

Povzetek

Testikani so modularni proteoglikani zunajceličnega matriksa pri vretenčarjih s širokim tkivnim spektrom izražanja. Proteinsko družino sestavljajo trije predstavniki, testikan-1, -2 in -3, ki so visoko ohranjeni. V njihovi polipeptidni verigi so tri regije, homologne drugim proteinom, ustrezajo pa folistatinu podobni domeni (FS), zunajcelični domeni, ki veže kalcijeve ione (EC), ter tiroglobulinski domeni (TY), medtem ko sta N- in C-končni regiji unikatni. Med drugim sodelujejo pri pritrditvi celic, njihovi migraciji in izražanju nevritov, raziskave pa kažejo na vsaj delno funkcijsko zamenljivost znotraj proteinske družine. Do sedaj opisane specifične funkcije in lastnosti (vezava kalcijevih ionov, inhibicija cisteinskih proteaz ter metaloproteaz matriksa membranskega tipa) so povezane s posameznimi domenami in regijami, a njihova prostorska organizacija ni znana. Z namenom njene osvetlitve smo podrobneje okarakterizirali testikan-2 kot predstavnika proteinske družine. Proučili smo vezavo kalcijevih ionov in njen vpliv na strukturo, ki smo jo povezali z učinkovanjem testikanov na migracijo celic. Najprej smo z uporabo izotermne titrationske kalorimetrije in strukturnih modelov kalcij-vezavne domene (EC) pokazali, da je aktivno le eno od obeh potencialnih kalcij-vezavnih mest in da je le-to pri zunajceličnih koncentracijah kalcija vedno zasedeno. Vezava na drug potencialni motiv EF2 je onemogočena zaradi substitucije na enem od kanoničnih koordinacijskih mest, kjer je aminokislinski ostanek z manjšo polarno stransko skupino v primerjavi z EF1 zamenjan z aminokislinskim ostankom z veliko hidrofobno stransko skupino, to pa velja za vse tri člane proteinske družine. V nadaljevanju smo z bioinformatično analizo aminokislinskih zaporedij pokazali, da sta N- in C-končni regiji vse treh testikanov najverjetneje strukturno neurejeni. To je skladno z rezultati analize z uporabo sipanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS), ki kažejo na strukturno neurejenost N-končne unikatne regije, medtem ko je regija domen FS–EC–TY strukturno bistveno bolj urejena, na področju domene EC prevladujejo α -vijačnice, v domenah FS in TY pa so poleg α -vijačnic prisotne tudi ploskve beta. To ilustrira tudi družina modelov, pripravljenih na osnovi eksperimentalnih podatkov SAXS ter modelov posameznih domen, ki kaže na meddomenske interakcije znotraj tripleta FS–EC–TY. Vezava kalcijevih ionov prispeva k strukturni stabilizaciji in se odraža v nekoliko večji kompaktnosti molekule testikana-2. Z uporabo testov zapiranja celične vrzeli smo tudi pokazali, da je ravno jedro FS–EC–TY tisto, ki je povezano s povečano celično migracijo. Enako smo pokazali tudi za testikan-1, kar nakazuje na funkcionalno redundančnost v okviru te fiziološke vloge. Naši rezultati nudijo prvi vpogled v strukturno organizacijo testikanov ter s tem predstavljajo dobre temelje za nadaljnje raziskave na nivoju struktura–funkcija.

Ključne besede: testikan, SPOCK, vezava kalcija, SAXS, celična migracija