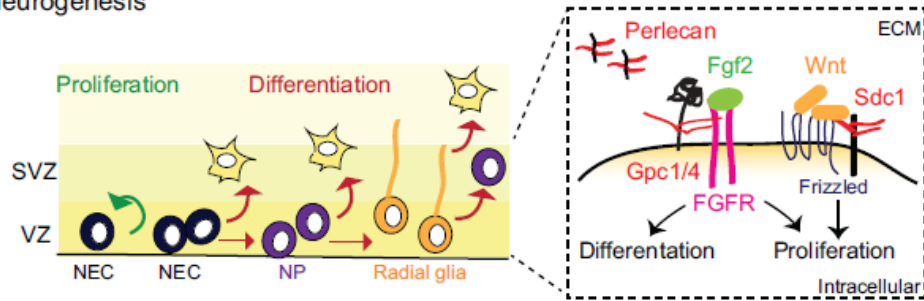
## Pravo-levá symetrie – Sdc2 MO



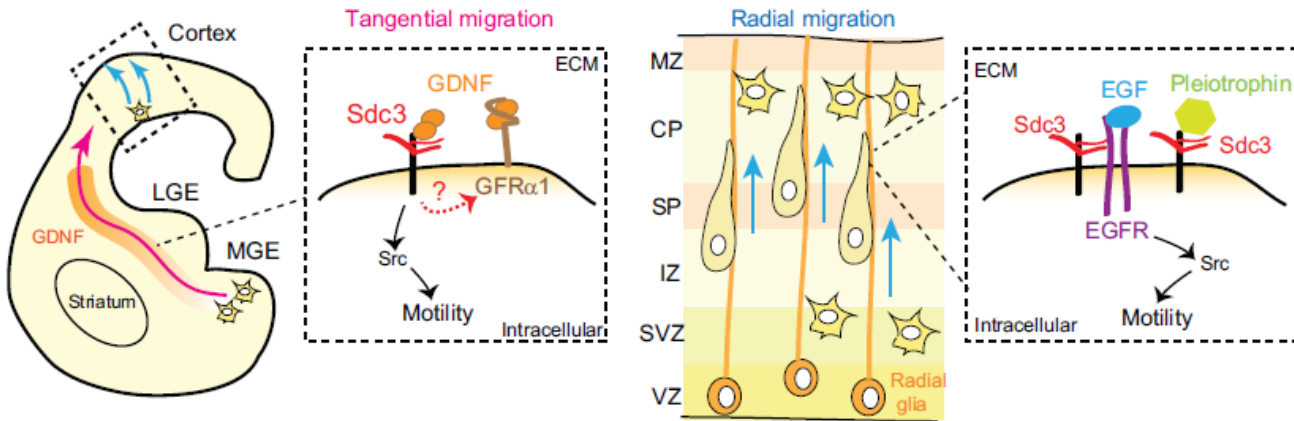
Arrington et al., 2013

# Složky ECM – Proteoglykany – Heparan sulfát

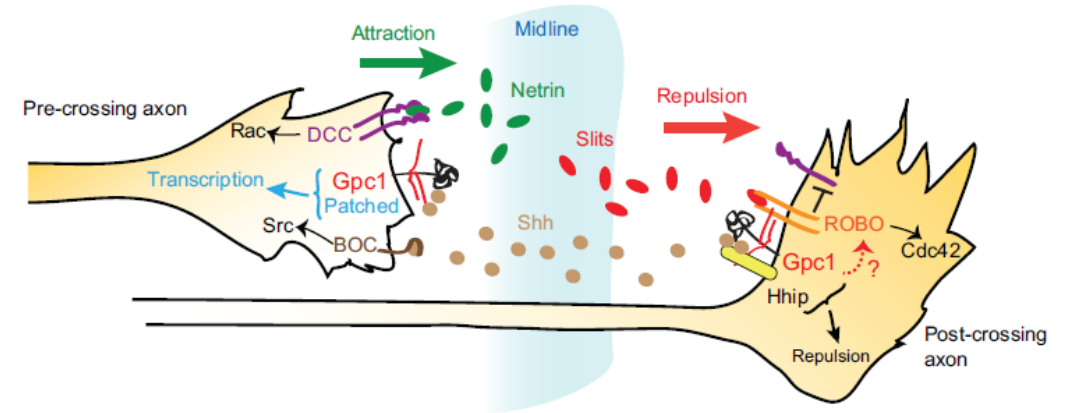
## A Neurogenesis



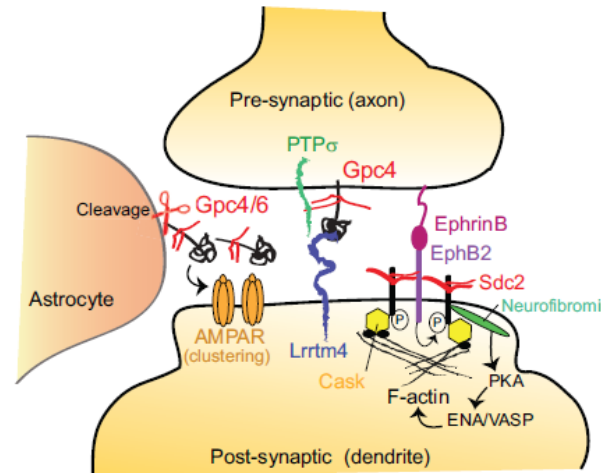
## B Neuronal migration



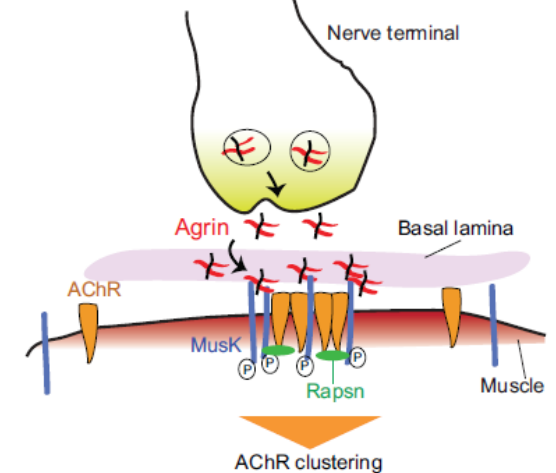
## C Axon elongation and growth cone guidance



## D Synapse formation

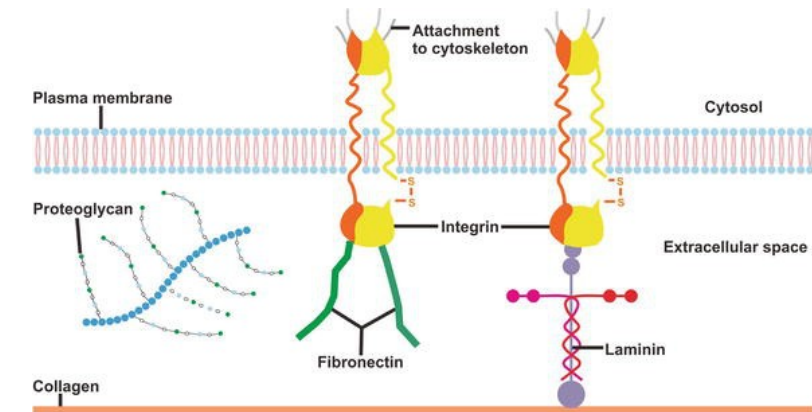
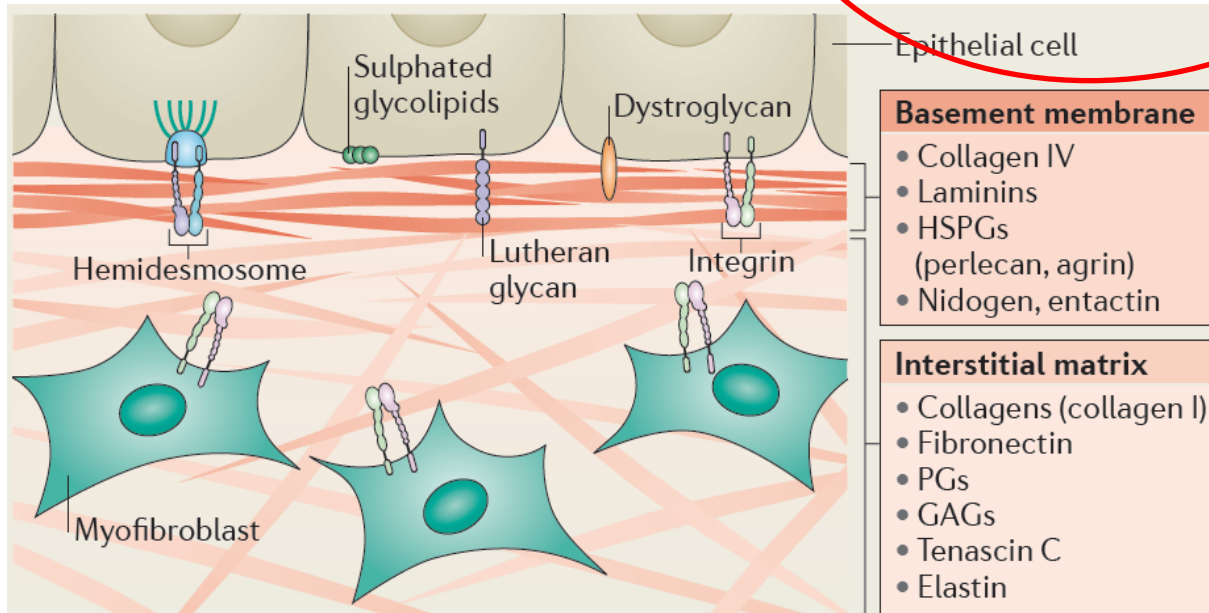
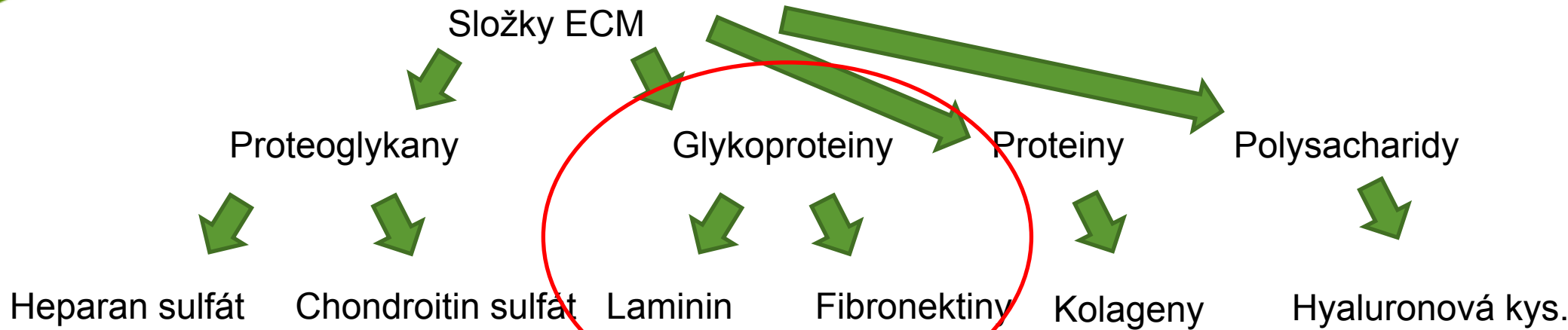


## E Neuromuscular junction



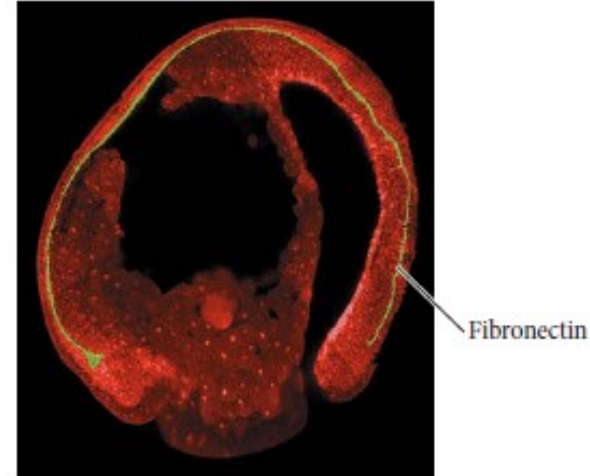


# Složky ECM – jak se v tom vyznat?



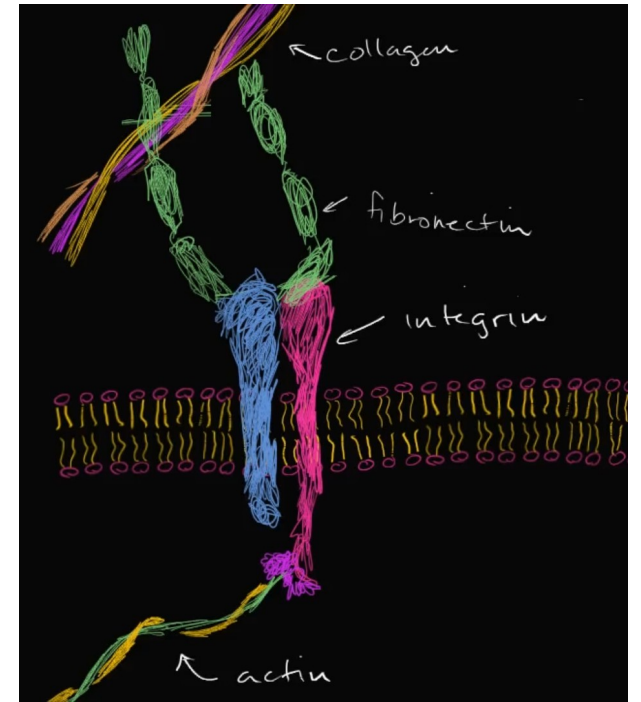
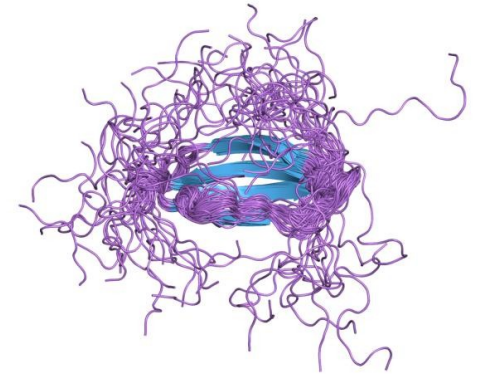
## Složky ECM – Glykoproteiny

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



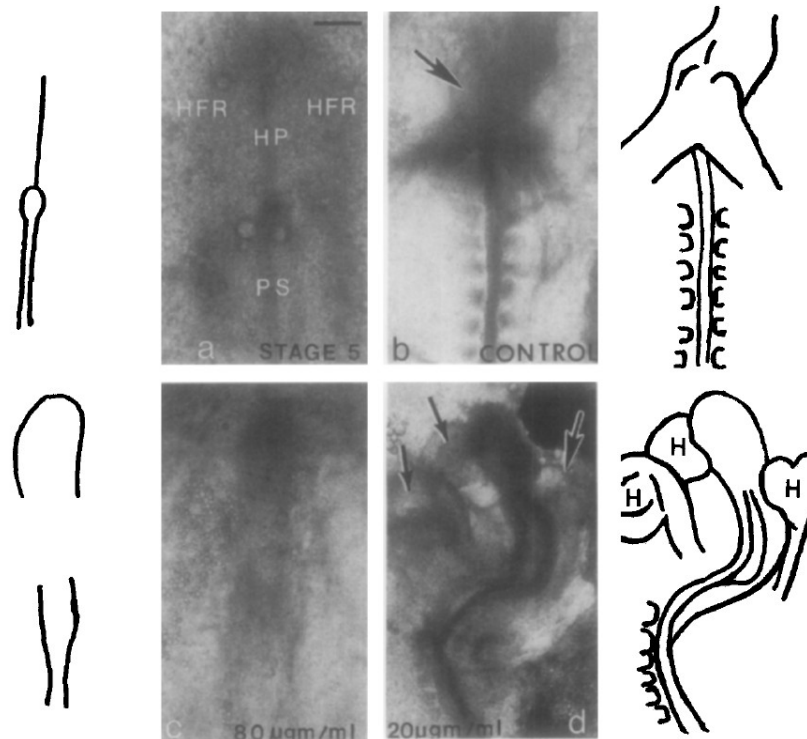
## Složky ECM – Glykoproteiny - Fibronektiny

- Velké glykoproteiny (cca 460 kDa) – heterodimery složené z 2 podjednotek spojených disulfidickou vazbou
- Dvě skupiny fibronektinů:
  - Rozpustný fibronektin (plasmatický – 300  $\mu\text{g/ml}$ ) – 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

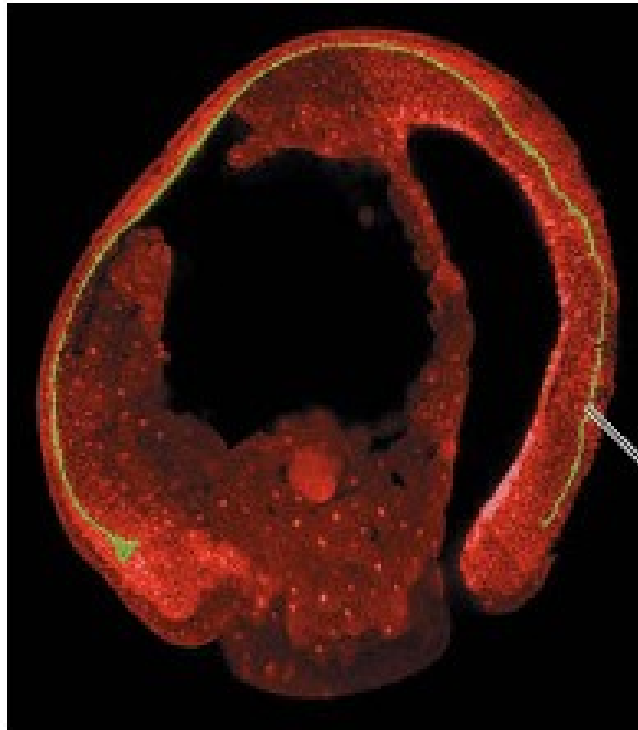
- Důležitá úloha v migraci buněk
  - Fibronektin označuje cesty kudy migrují buňky – např. migrace zárodečných buněk do gonád, migrace srdečních buněk do střední části embrya.



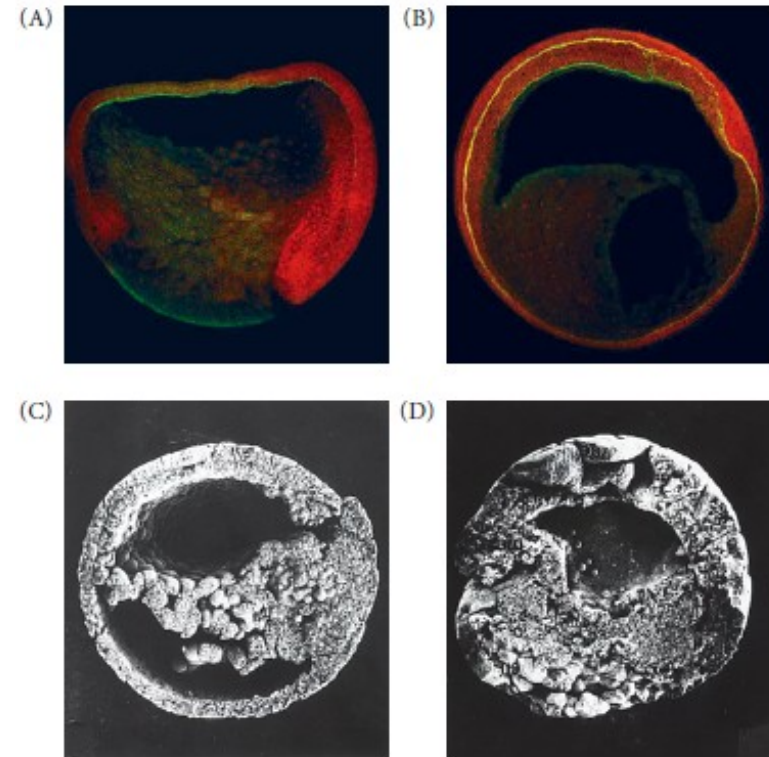
Linask, Lash, 1988

## Složky ECM – Glykoproteiny - Fibronektiny

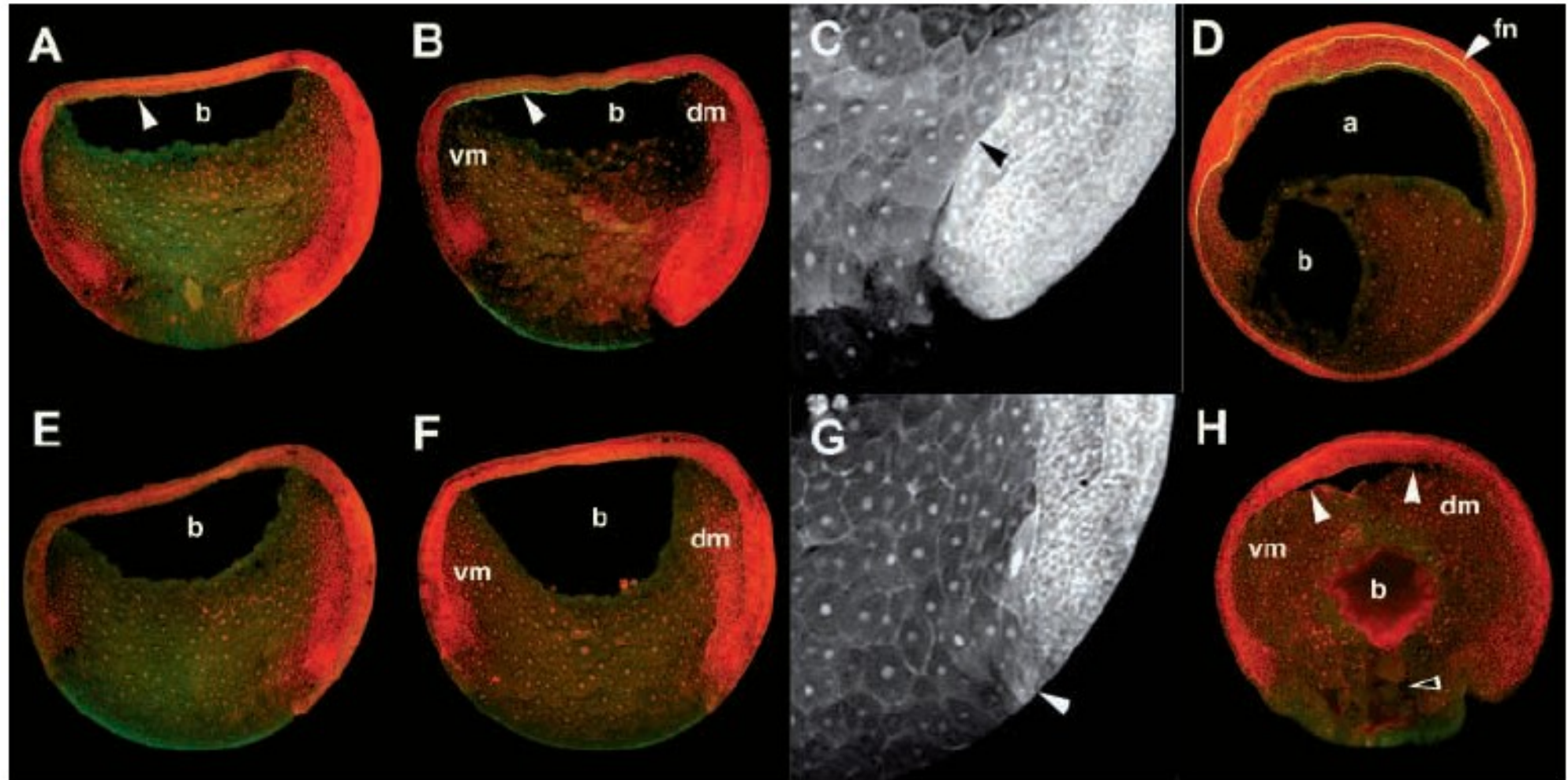
- Důležitá úloha v migraci buněk
  - Fibronektin označuje cesty kudy migrují buňky – v průběhu gastrulace je klíčový pro migraci buněk mezodermu.



Fibronectin

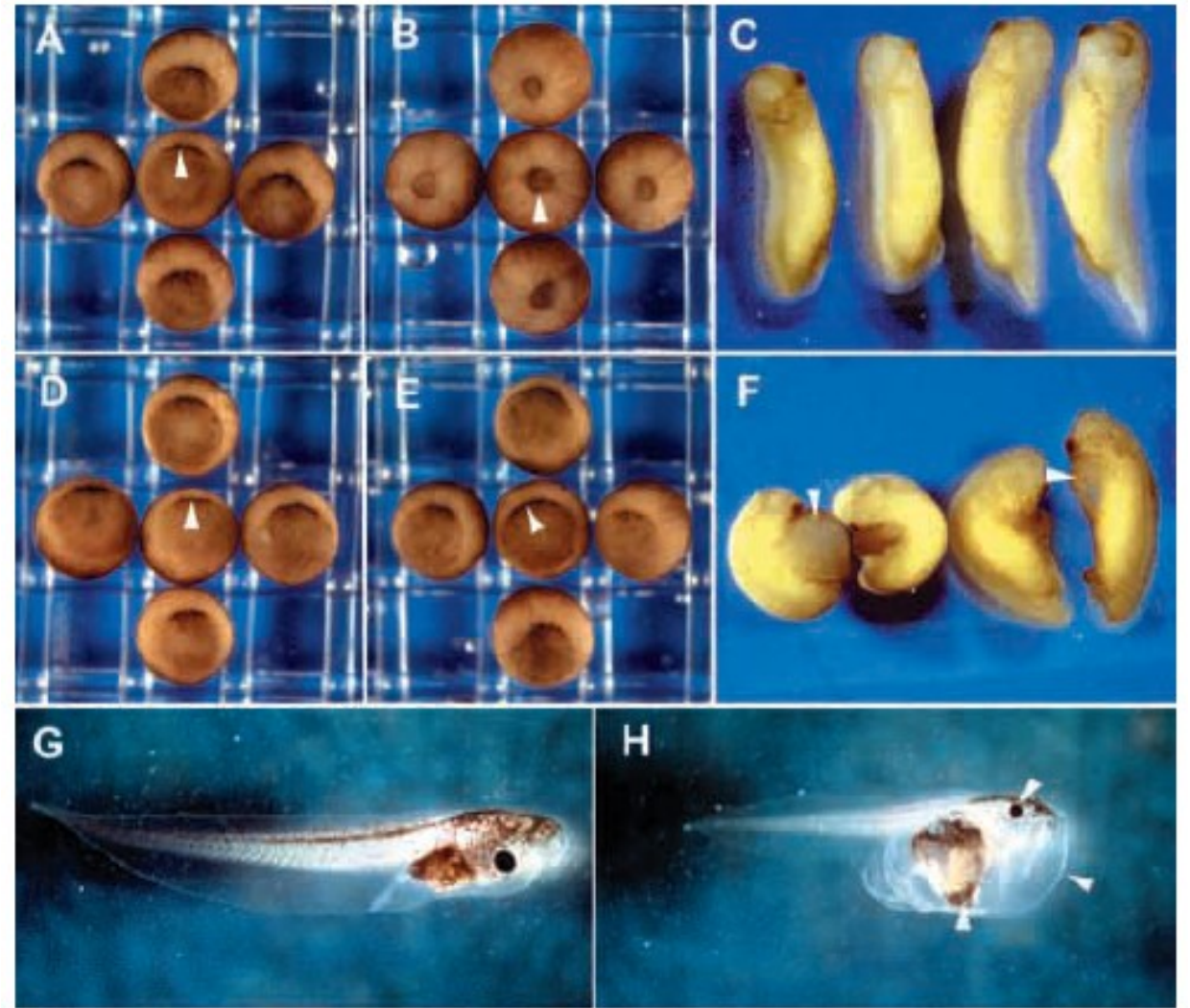


# Components of ECM – Glycoproteins - Fibronectins

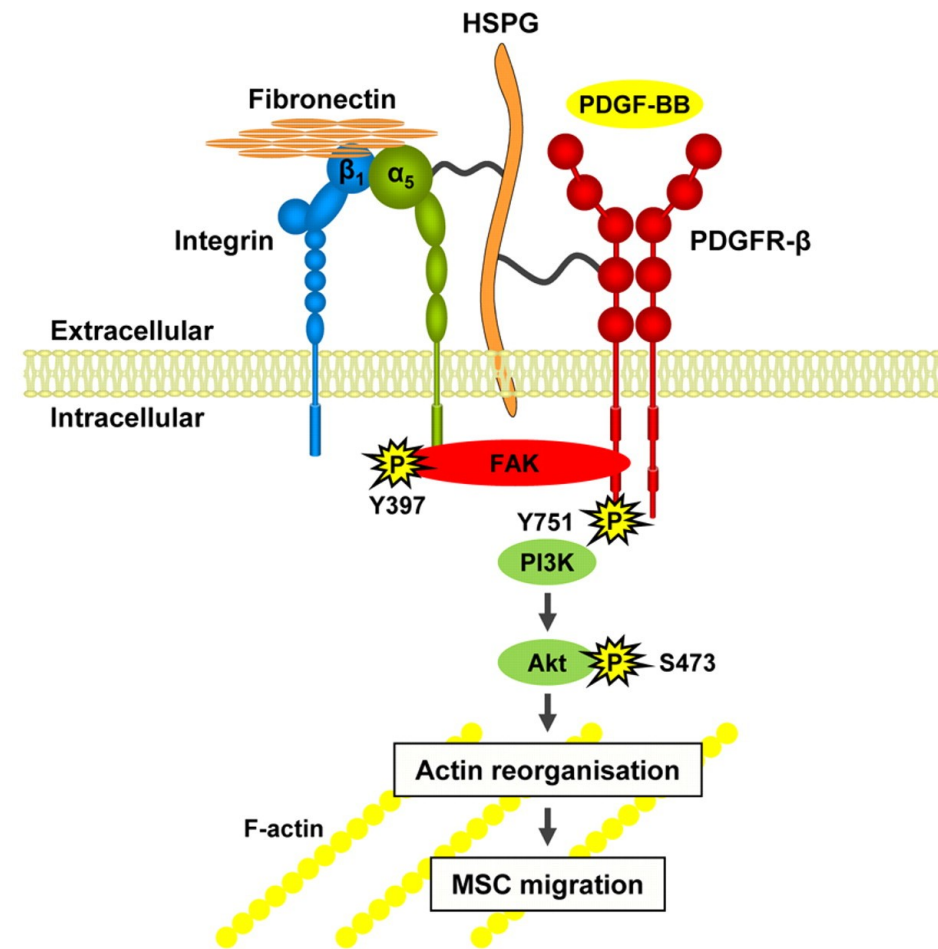
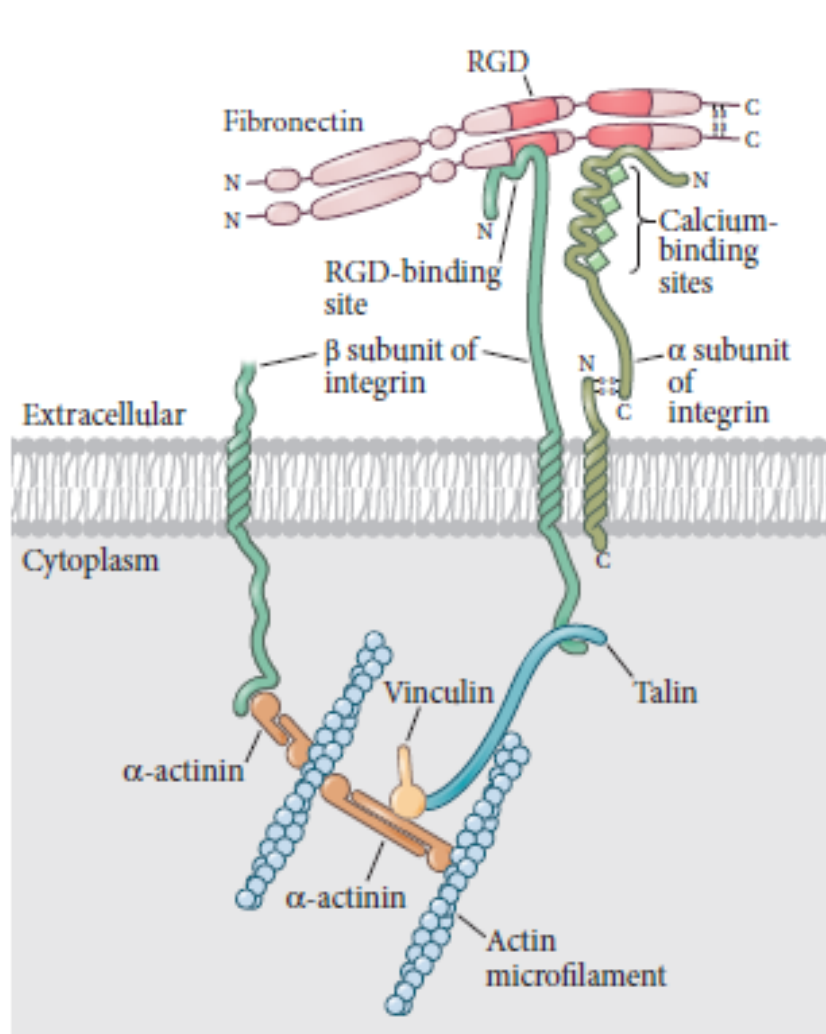


# Components of ECM – Glycoproteins - Fibronectins

Intra-blastocoelar injection of anti-FN mAbs disrupts gastrulation. (A-C,G) Embryos injected at stage 9.5 with mAb 4H2 show normal development at stage 10.5, as indicated by dorsal lip formation (A, arrowhead). (B) At stage 11.5 the blastopore is almost closed (arrowhead) and embryos go onto develop into tadpoles (C,G). mAb 1F7-injected embryos (D-F,H) develop a normal blastopore at stage 10.5 (D, arrowhead). (E) By stage 11.5, there is a significant delay in blastopore closure and little movement of the blastopore lip is apparent (arrowhead). (F) mAb 1F7-injected embryos are truncated along the AP axis and bent ventrally. The blastocoel is retained and displaced ventrally (arrowhead). (H) Blastulae injected with mAb 1F7 develop into tadpoles that have small eyes, display head edema, and lack gut (arrowheads), heart, blood vessels and blood.



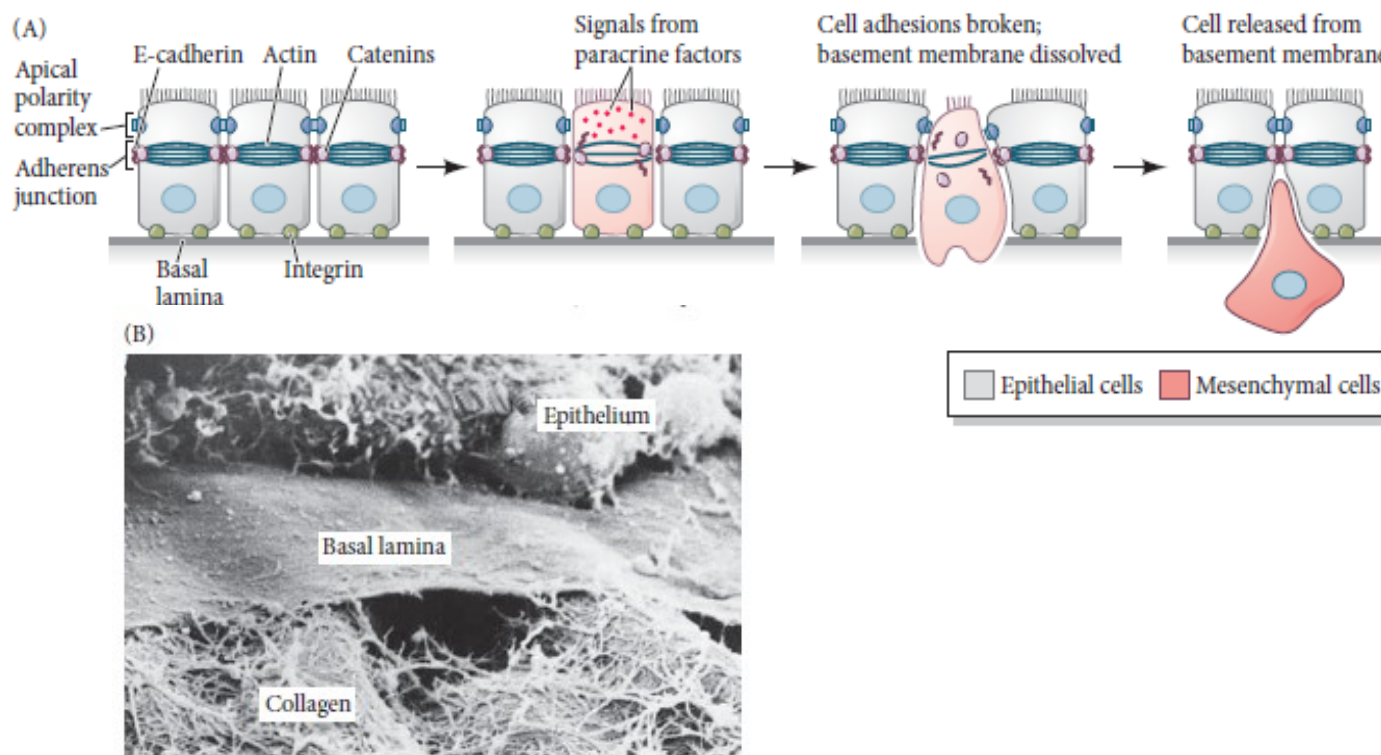
# Složky ECM – Glykoproteiny - Fibronektiny



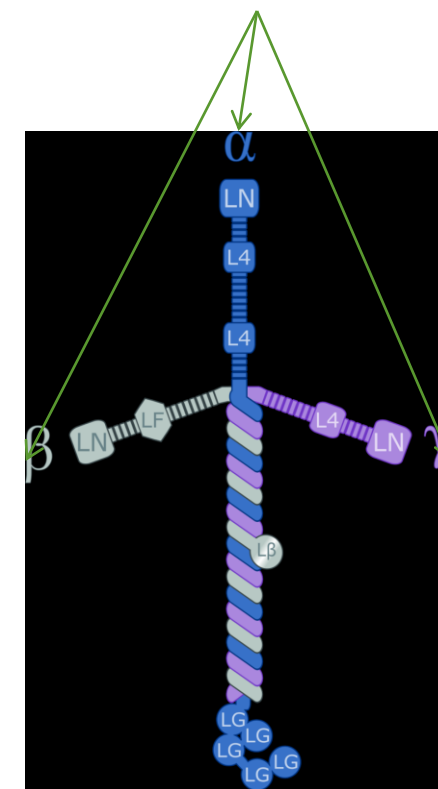


# Složky ECM – Glykoproteiny - Laminin

- Spolu s kolagenem je základní složkou basální laminy



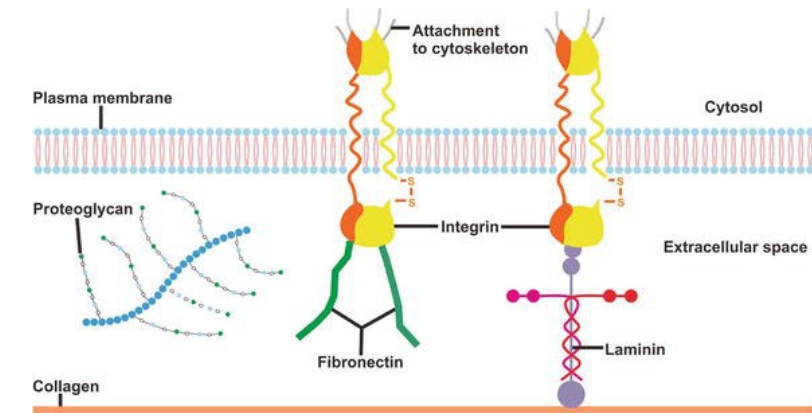
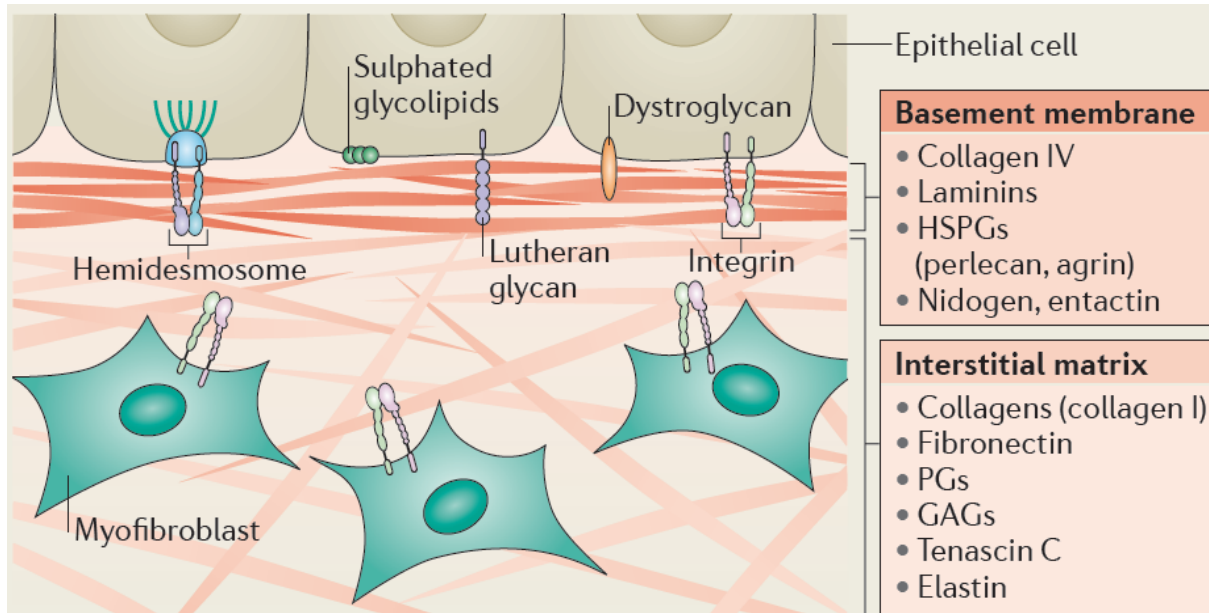
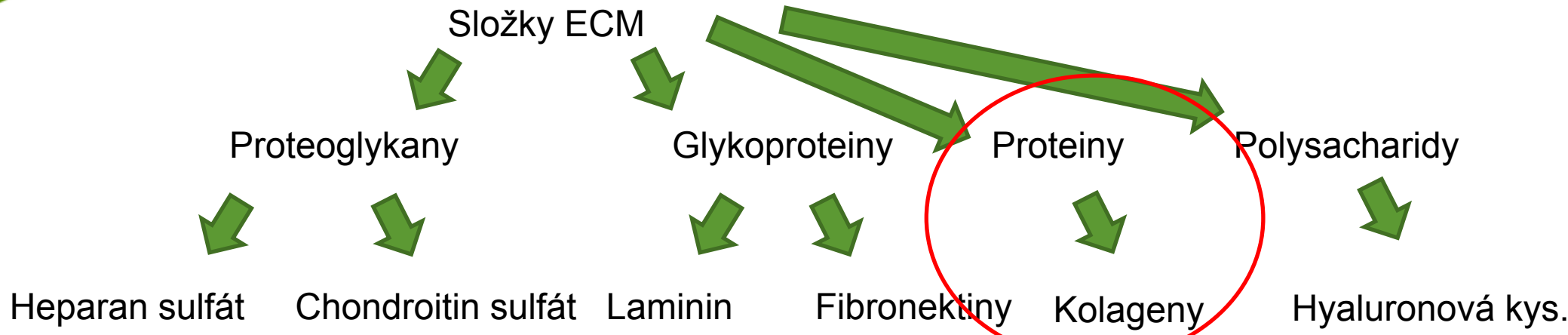
Vazba na ostatní lamininy a složky ECM



Vazba na buňku  
Přes integriny, dystroglykan

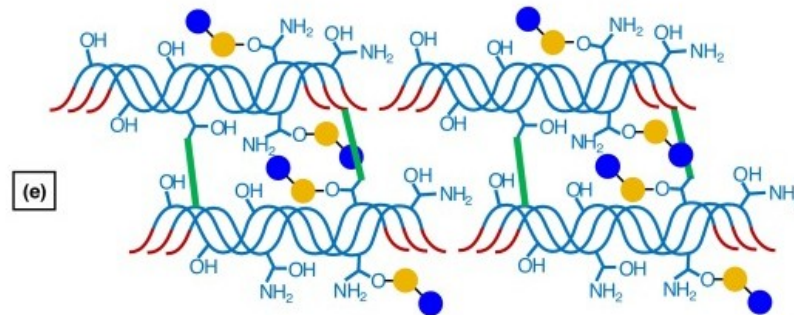


# Složky ECM – jak se v tom vyznat?



## 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



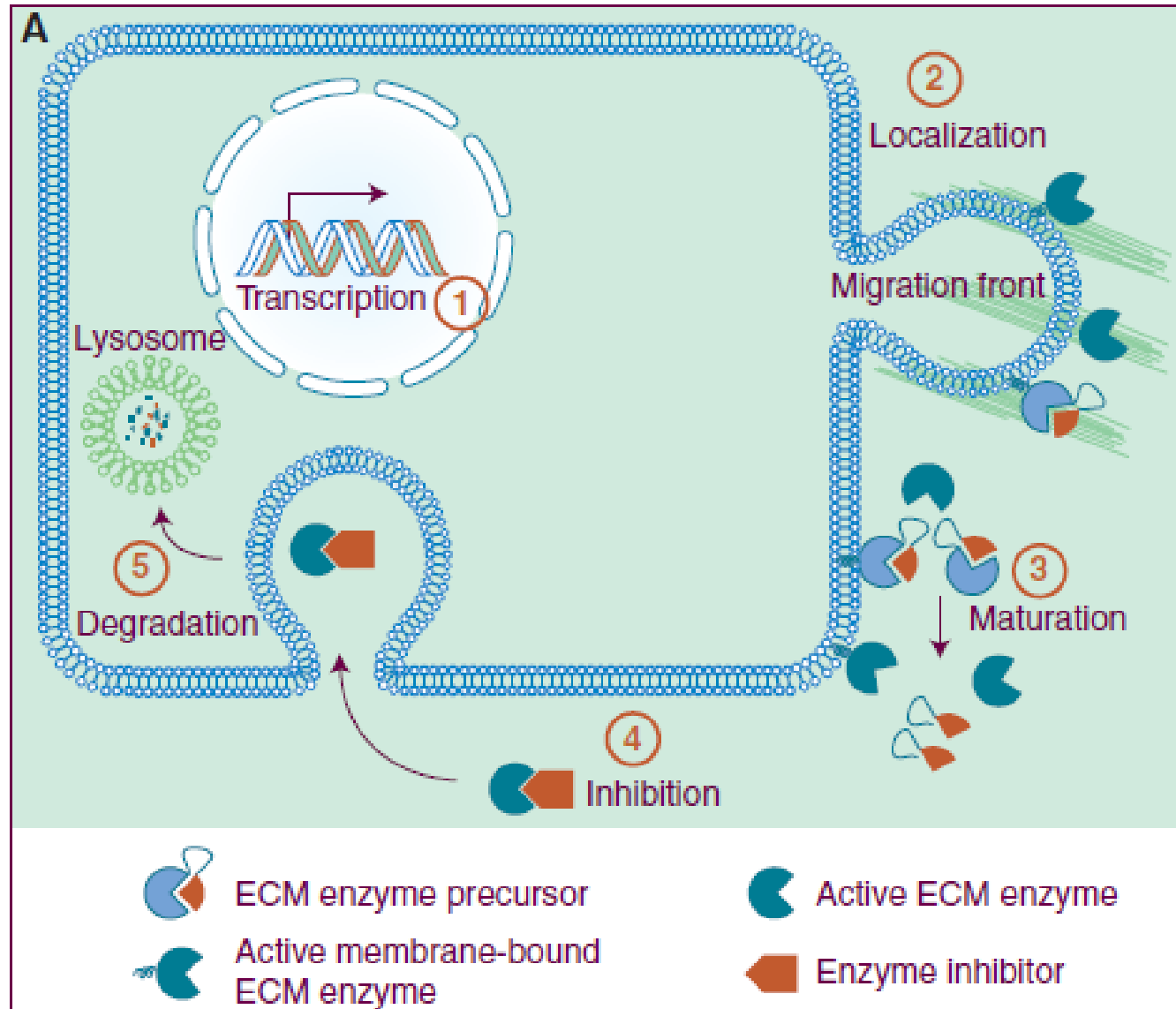
Current Opinion in Structural Biology



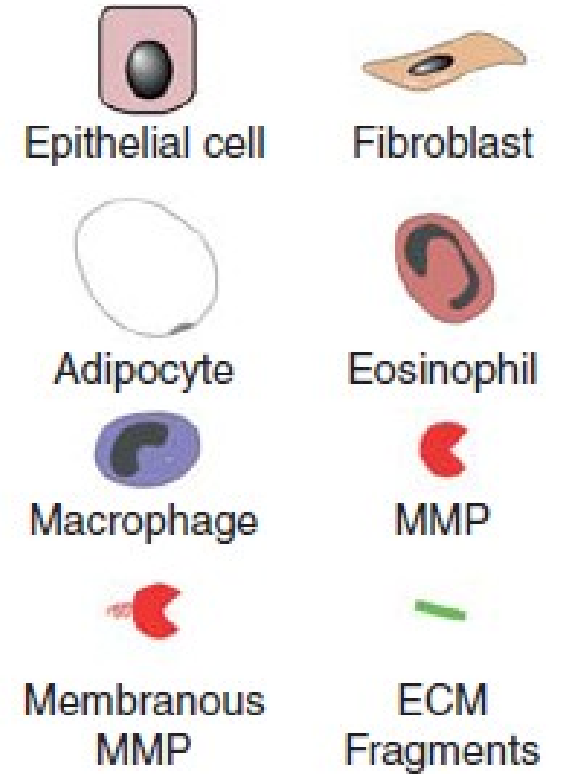
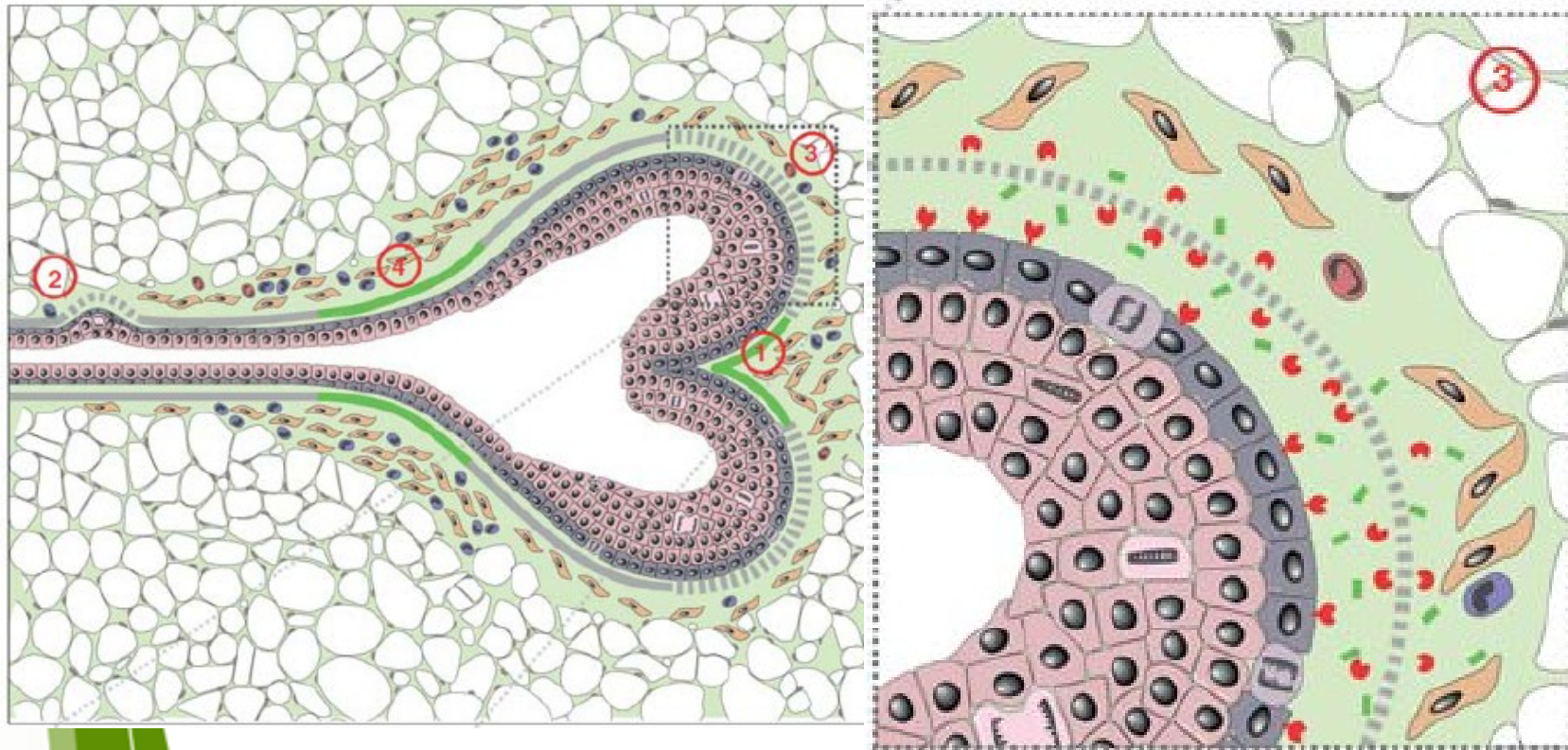
## ECM - remodelace

- 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



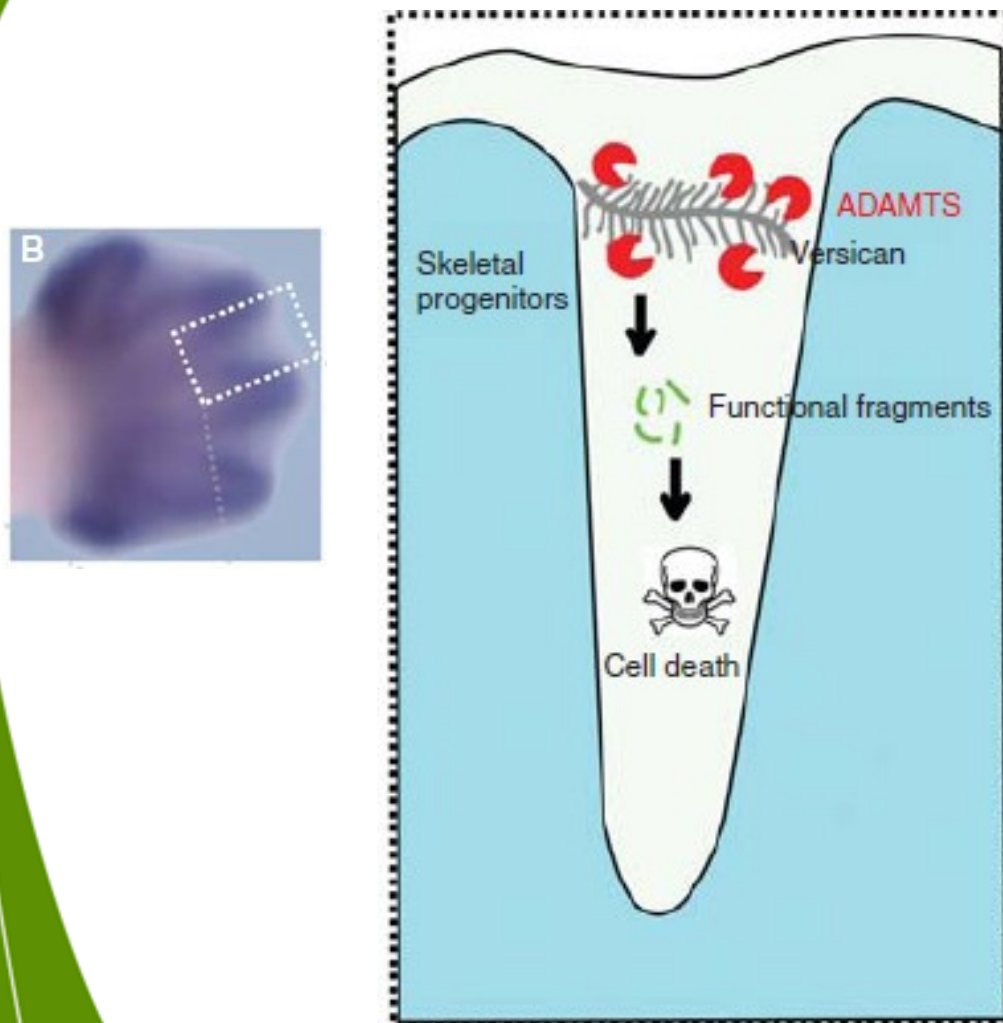
# ECM - remodelace





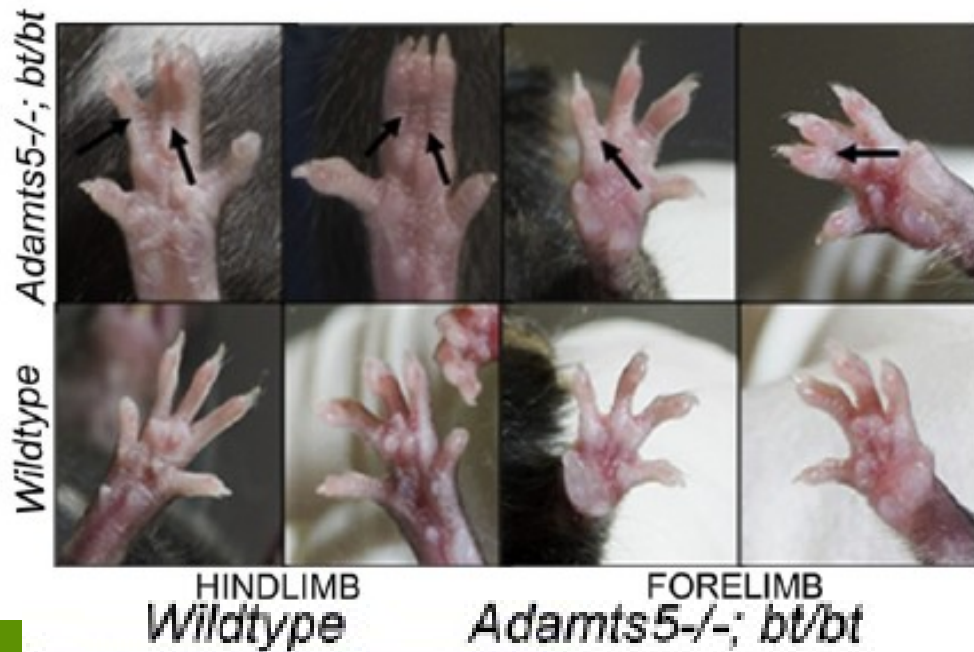
## ECM – remodelace - apoptóza

ADAMTS - a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

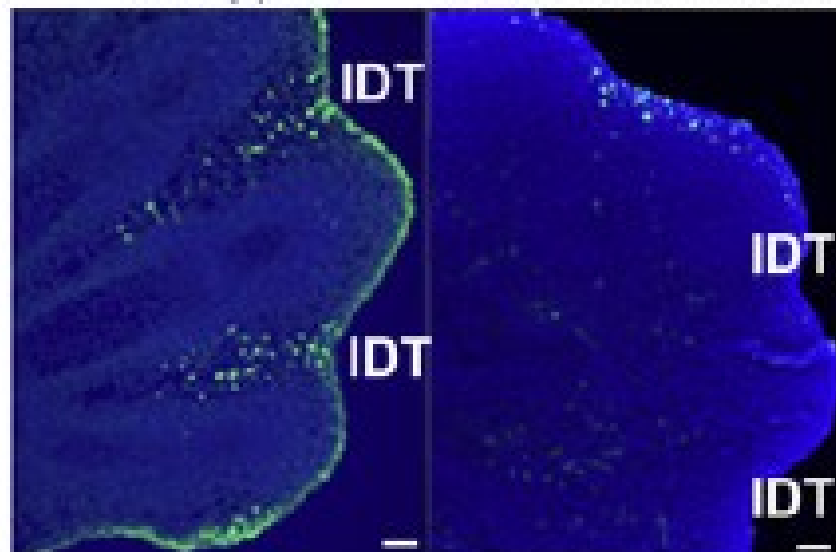


- Degradace interdigitální (mezi prsty) tkáně zahrnuje intenzivní remodelaci ECM.
- Remodelace pomocí ADAMTS5 a jejího substrátu – složky ECM versicanu.
- Produkt štěpení versicanu indukuje apoptózu
- V případě absence ADAMTS5 dochází k syndaktylii.

# ECM – remodelace - apoptóza

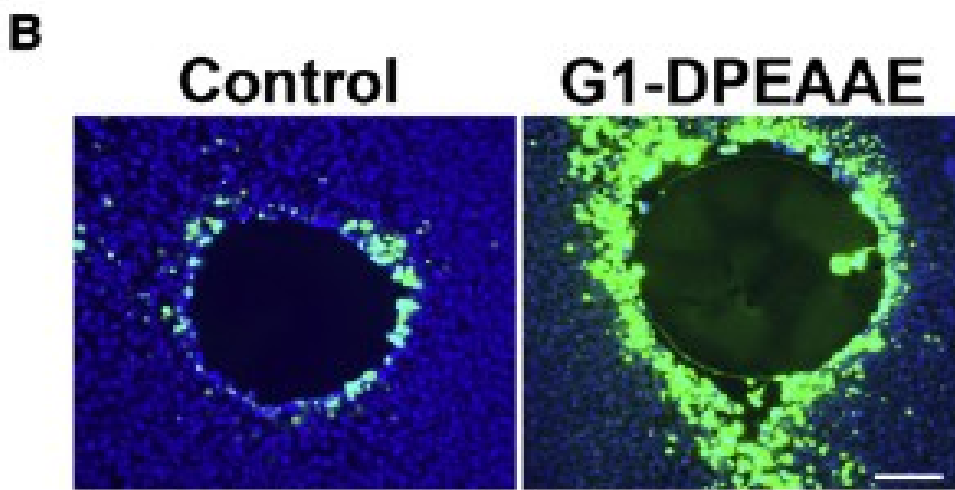
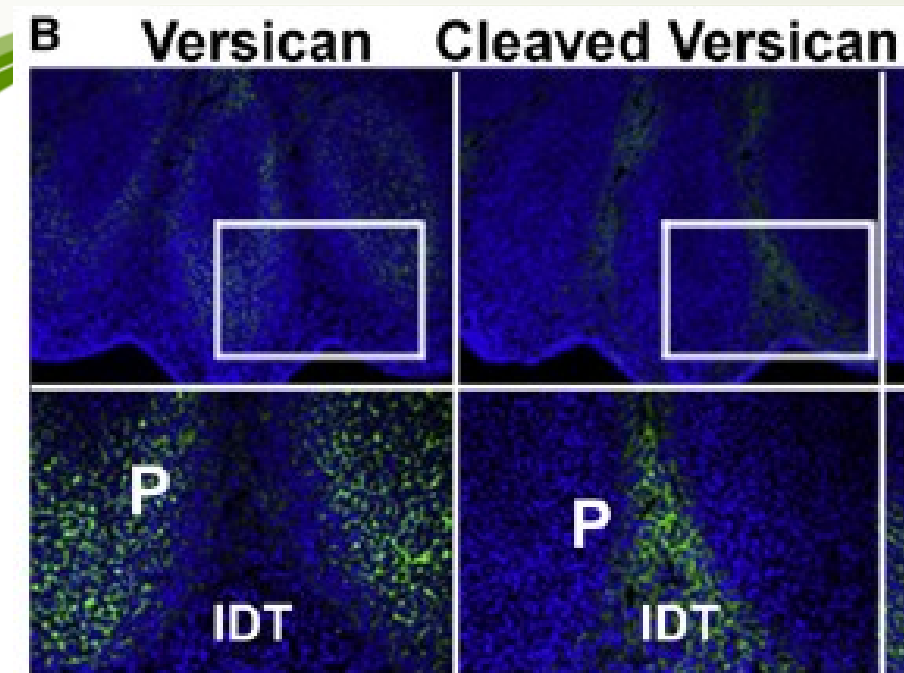


Při absenci ADAMTS5 dochází k syndaktylii...



....Protože nedochází k apoptóze

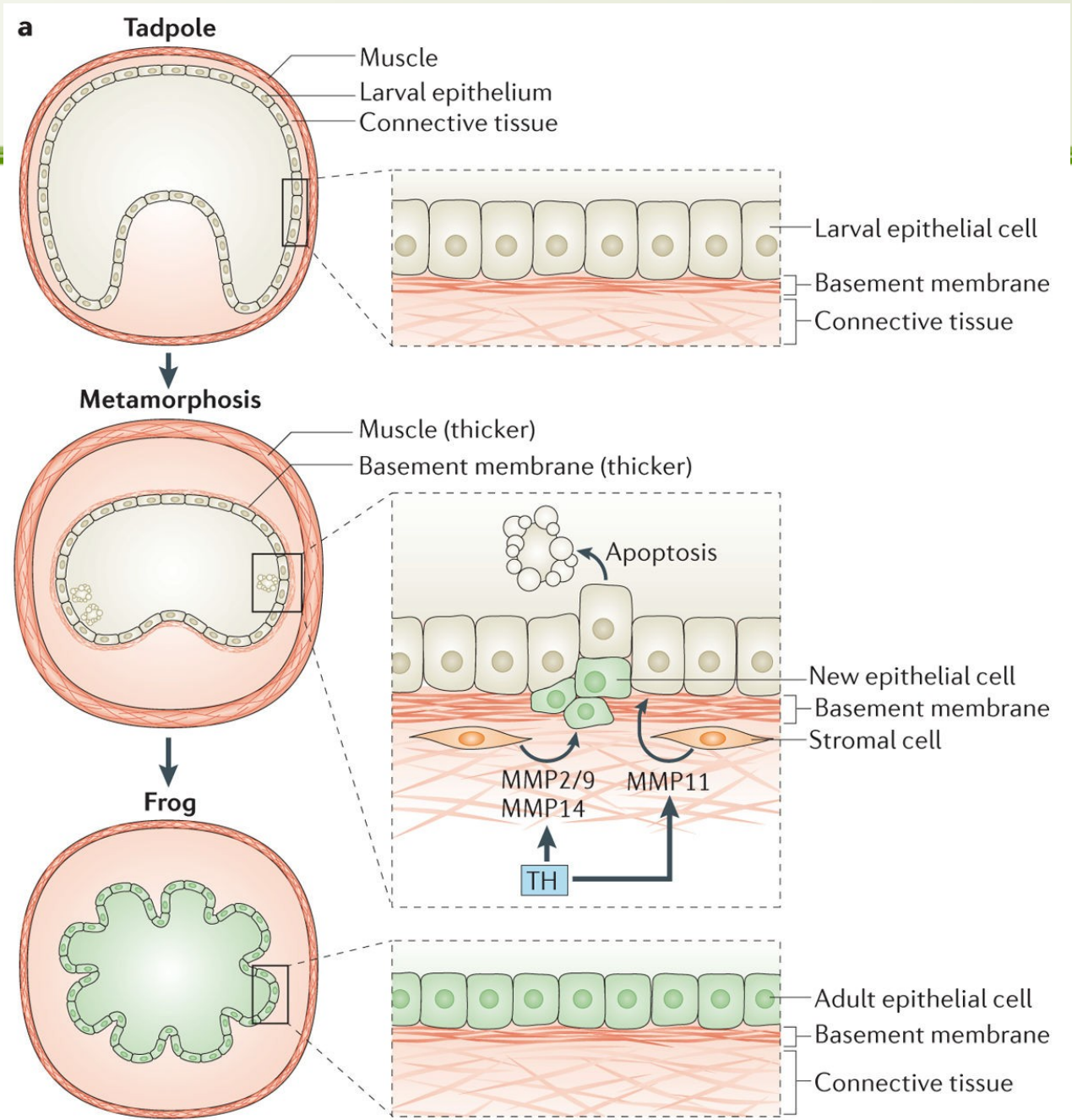
# ECM – remodelace - apoptóza



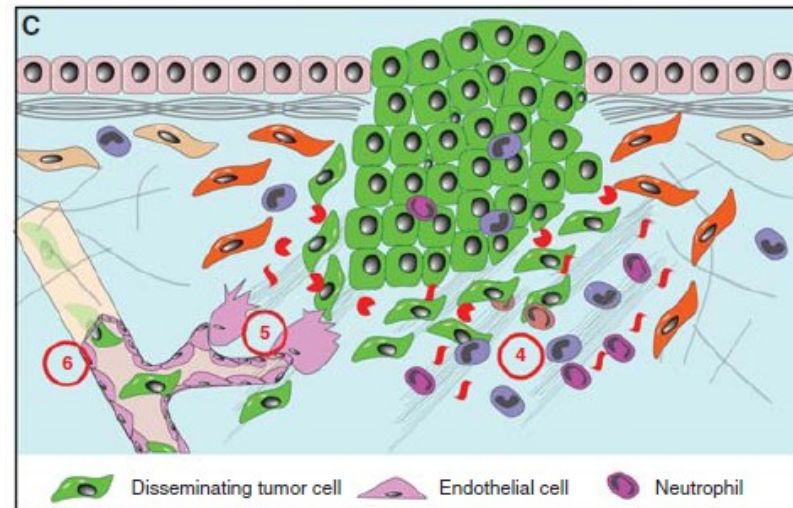
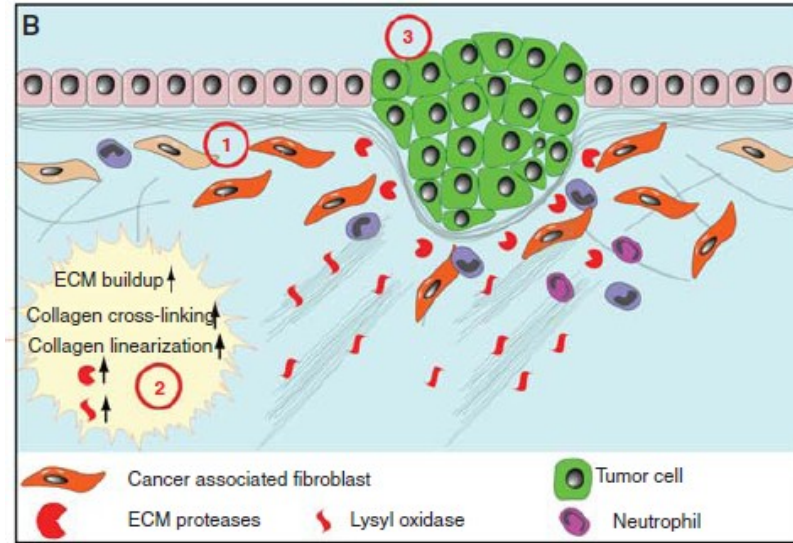
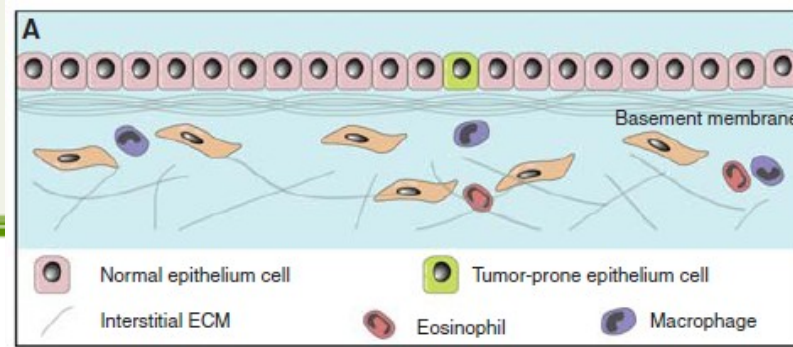
TUNEL

Samotná přítomnost štěpené formy Versicanu je schopna indukovat apoptózu

# ECM - remodelace



# ECM - remodelace



## Složky ECM – Závěr

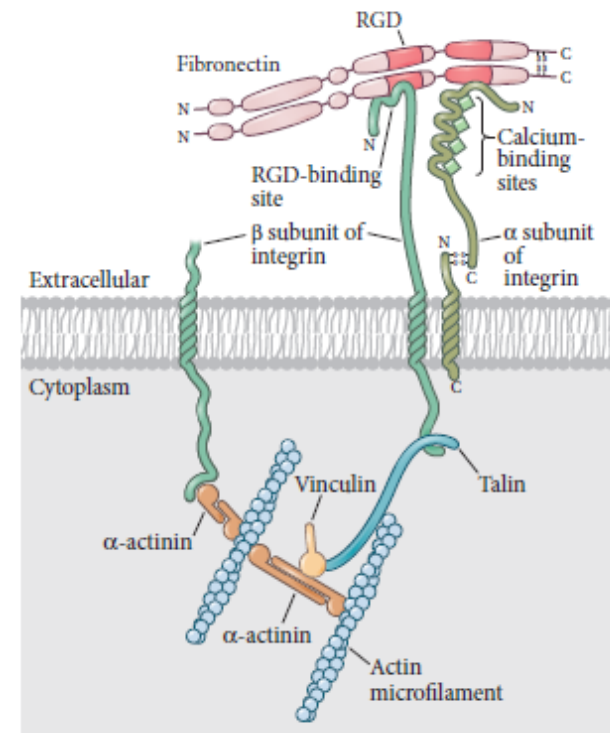
- Znat základní složky ECM, skladba, funkce + uvést funkční příklady
- Znat principy remodelace ECM + uvést příklady

## 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.

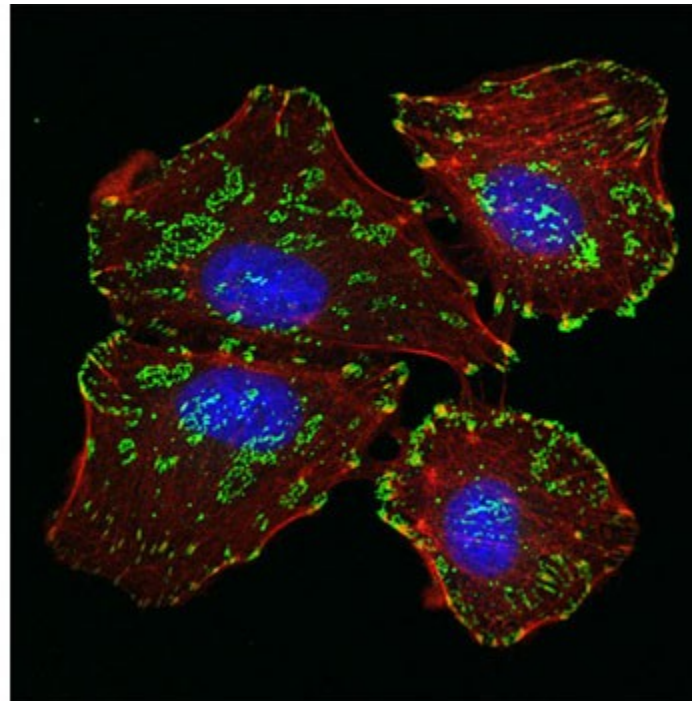


Uvnitř buňky se vždy váže na cytoskelet.



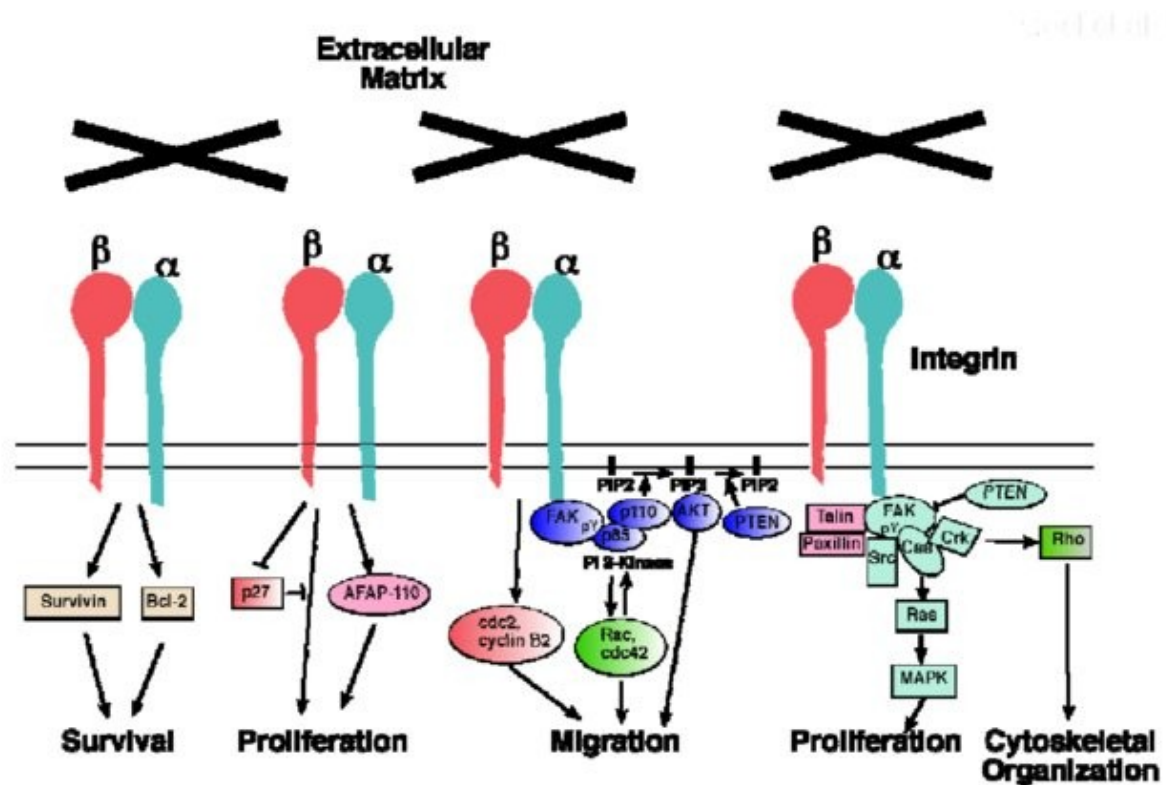
## Složky ECM – Receptory - Integriny

- Mají schopnost signalizovat z vnějšku buňky dovnitř, což vede ke změně genové exprese.
- Vnímat 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)



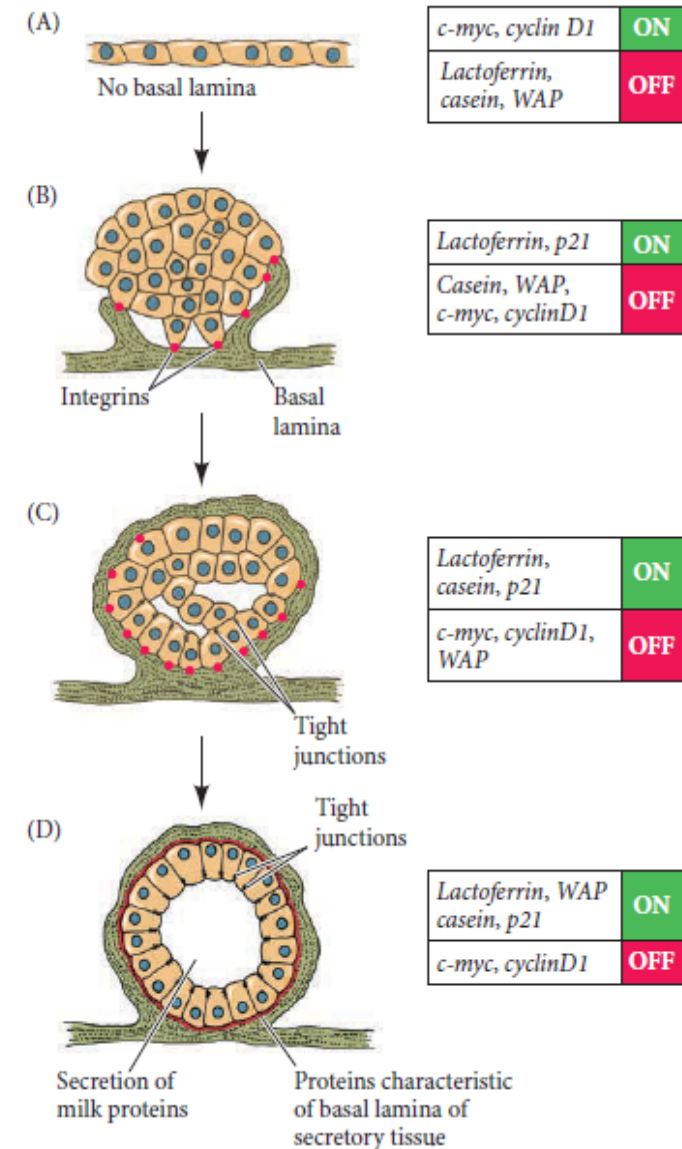
# Složky ECM – Receptory - Integriny

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



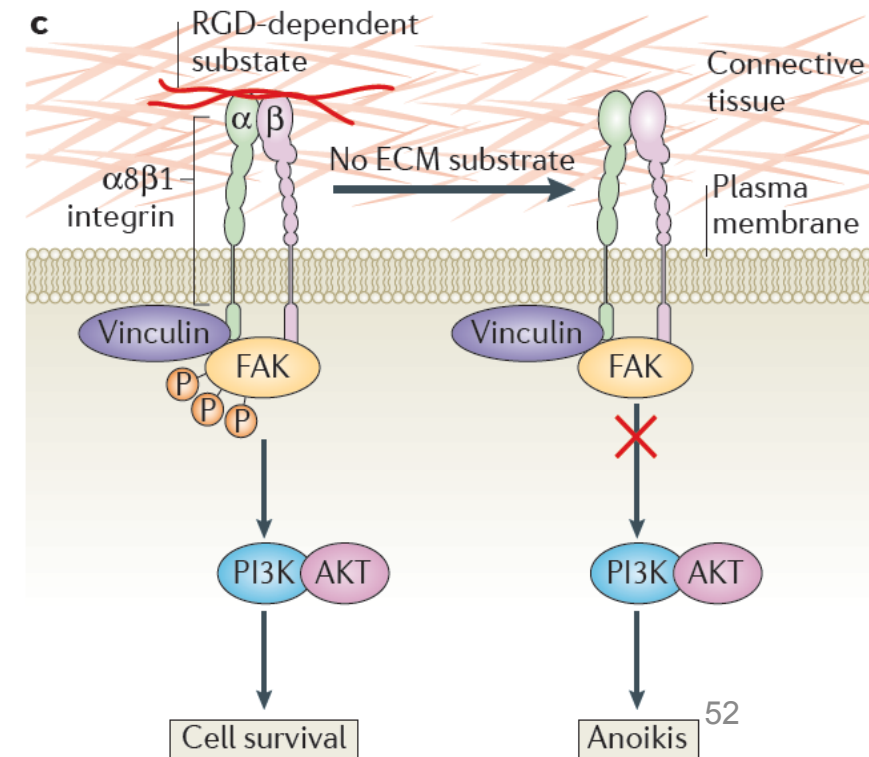
# Složky ECM – Receptory - Integriny

- Příklad:
- Které geny jsou regulovány?

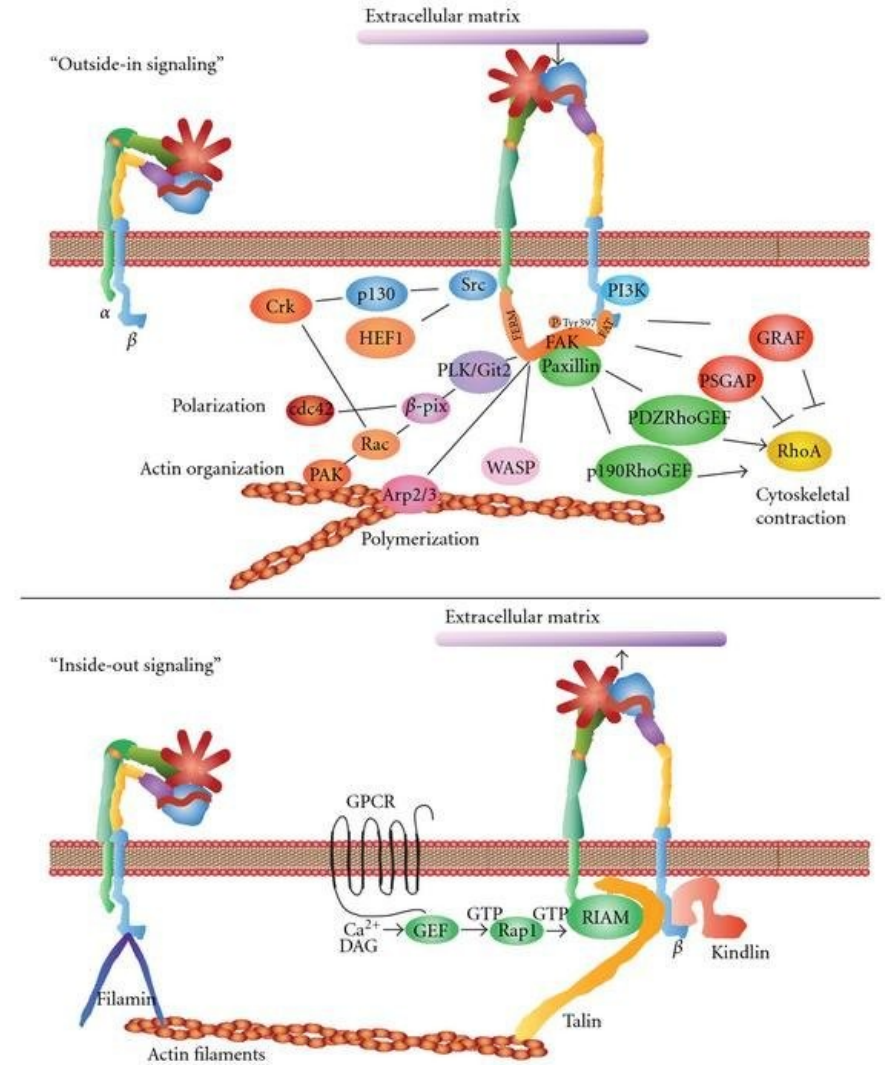
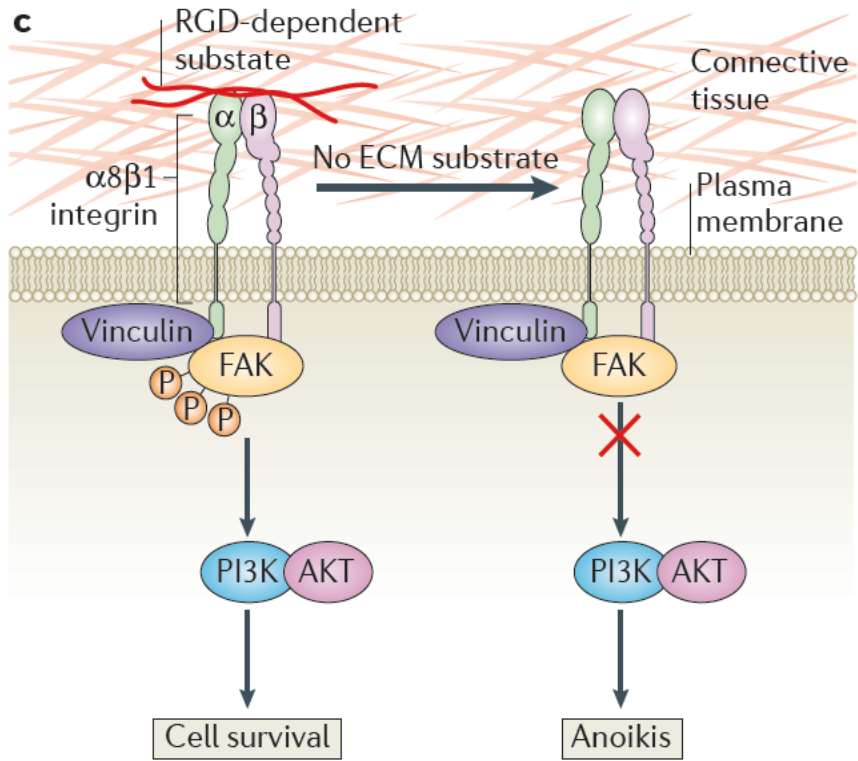


# Anoikis

- 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