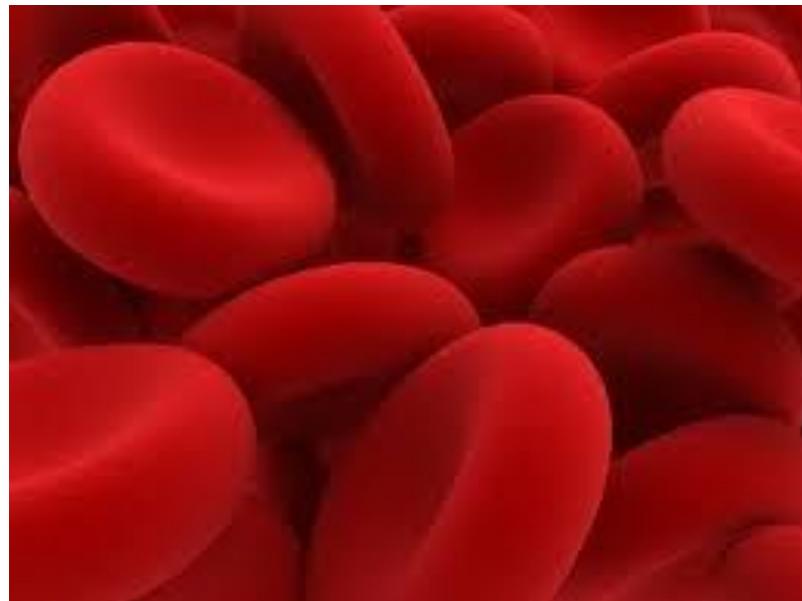




# ΕΙΔΙΚΑ ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«ΠΡΟΤΥΠΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ: Η ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΤΟΥ  
ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟΥ»

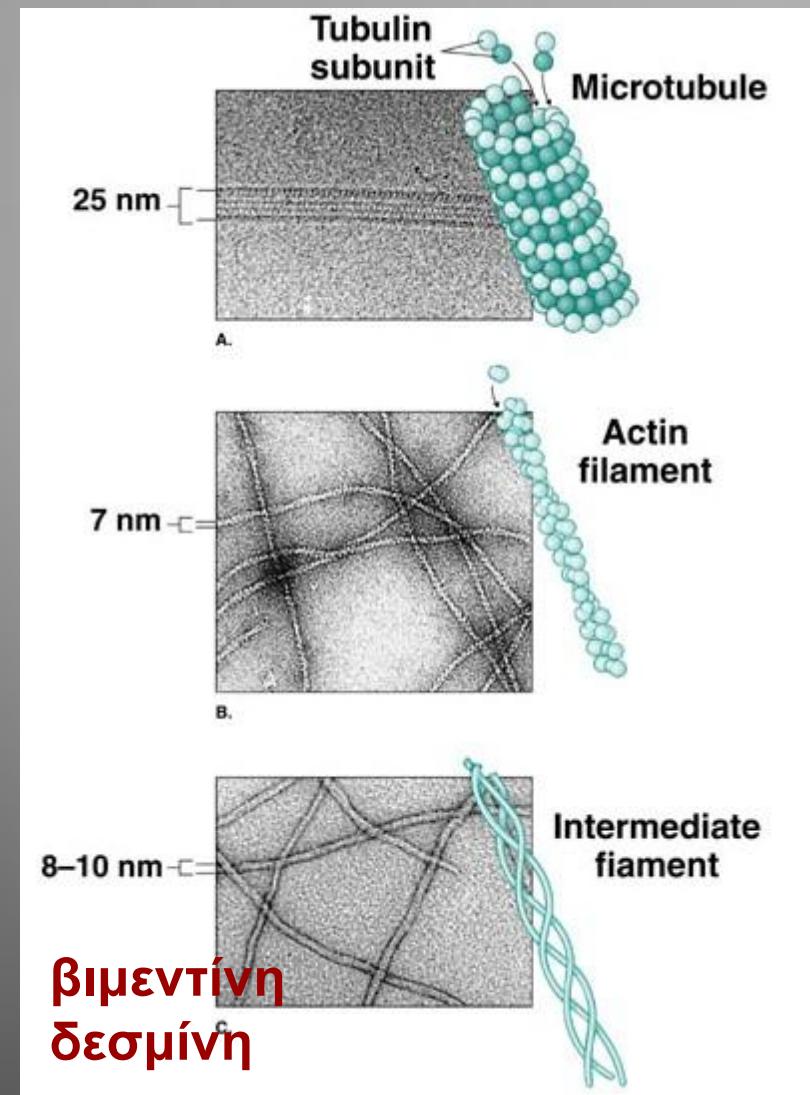
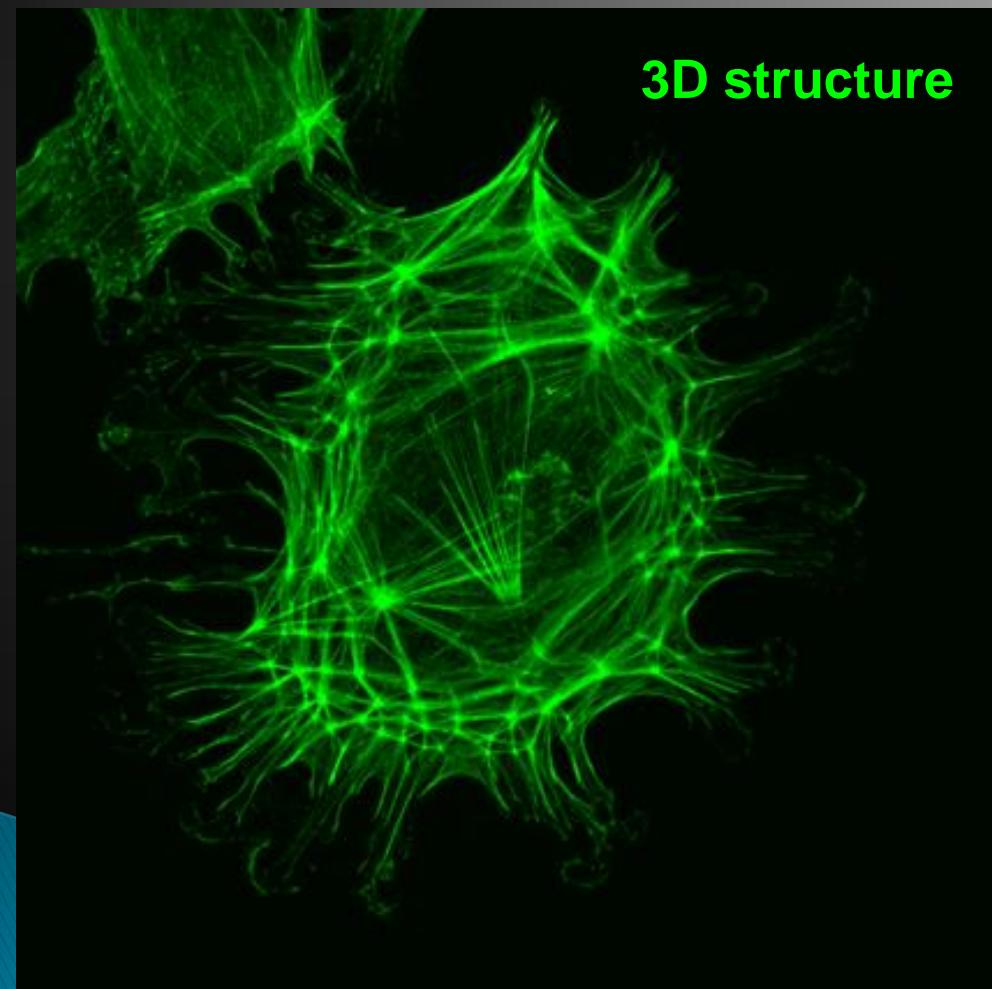


Μαριάννα Χ. Αντωνέλον, Ph.D.  
Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας,  
Πανεπιστημίου Αθηνών

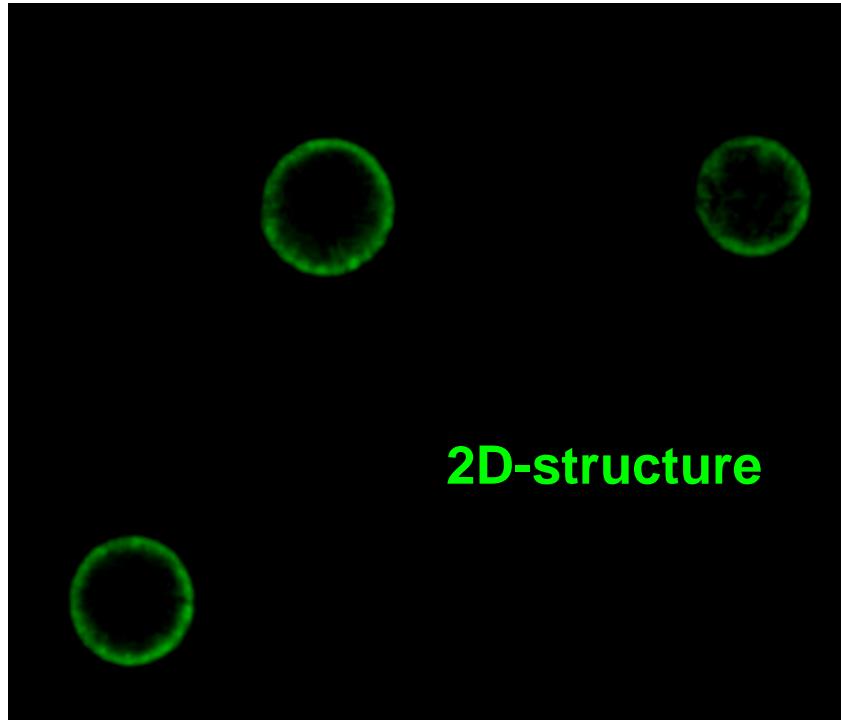
2014

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

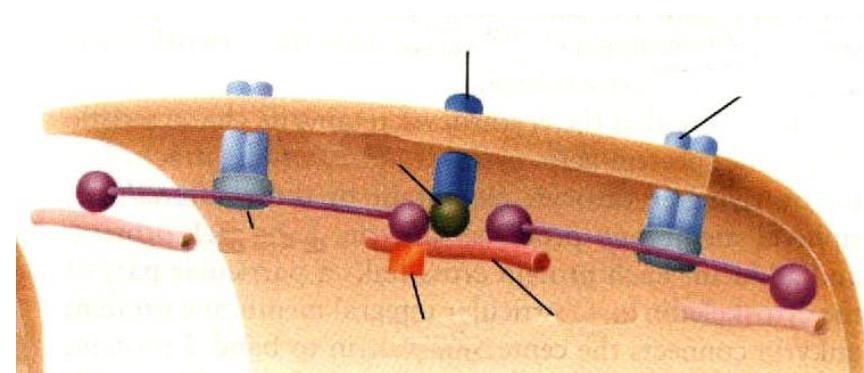
Εκχύλιση κυττάρου με Triton X-100



# ΣΚΕΛΕΤΟΣ



2D-structure



Spectrin, actin filaments and accessory proteins form a highly cross-linked network, termed the **membrane skeleton**

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

Κοντά πρωτονημάτια ακτίνης (33-37 nm)

## Σκελετικό εκχύλισμα

1. underlies the inner surface of plasma membranes of metazoan cells
2. is linked to cell adhesion receptors, ion pumps and channels ⇒ organizes sub-domains of the plasma membrane
3. influences cell shapes and mechanical stability

Sp's

4.1

actin

ixvn Ηb

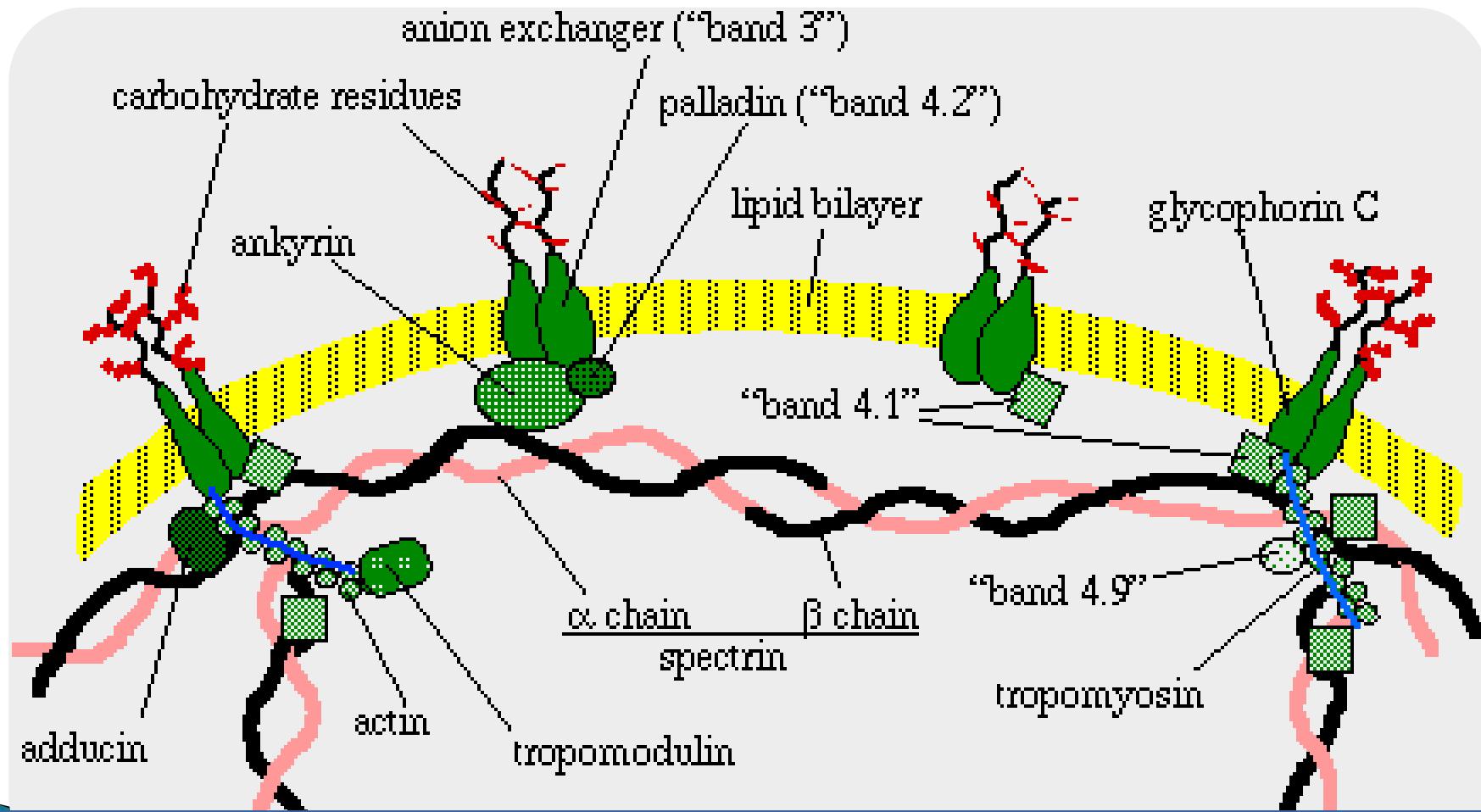


The spectrin-based membrane skeleton was first identified in RBCs

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

Ιδιαίτερα ανεπτυγμένος (65%)

elasticity and mechanical stability

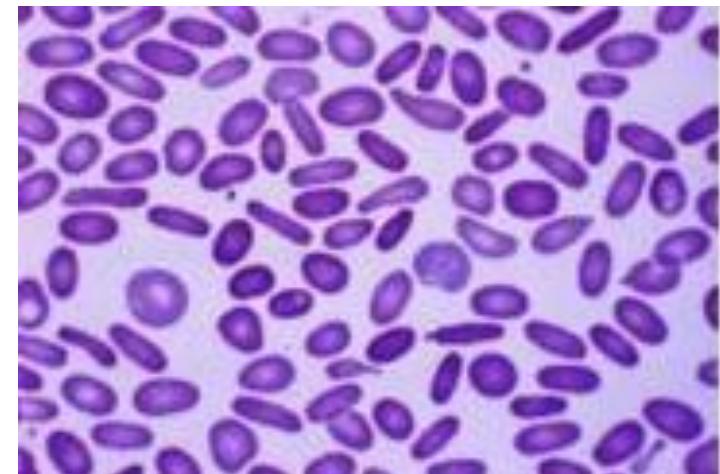


The architecture of the membrane skeleton and the nature of its intermolecular contacts determine the mechanical properties of the skeleton and confer the characteristic biconcave shape of red cells.

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ-RBCs

In human **hereditary hemolytic anemias**, defects or deficiencies in assembly or interactions of spectrin and other membrane skeleton components lead to **abnormally shaped and fragile RBCs** due to impaired **biogenesis** and/or **survival** in the circulation.

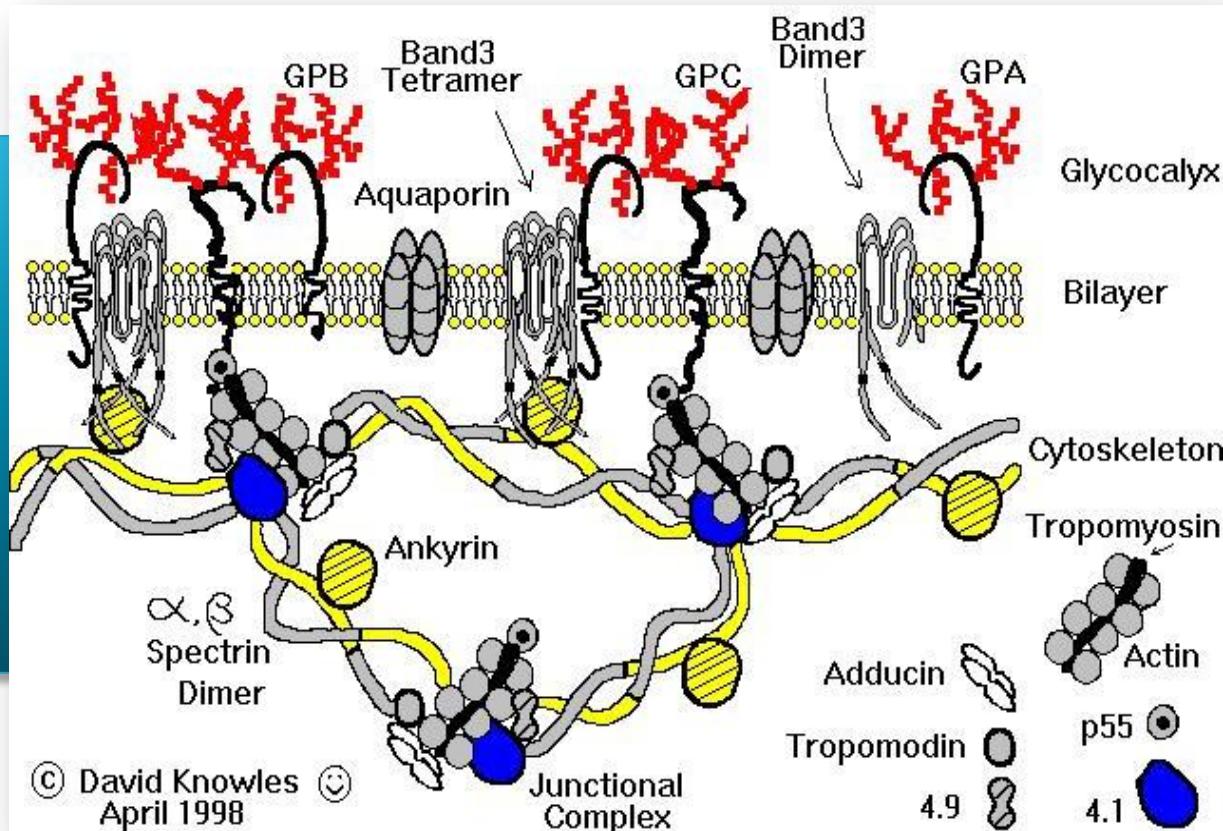
Hemolytic anemia due to **membrane skeleton defects** is one of the most common inherited diseases in Northern Europeans (1:2500 to 1:5000).



# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

## ΣΗΜΕΙΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ:

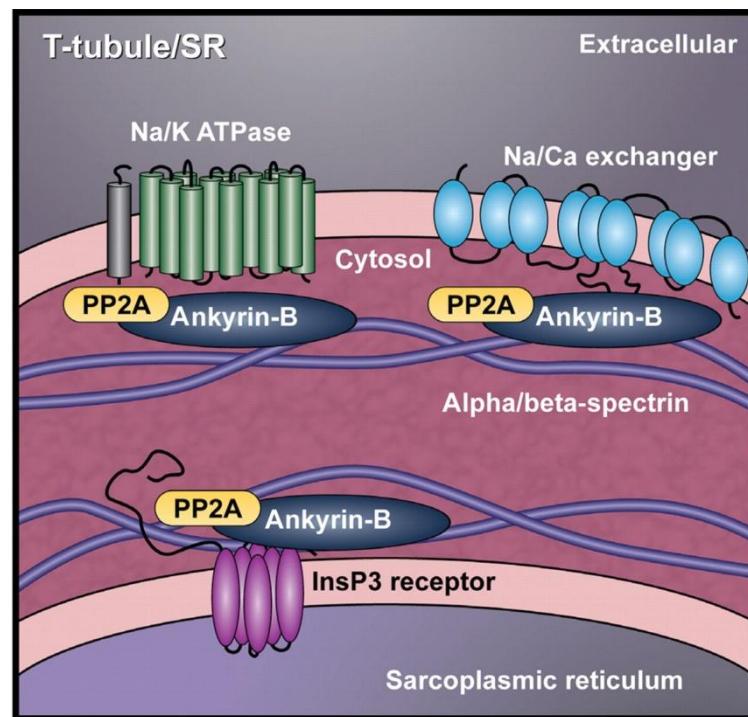
- 1) Sp-ank (band 3) (\*\*\*)
- 2) Sp-4.1R-actin-p55-GpC
- 3) Rh, RhAG-ank
- 4) B3-adducin-Sp
- 5) GluT1-adducin-dematin
- 6) Sp, 4.1R → PS



# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

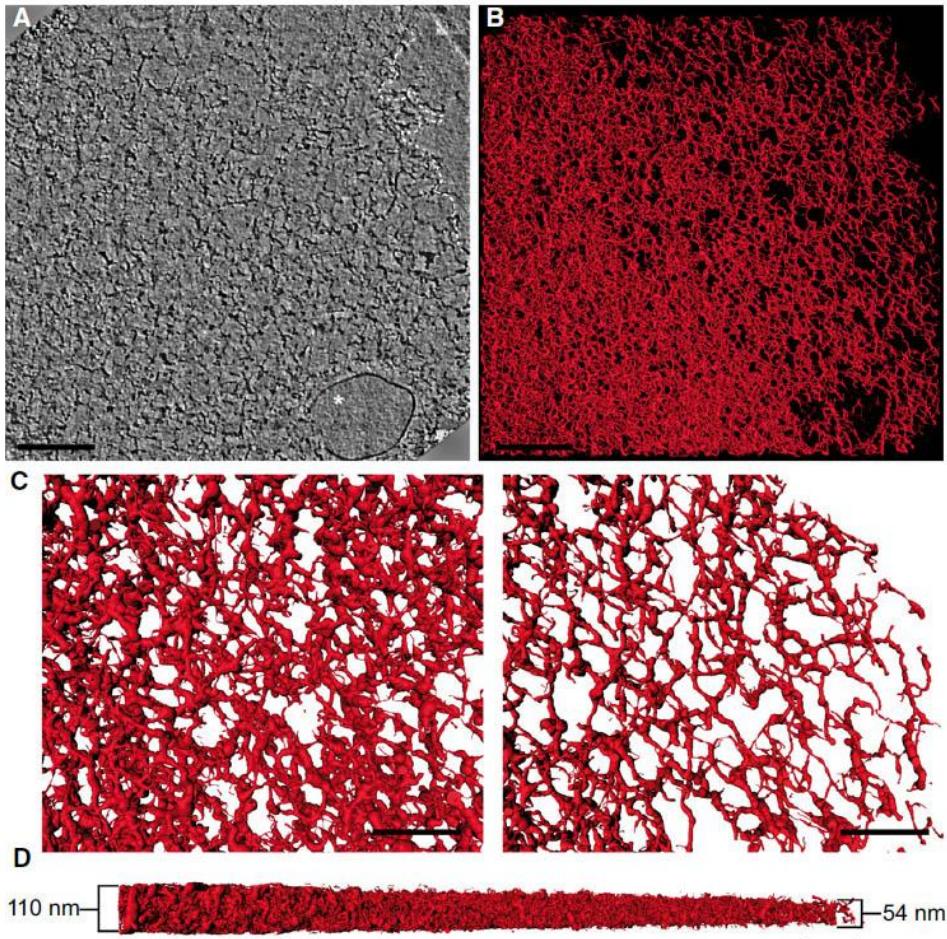
Αυτό το μοντέλο βρίσκει εφαρμογή και σε άλλους ιστούς/κύτταρα/ οργανίδια με διαφορετική όμως οργάνωση και λειτουργία

Οι σπεκτρίνες ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην ενδοκυττάρια επιφάνεια του **RBC Τώρα**: κεντρικό συστατικό των **μεμβρανικών σκελετών σπεκτρίνης-ακτίνης (ubiquitous and complex spectrin–actin scaffold)** που εντοπίζονται κάτω από τη λιπιδιακή διπλοστιβάδα των κυττάρων στα **μετάζωα**



# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

cryo-electron tomography evaluation of the **3D topology/structure** of intact, unexpanded membrane skeletons from mouse erythrocytes frozen in physiological buffer (*Nans et al., BIOPHYSICAL JOURNAL 101:2341, 2011*)



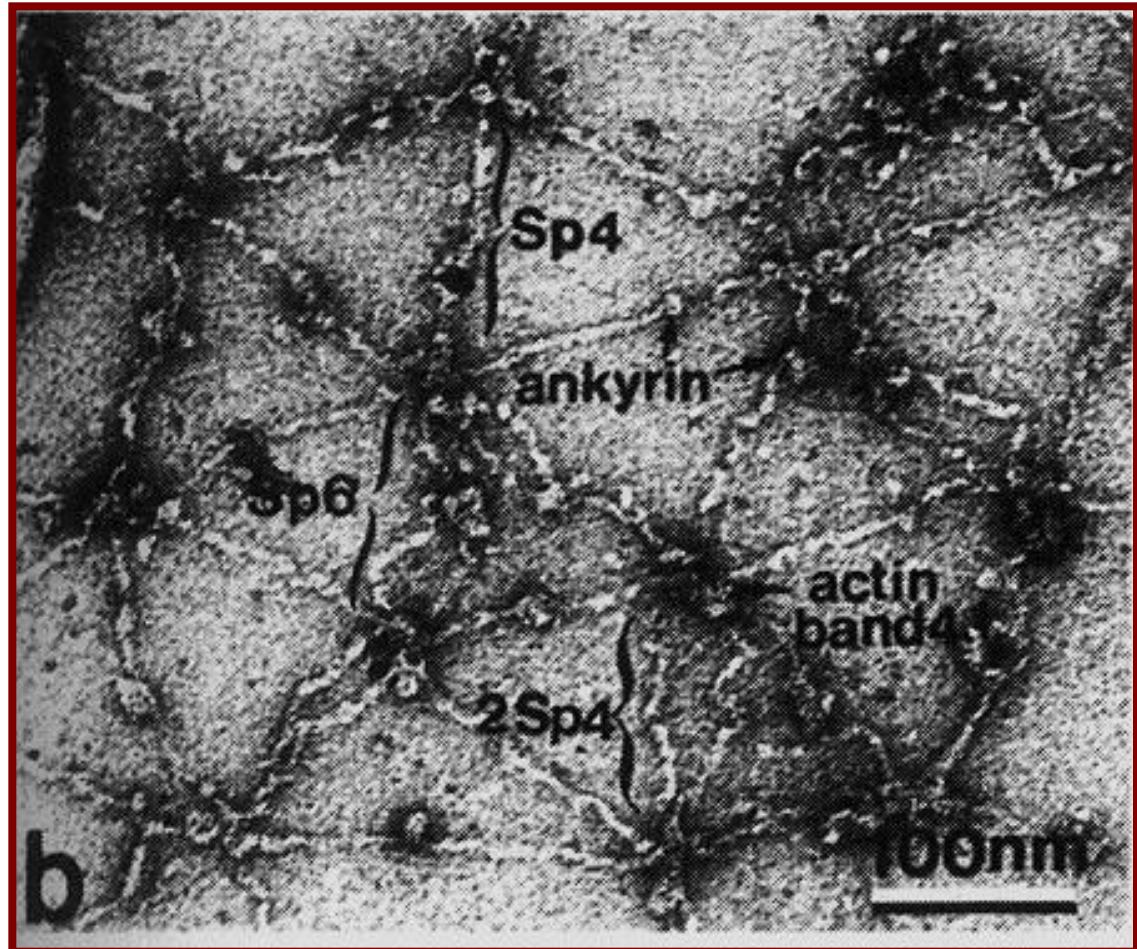
**network of Sp filaments:**  
gradual decrease in both the **density** and the  
**thickness** of the network from **the center to the edge of the cell** (corresponding gradient in membrane stress)

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

Πυκνό και νηματώδες δίκτυο, αλλά με έκταση και αρνητική χρώση...



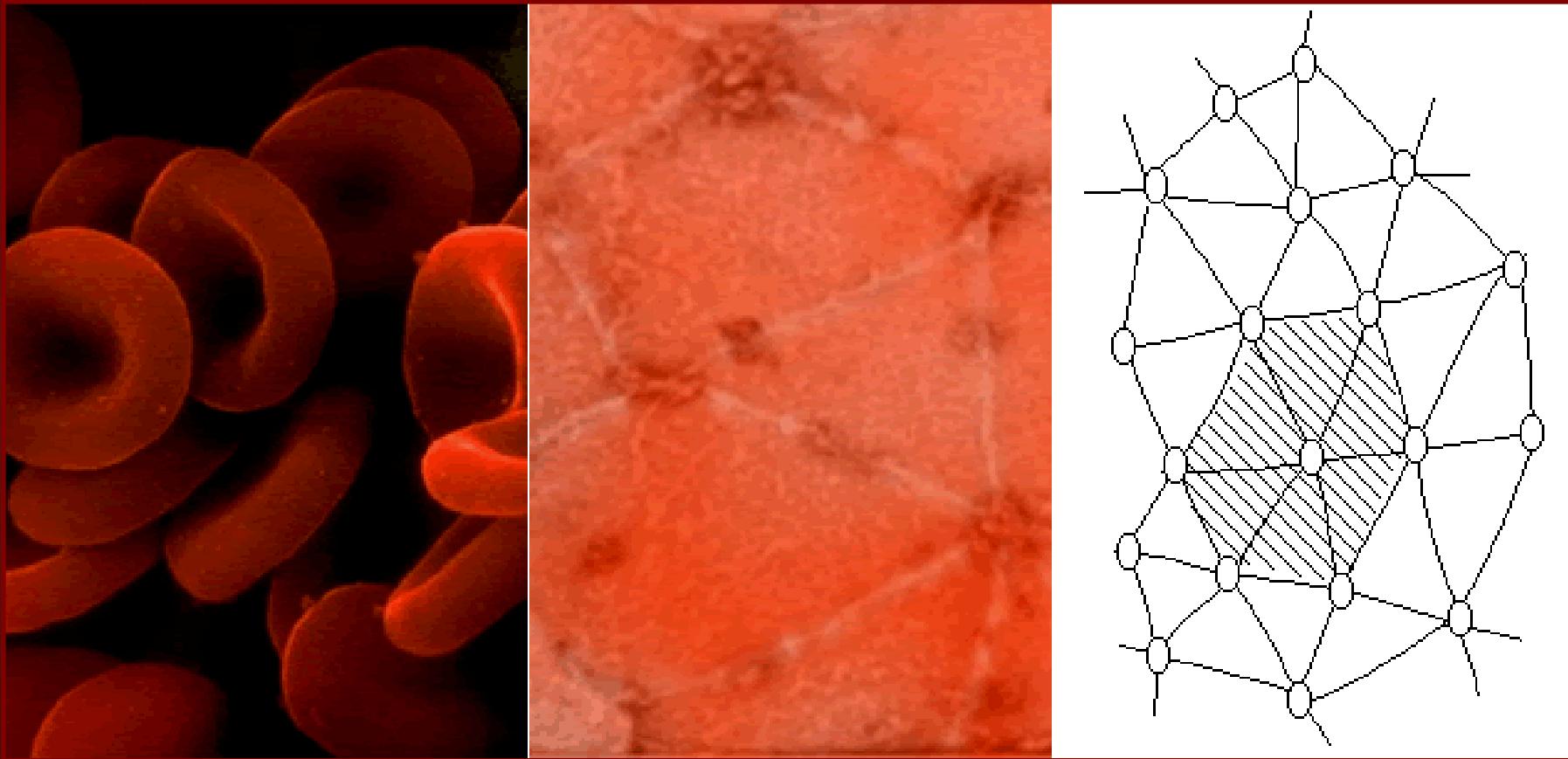
(Palek & Sahr, 1992)



(Liu et al., 1987; J.Cell Biol., 104:527-536)

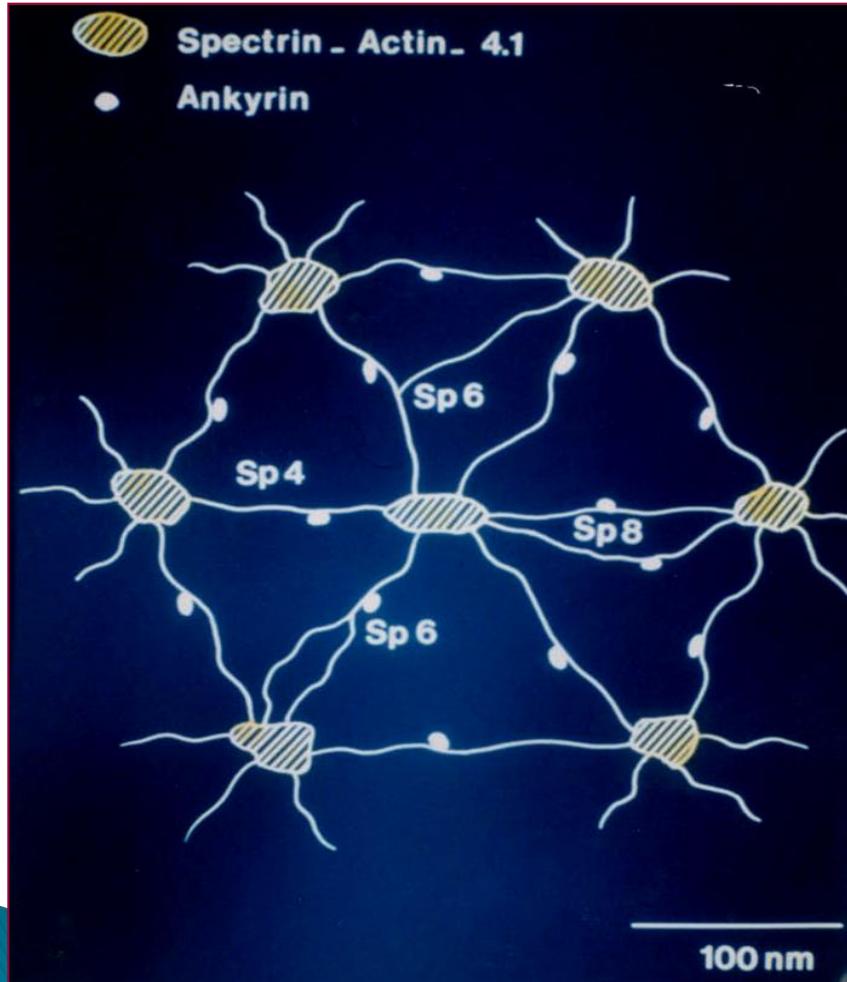
δομή κανονικού πλέγματος

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ



Τα μόρια σπεκτρίνης σχηματίζουν ένα πρότυπο σαν δίχτυ το οποίο αγκυροβολείται στη μεμβράνη με τα μόρια αγκυρίνης. Το βασικό σχήμα είναι εξαγωνικό

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ



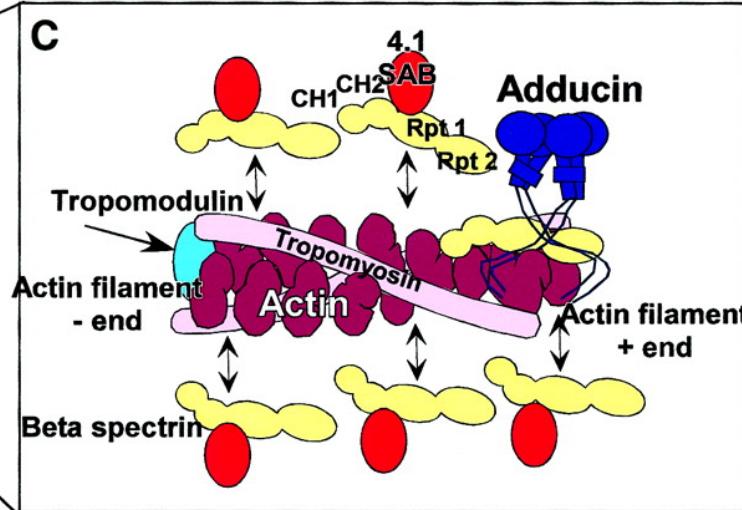
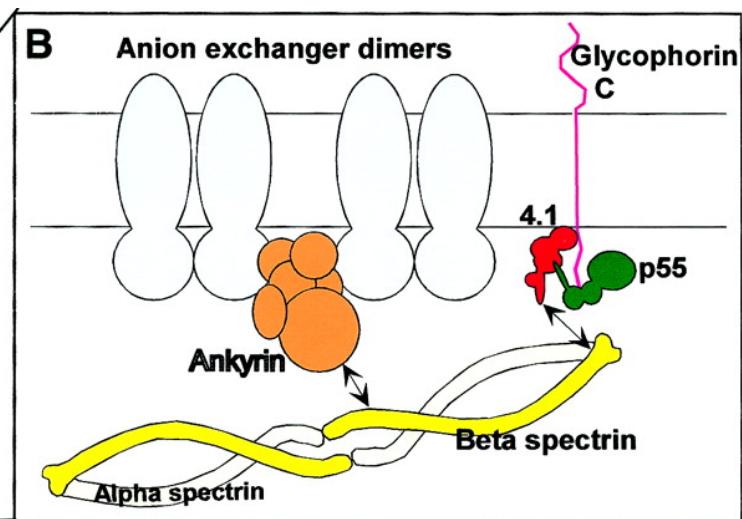
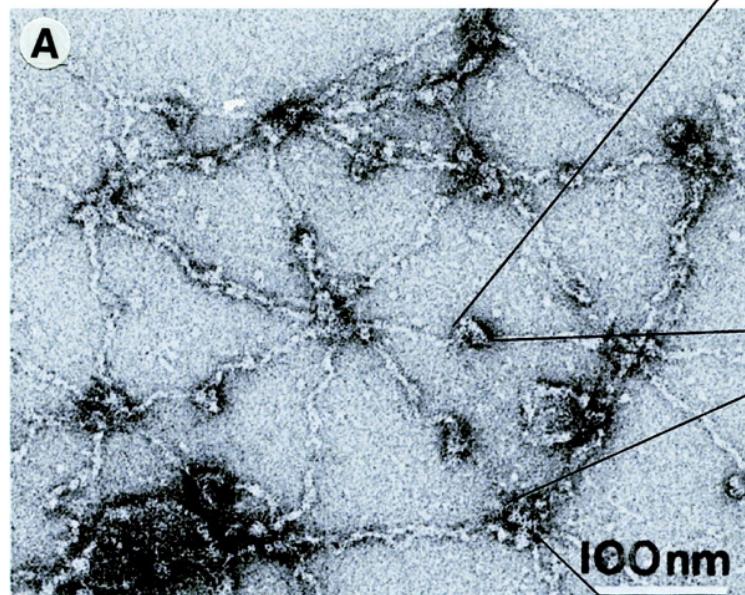
## ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΖΕΥΞΗΣ:

Τα κομβικά σημεία διασταύρωσης  
των SpT μεταξύ τους και με τα  
πρωτονημάτια ακτίνης

Οριζόντιες διαπρωτεΐνικές αλληλεπιδράσεις  
σε επίπεδο SK

$240-360 \text{ ΣΖ}/\mu\text{m}^2$

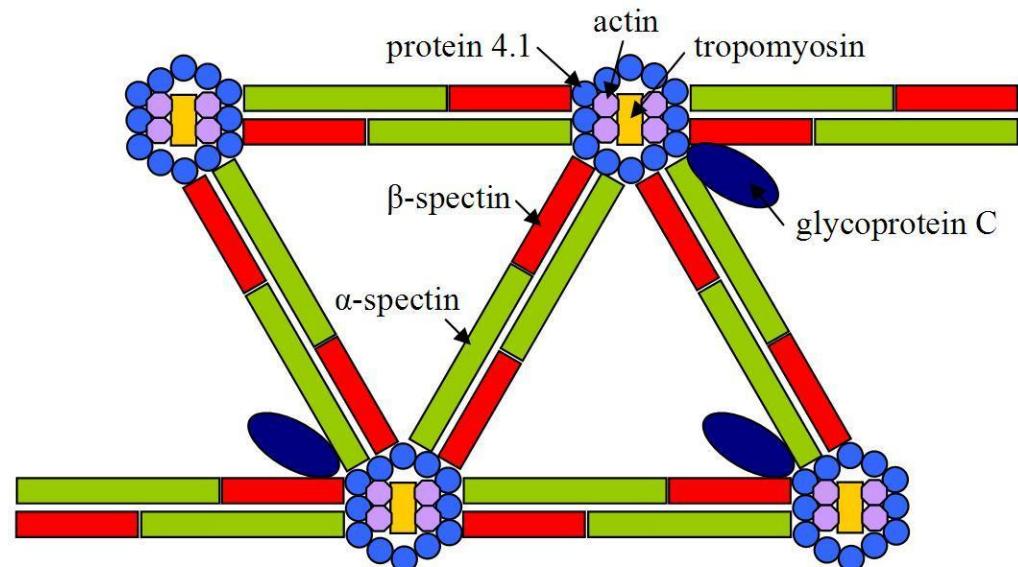
# ΣΚΕΛΕΤΟΣ



# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

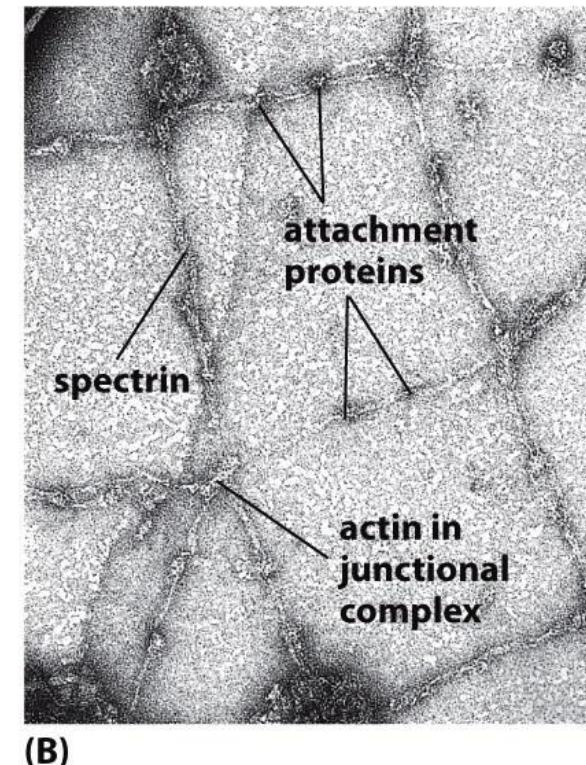
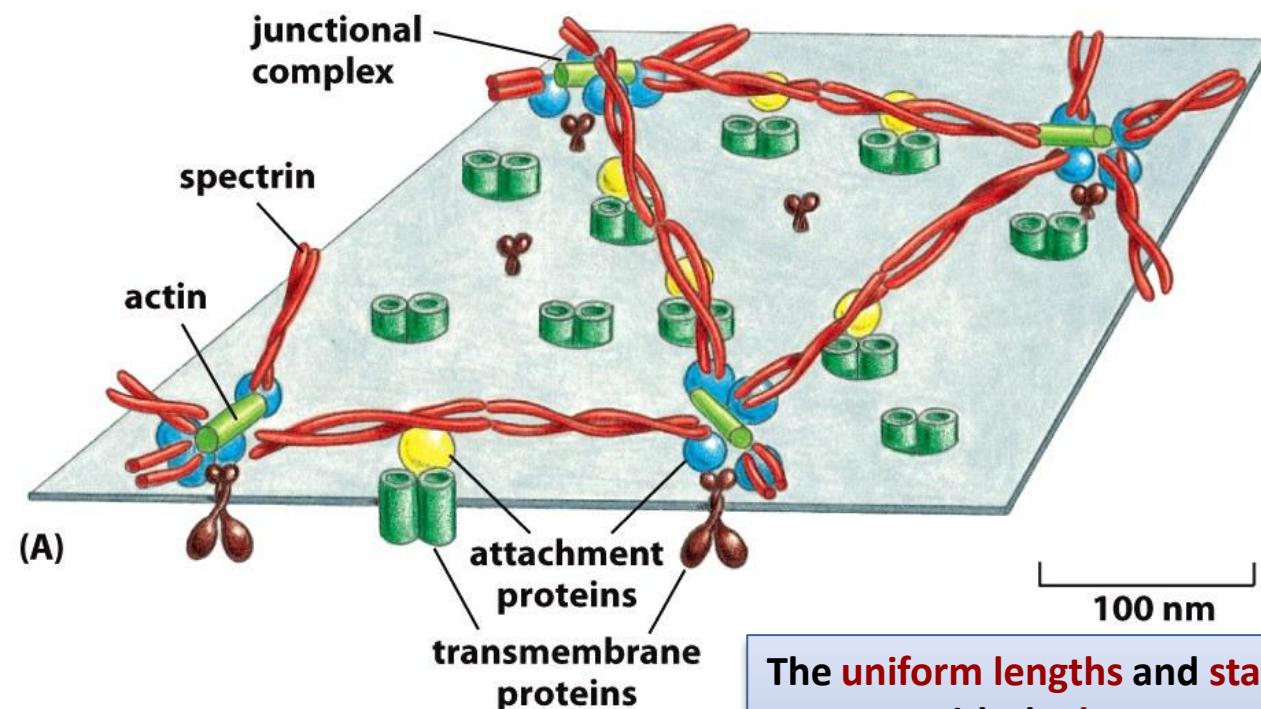
The **spectrin dimer–dimer interaction** and the **spectrin–actin–protein 4.1R junctional complex** play a key role in regulating **membrane deformability** and **membrane mechanical stability**.

Weakening of either of these lateral interactions results in **elliptocytosis** and decreased membrane **mechanical stability** leading to **membrane fragmentation**



# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

A particularly striking feature is the precise and uniform lengths of the actin filaments, which are all 33-37 nm long, consisting of 15-18 subunits. These short actin filaments are extraordinarily stable, persisting for the lifetime of the RBCs (120 days in humans )

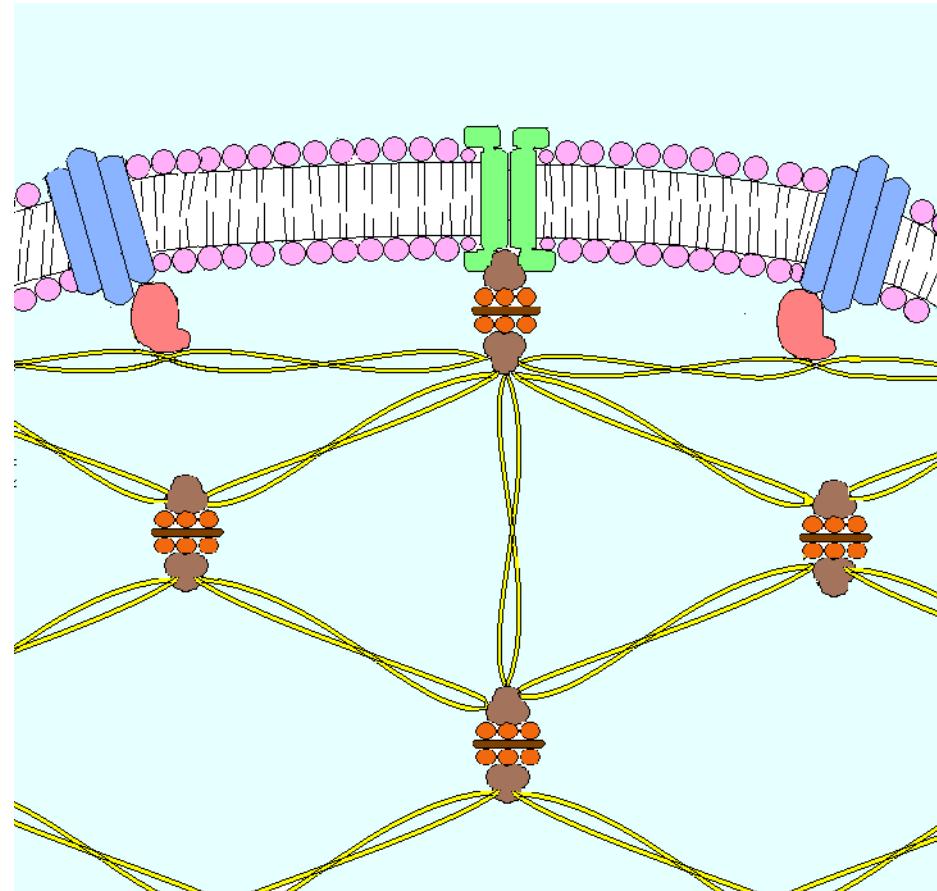


The **uniform lengths and stability** of RBC actin filaments contrast with the **heterogeneity and rapid turnover** of actin filaments in the cytoskeletons of motile and proliferating cells.

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

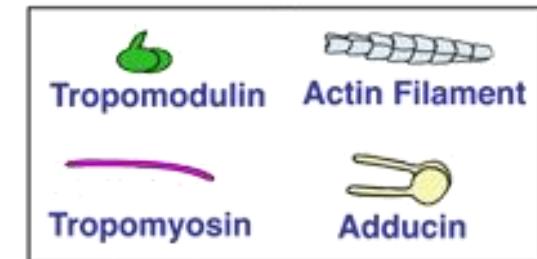
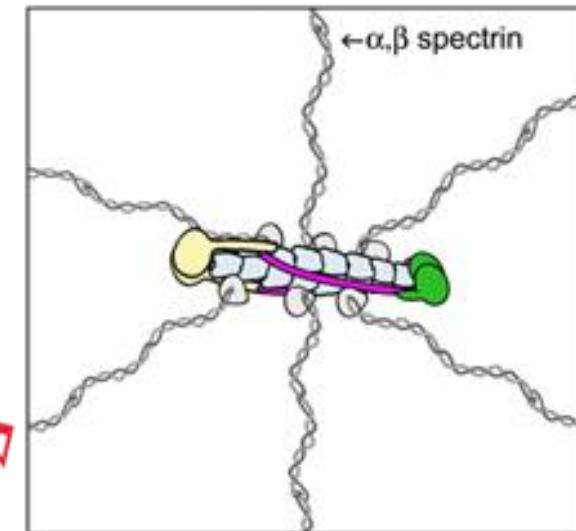
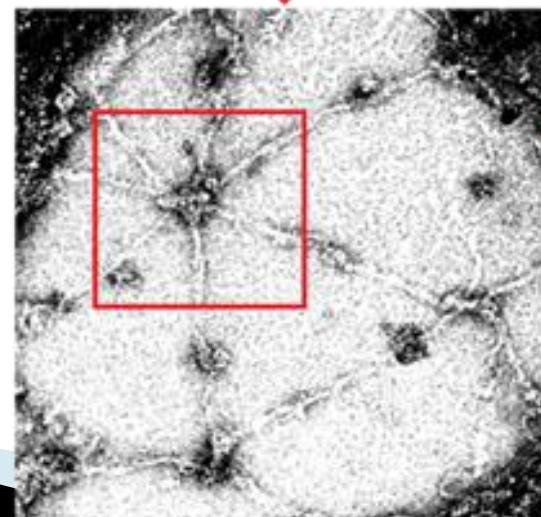
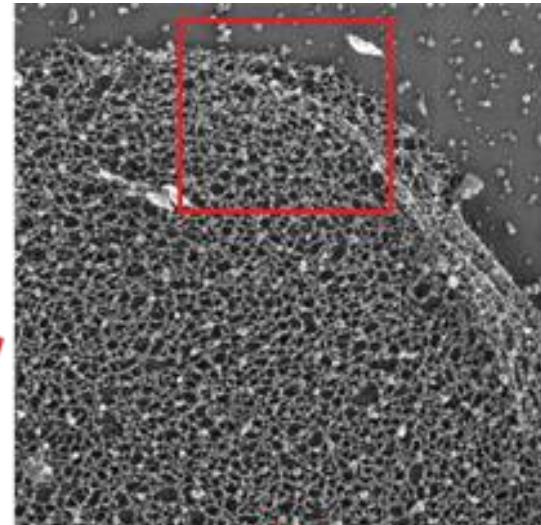
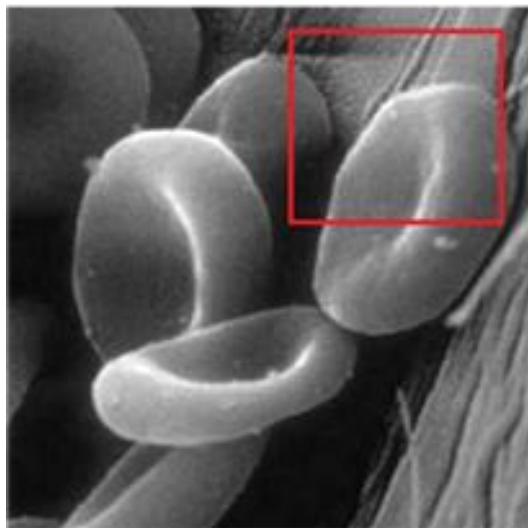
Unusual properties of RBC actin filaments (**flexibility** and **stability** on the RBC membrane skeleton)

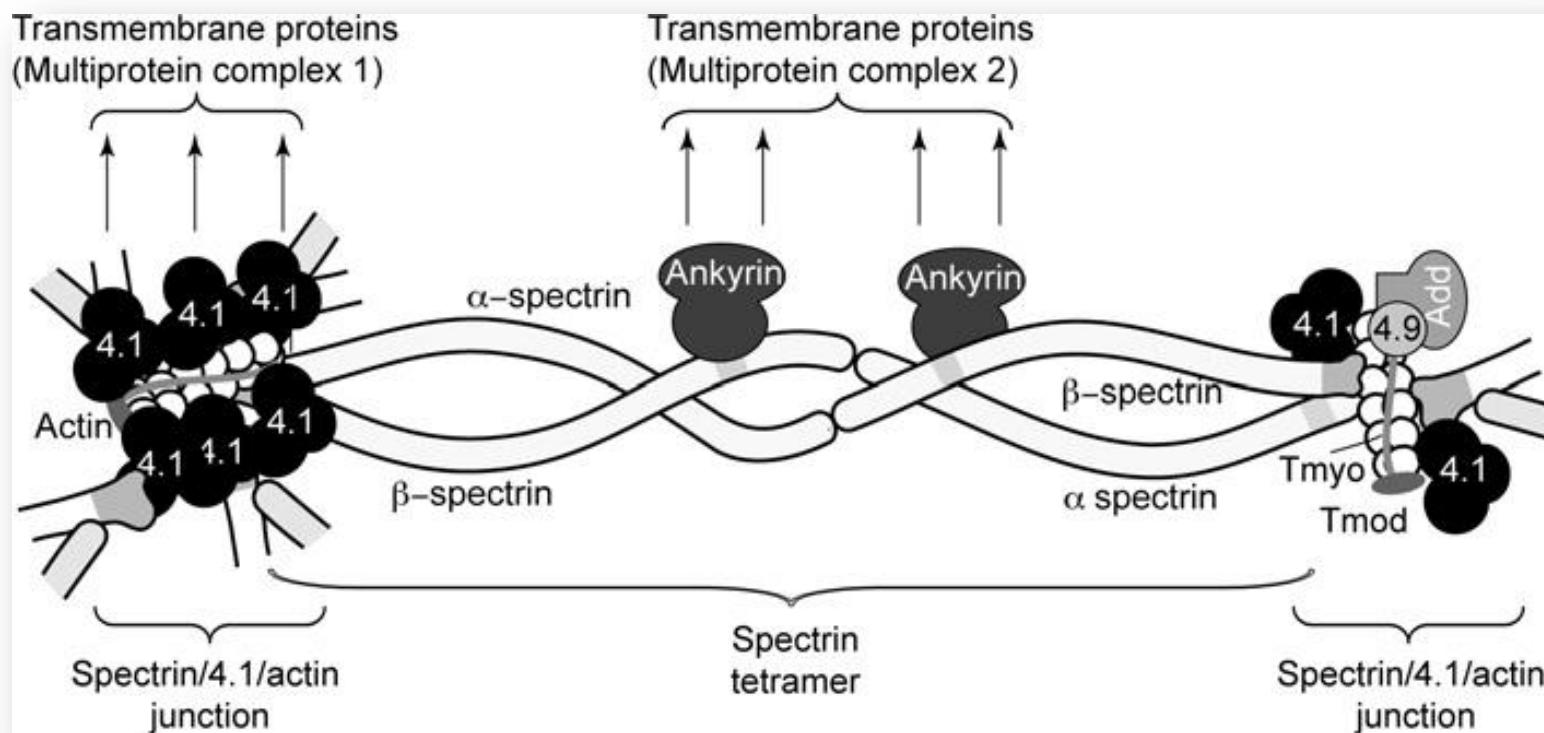
- 1) specialized assembly
- 2) regulation



# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

Tropomodulin (Tmod) caps their pointed ends  
adducin caps their barbed ends  
and the actin-stabilizing protein, tropomyosin (TM), binds along their lengths





- The interaction of **Sp** with **actin** is promoted by **protein 4.1** (JC-other proteins tropomyosin, tropomodulin (Tmod), adducin and **4.9 (dematin)**).
- **Protein 4.1** binds numerous membrane proteins  $\Rightarrow$  JCs act as scaffolds for the assembly of multiprotein complexes.
- **Adducin and dematin** together bind other membrane proteins, so contribute further components to the multiprotein complexes.
- Each **spectrin  $\beta$ -chain** has an **ABS**. Each **ankyrin** is multivalent for membrane proteins, so ankyrin coordinates the formation of another multiprotein complex.

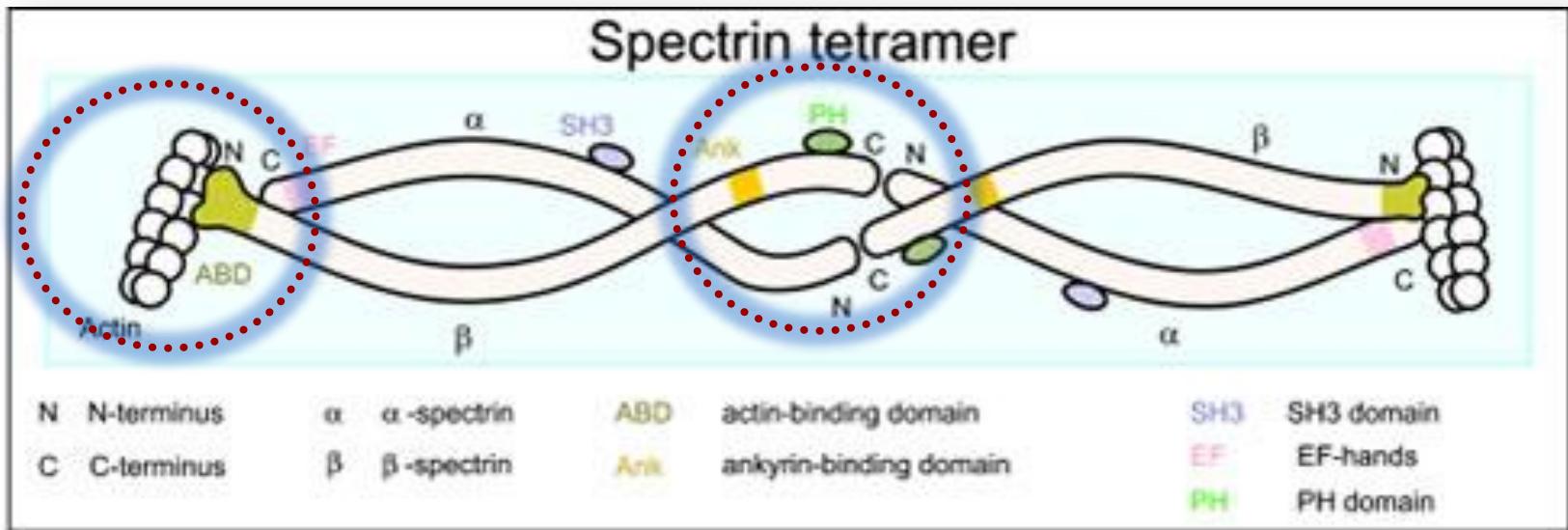
# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ

- Εκτεταμένο, γραμμικό, εύκαμπτο, ελαστικό αρθρωτό, πολυλειτουργικό μόριο
- Spectrin is composed of two nonidentical subunits, **aI** (molecular weight 280 000) and **bI** (240 000) which intertwine to form **heterodimers**.

Dimers self-associate head to head to form tetramers

Each extremity of tetramers binds actin microfilaments via b-spectrin, allowing spectrin to form cross-links between actin filaments, thus generating an extended network.

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ



- $\alpha, \beta$  υπομονάδες (genes: SPTA1, SPTB), ΑΥΤΟΣΥΓΚΡΟΤΟΥΜΕΝΕΣ σε διμερή, τετραμερή
- SpD: Πλευρική και αντιπαράλληλη σύνδεση ( $\alpha\beta$ )
- SpT: Head-to-head of 2 ( $\alpha\beta$ ) → tetramer  $\alpha_2\beta_2$

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ

- ❖ **αρχετυπικό μέλος** υπεροικογένειας Sp και **δικτύων Sp** σε άλλα κύτταρα, υποκυτταρικά οργανίδια και ιστούς (**dystrophin, actinin, utrophin**)
- ❖ **Αρχαίες πρωτεΐνες**, αλλά στην εξελιγμένη τους μορφή υπάρχουν μόνο στα **μετάζωα**- wide distribution in all metazoan cells
- ❖ **κύριο συστατικό πολλών μεμβρανικών σκελετών** Επιθήλια, νευρικό σύστημα, Golgi, ER, vesicles, nucleus κλπ
- ❖ **Mammals:** different **spectrin isoforms** - extensive **mRNA splicing** from **7 genes**
- ❖ Some **isoforms** have a specific **expression** according to **cell type** or to **cell organelle** with very specific **functions**- (tissue- and developmental stage time-specific)
- ❖ Στο **σκελετικό** μυ και πιθανόν στο σύμπλεγμα Golgi υπάρχουν **ομοπολυμερή β-σπεκτρίνης**

❖ Spectrin functions can be regulated by posttranslational modifications

Invertebrates have a smaller repertoire of spectrin genes

# ΣΤΕΚΤΡΙΝΗ

**Table 1** Spectrin genes and their expression in mammalian tissue

Subunit	Gene	Chromosome	Tissue expression
<i>Homo sapiens</i>			
αI	<i>SPTA1</i>	1q21–q23	Isoform αΙΣ1 RBC and isoform (αΙΣ*) in brain
αII	<i>SPTAN1</i>	9q33–q34	Several isoforms present in all non-erythroid cells
βI	<i>SPTB</i>	14q22–q23.2	βΙΣ1 erythrocytes, βΙΣ2 isoforms in brain and muscle, βΙ-spectrin was also detected in lymphocytes
βII	<i>SPTBN1</i>	2q21	All nucleated cells
βIII	<i>SPTBN2</i>	11q13	Golgi and vesicular membrane skeletons, plasma membrane in neurons and epithelial cells
βIV	<i>SPTBN4</i>	19q13.13	Neurons (axon, initial segment, nodes of Ranvier) and pancreatic islets, nucleus
βV	<i>SPTBN5</i>	15q21	Low level in many tissues, outer segments of photoreceptor rods and cones, basolateral membrane of gastric epithelial cells and outer hair cell (OHC)

*Machicka et al., Cell Mol Life Sci 69:191;2012*

# ΣΤΕΚΤΠΙΝΗ

New issue: April 14th 2014



**Jones et al.** describe the architecture of the axon initial segment, a specialized structure that maintains neuronal polarity by preventing axonal proteins from mixing with components of the cell body and dendrites. As summarized [here](#), the researchers use platinum replica electron microscopy to reveal that the segments consist of microtubule bundles surrounded by a dense coat of cytoskeletal proteins such as ankyrin G and spectrin  $\beta$ IV, which may form a barrier to restrict the diffusion of axonal membrane proteins.

**Table 2** Examples of spectrin functions in cellular processes and signaling

Spectrin isoforms	Function in cellular processes/signaling
$\alpha$ I	Supports <u>RBC shape</u> and maintains cell membrane integrity and its <u>mechanical properties</u>
$\alpha$ II	Engaged in maintaining <u>cell architecture, morphology, and plasma membrane stability</u> Engaged in regulation of neurite outgrowth stimulated by NCAM Participates in the <u>organization of specialized membranes</u> —TRPC4 channels Engaged in <u>cell adhesion</u> and spreading, regulation of actin dynamics Modifies <u>cell cycle</u> by altering <u>cell adhesion</u> Engaged in DNA interstrand cross-links repair, connected to maintaining <u>chromosomal stability</u>
$\beta$ I	Supports <u>RBC shape</u> and maintains cell membrane integrity and its mechanical properties Contributes to the formation of TCR complexes in lymphocytes Involved in early cellular <u>apoptotic events</u>
$\beta$ II	Engaged in cell morphology and <u>mechanical properties</u> , compaction and accumulation of E-cadherin in the <u>epithelial cell-cell contact</u> <u>Delivery of proteins and phospholipids to the membrane</u> Cell cycle regulation by involvement in <u>TGF<math>\beta</math> signaling</u>
$\beta$ III	Participates in the organization of the glutamate transporter EAAT4 in Purkinje cells Facilitates <u>membrane protein transport</u> via the secretory and endocytic pathways
$\beta$ IV	Regulates <u>localisation of voltage-gated channels</u> at the axon initial segment and node of Ranvier, synchronizes action potentials, provides multifunctional regulatory platform for sodium channels, plays an important role in the structure and stability of excitable membranes in <u>heart and brain</u> Involved in <u>targeting of critical structural and regulatory proteins</u>
$\beta$ V	Engaged in <u>cell flexibility</u> Engaged in OHCs' electromotility

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ–non erythroid functions

## Spectrin-based skeletons

(1) Ρύθμιση κυτταρικής μορφολογίας – μηχανικών ιδιοτήτων

(2) οργάνωση εξειδικευμένων μεμβρανών-Δομική πλατφόρμα για μικρο-διαμερισματοποίηση μεμβράνης

(3) Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου (by regulating the expression of membrane receptors or by altering cell adhesion) και επιδιόρθωσης DNA

(Mutations in **βII** lead to susceptibility to **tumorigenesis** (deregulation of cell cycle control))

(After damage, **all-spectrin** binds to **DNA** at the sites of damage and acts as a scaffold, contributing to the recruitment of **repair proteins**. Moreover, all-spectrin is involved in maintaining **chromosomal stability**)

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ-non erythroid functions

## Spectrin-based skeletons

### (4) Sp-actin: κυτταρική προσκόλληση και διασπορά

(modified expression of some integrins)

### (5) Έλεγχος ενεργοποίησης διαμεμβρανικών πρωτεΐνών

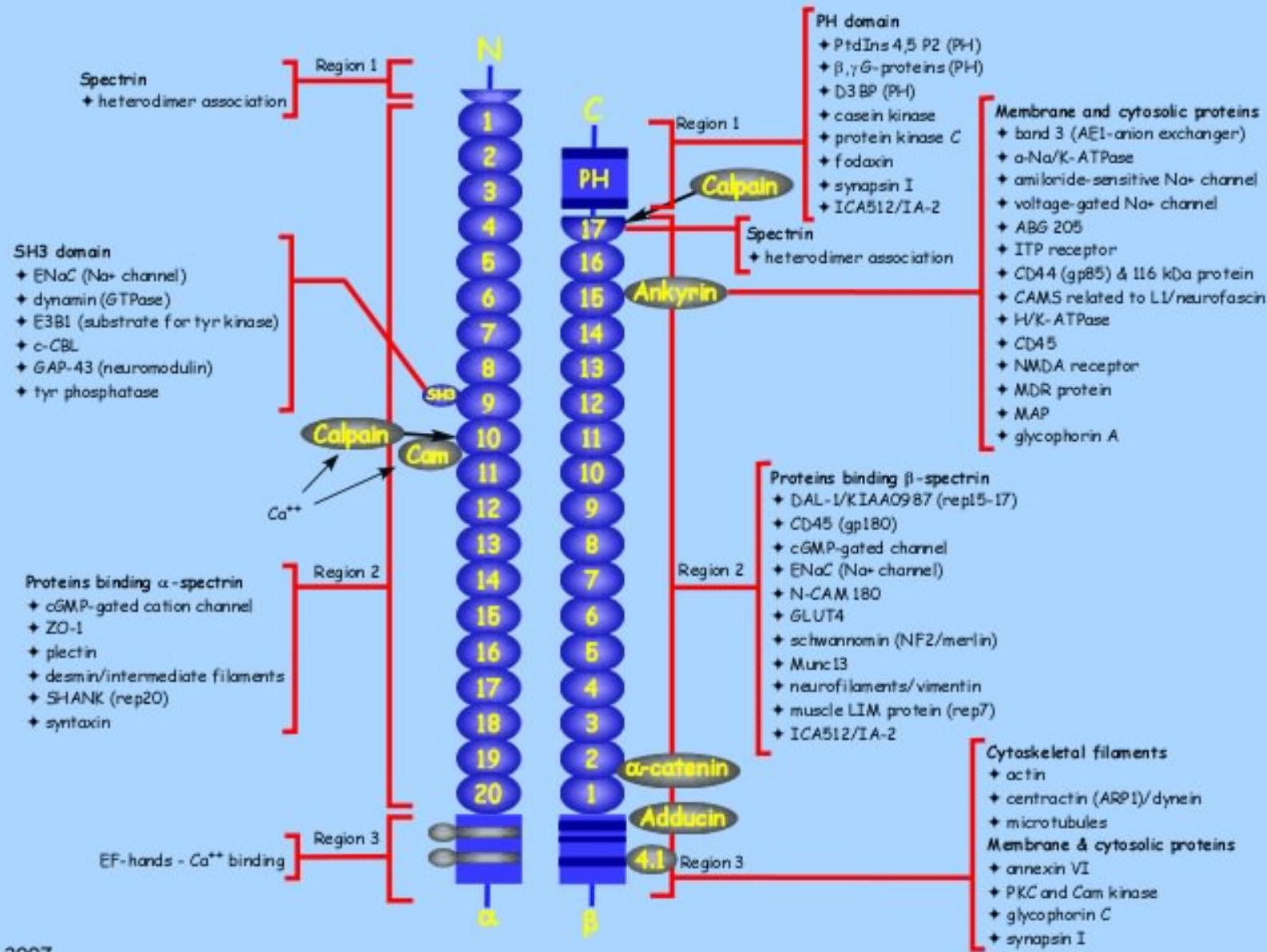
(contribution to the formation of **TCR (T cell receptor) complexes in lymphocytes**-In lymphoid-derived cell lines, spectrin is distributed in the **cytoplasm** (as large aggregates)-Recruitment to the **PM** is required for initiation of the signal transduction/TCR clustering/immunological synapses) (**Spectrin aggregation** may also be associated with early cellular **apoptotic events** preceding a loss of membrane **aminophospholipid asymmetry**)

### (6) Αλληλεπίδραση με πρωτείνες που εμπλέκονται σε ενδοκυττάρια μεταφορά

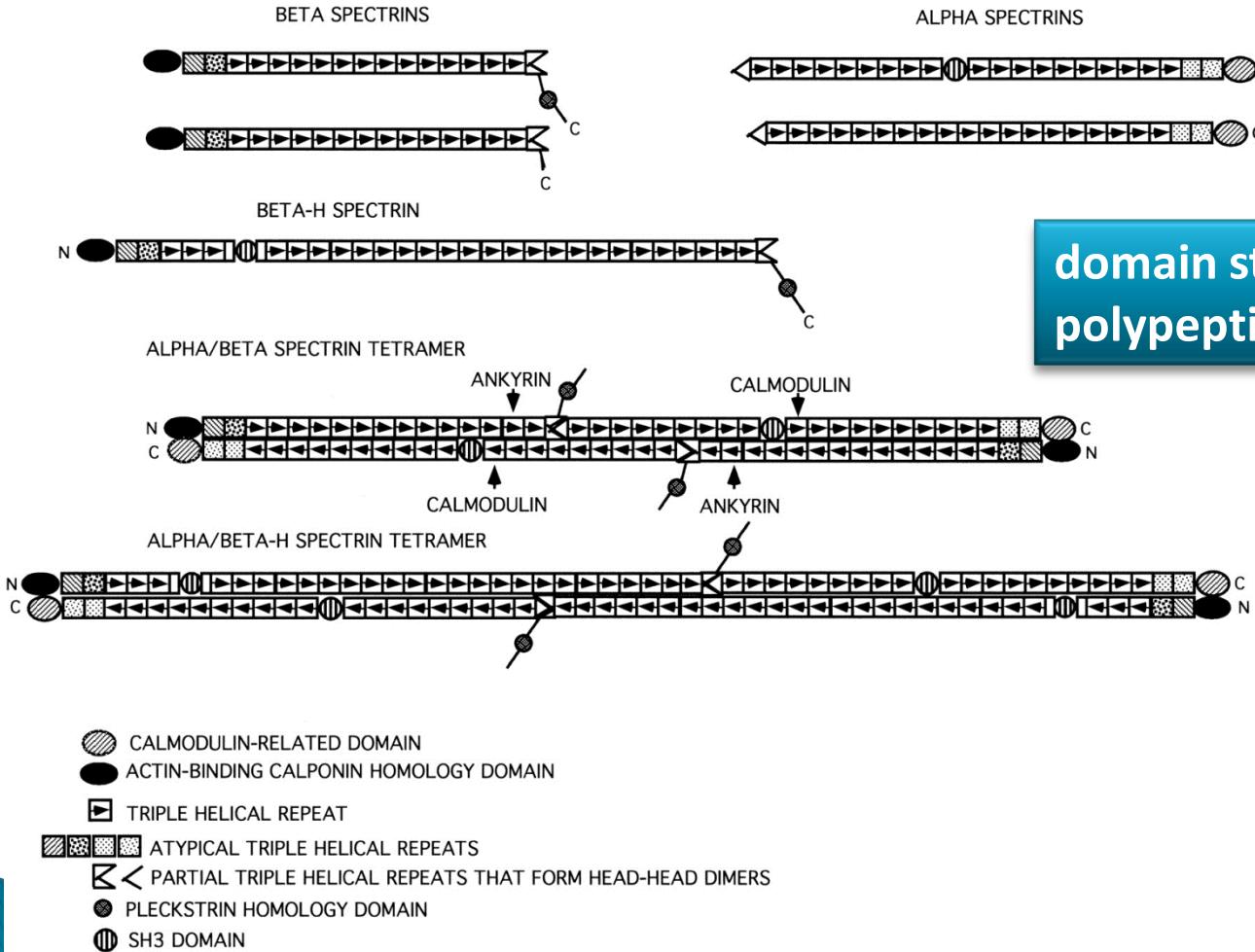
(facilitation of membrane protein transport via the **secretory** and **endocytic** pathways - **binding to the dynactin**)

*Machicka et al., Cell Mol Life Sci 69:191;2012*

# Spectrin: a family of multifunctional proteins

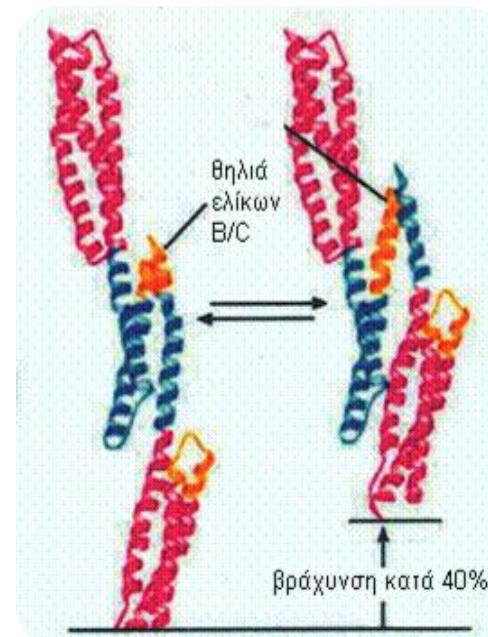
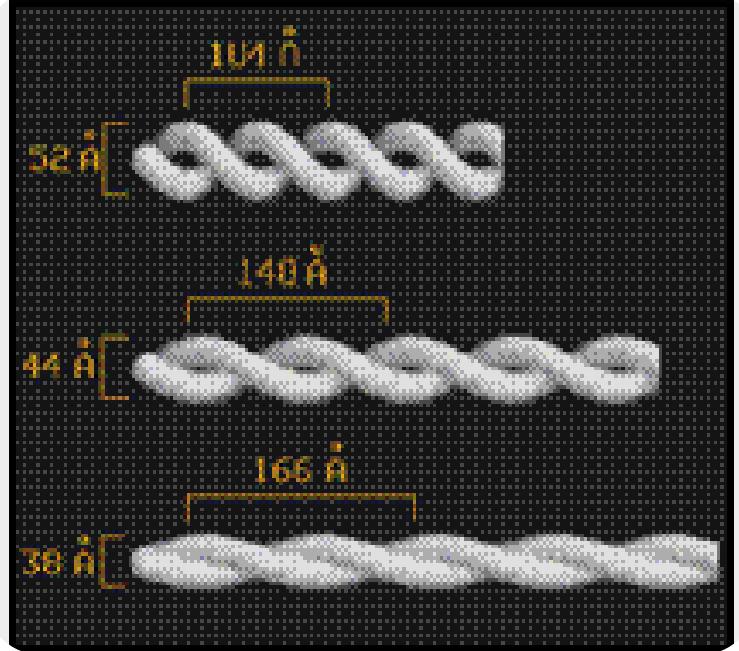


# ΣΤΕΚΤΡΙΝΗ



domain structure of spectrin  
polypeptides and proteins

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ



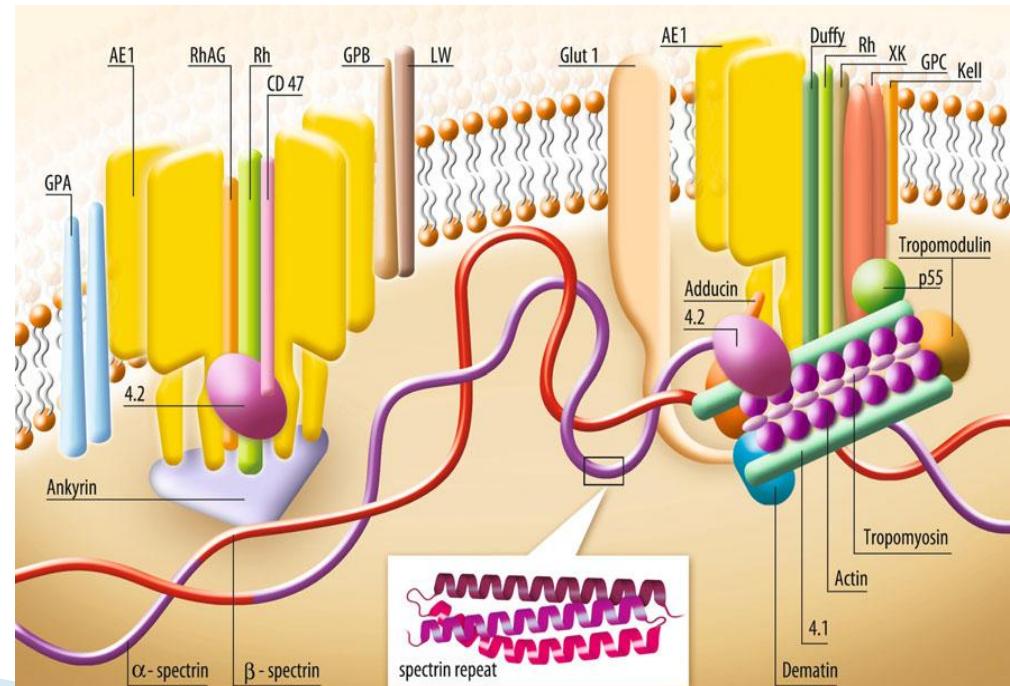
Μοριακό ελατήριο προσαρμοζόμενου μήκους

Διμερή: 29-37 nm *in situ*, 100 nm σε έκταση  
Τετραμερή: 200-260 nm

# ΣΤΕΚΤΡΙΝΗ

Despite the diversity of the genes/isoforms, each spectrin subunit is made up of a succession of triple helical motifs called **spectrin repeats** (roughly 106 amino acid residues long)

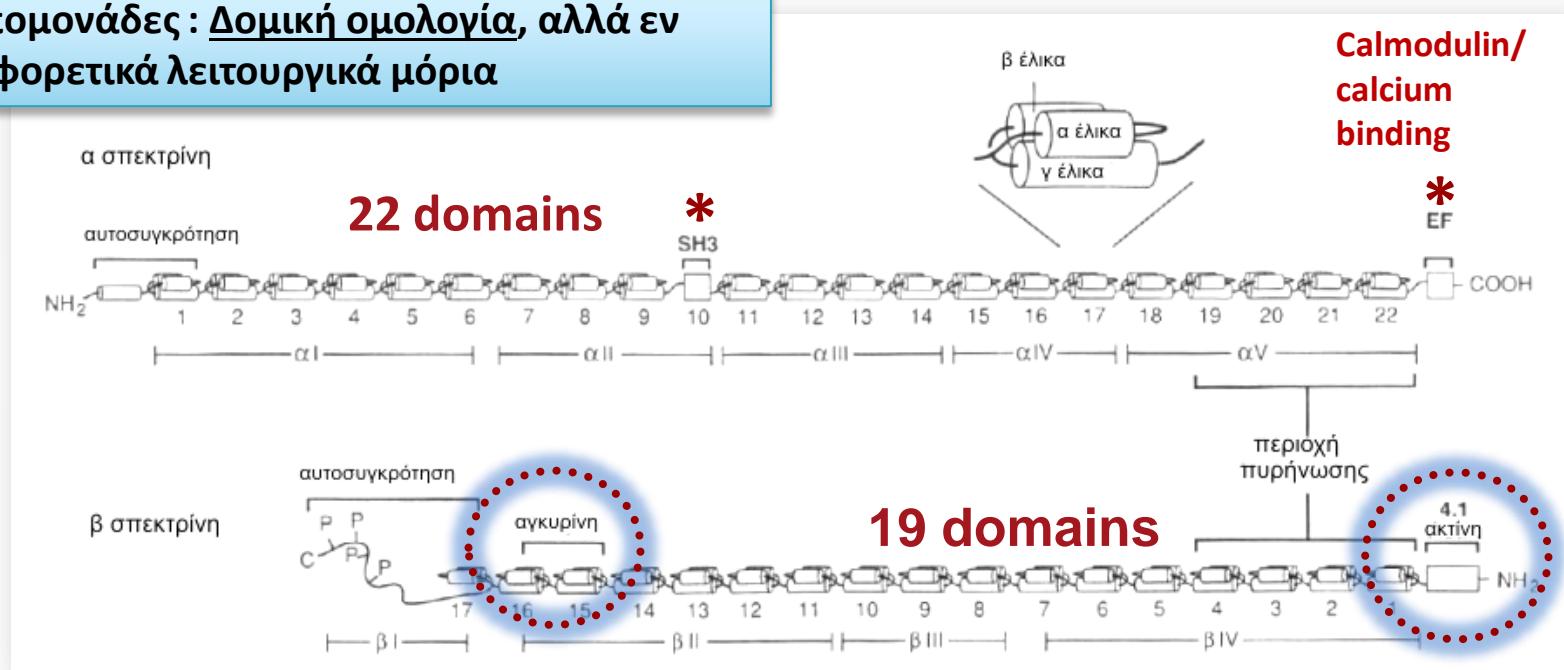
Machicka et al., *Cell Mol Life Sci* 69:191;2012



# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ

Κάθε υπομονάδα οργανώνεται σε τρεις περιοχές: σε δύο μη-ομόλογα άκρα και σε μία **κεντρική περιοχή** αποτελούμενη από πολλαπλές επαναλήψεις δομής τριπλής α-έλικας.

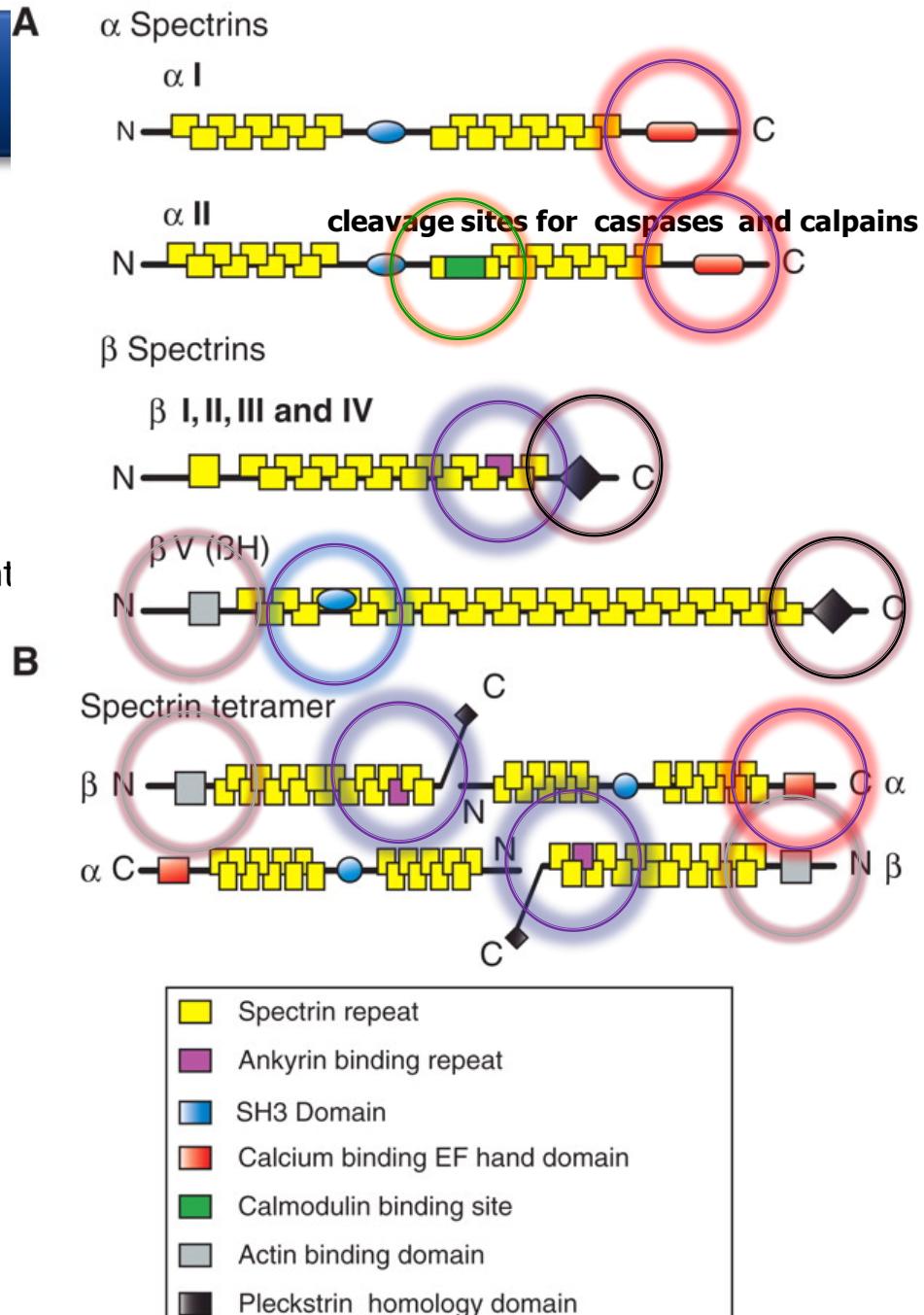
α και β υπομονάδες : Δομική ομολογία, αλλά εν μέρει διαφορετικά λειτουργικά μόρια



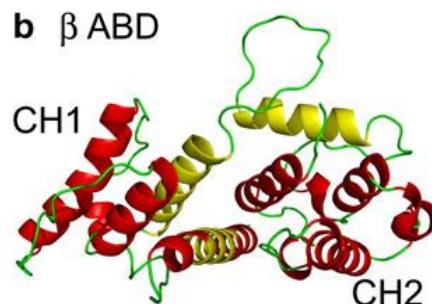
Οι τριπλές έλικες σταθεροποιούνται από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε **υδρόφοβα κατάλοιπα** που βρίσκονται σε συγκεκριμένες **αποστάσεις** μεταξύ τους ακολουθώντας ένα **επαναλαμβανόμενο πρότυπο**

# Domain structure and variants of spectrin proteins

- Spectrins are comprised of **modular units** called **spectrin repeats (yellow)**.
- Domains: **ankyrin binding domain (purple)**  
**Src-homology domain 3 (SH3, blue)**  
**EF-hand domain (red)**  
**calmodulin-binding domain (green)**  
promote **interactions** with **binding targets** important for **spectrin function**
- **pleckstrin homology domain (black)**: promotes association with the **PM** (PI binding)
- **actin binding domain (grey)** tethers the spectrin-based membrane skeleton to the underlying actin cytoskeleton.
- ❖ The **spectrin tetramer** is the fundamental **unit** of the spectrin-based membrane skeleton.

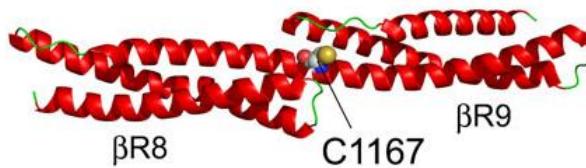


# ΣΤΕΚΤΠΙΝΗ



**Actin-binding domain.** Sequences equivalent to known actin binding sites in utrophin are shown in yellow. Note that this structure also binds [4.1](#) and [PIP](#)

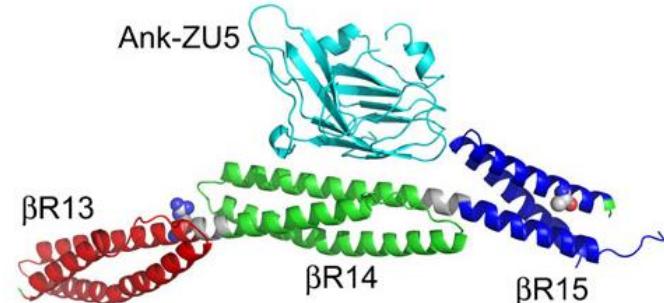
c β Repeats 8-9



## The structure of two spectrin triple helical repeats.

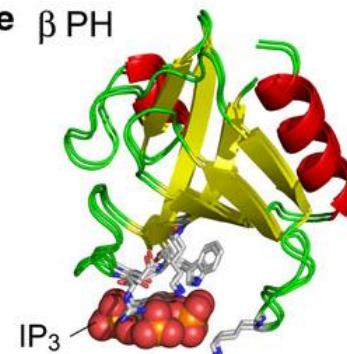
(repeats 8–9 of βI-Sp). C1167, in the linker region between the two tandem triple helices: this residue becomes available to chemical modification when RBC membranes are subject to shear stress)

d Spectrin-Ankyrin complex



**structure of the interactive domains in Sp and ankyrin.** The binding site in β-spectrin for ankyrin is located in repeats 14–15. The region in ankyrin that binds spectrin is the ZU5 domain. Two residues which when mutated give rise to **HPP** are indicated: these destabilise spectrin repeats adjacent to the binding site.

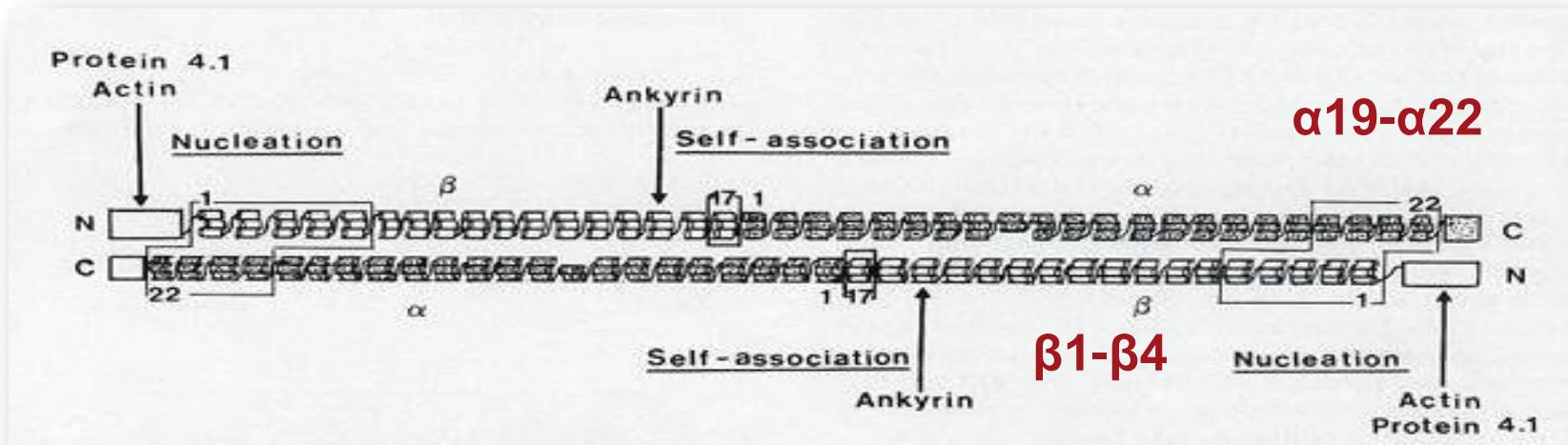
e β PH



**Pleckstrin homology domain- with IP<sub>3</sub> bound**

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ

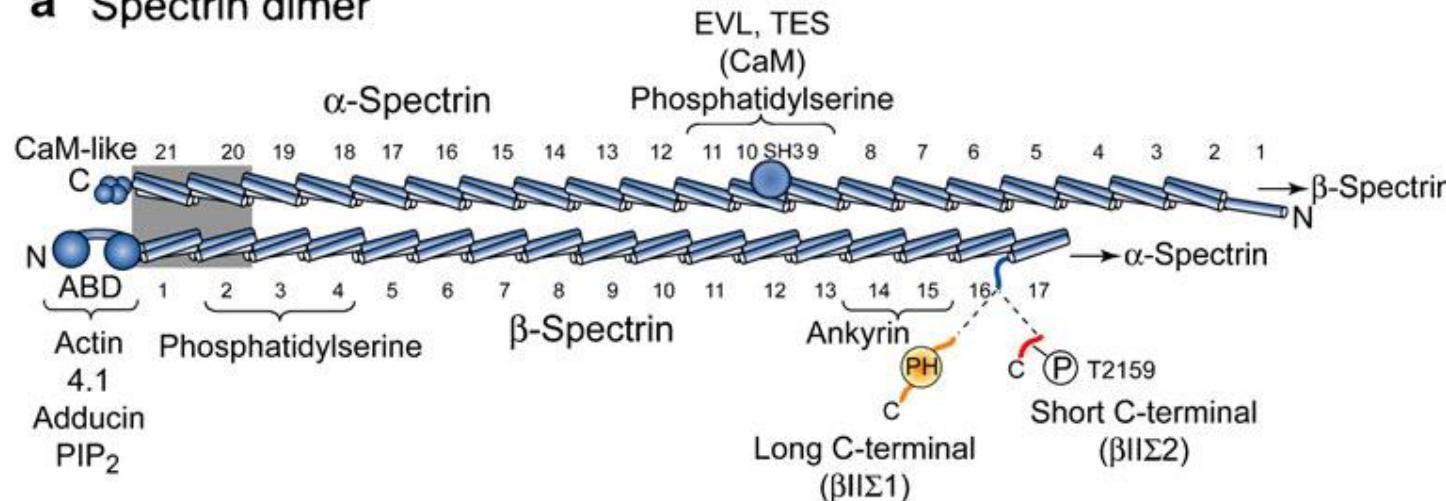
## Πυρήνωση ετεροδιμερούς



Αρχικά αναπτύσσονται **ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις** ανάμεσα σε α και β-υπομονάδες στη θέση πυρήνωσης οι οποίες εξασφαλίζουν το ζευγάρωμα στη σωστή φάση των τριπλετών κατά μήκος του διμερούς. Μετά την αρχική διασύνδεση, το διμέρες σταθεροποιείται από **υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις** ανάμεσα στις έλικες (ασθενείς, αλλά πολλές), και περιελίσσεται η μία υπομονάδα γύρω από την άλλη σα σχοινί.

# ΣΤΕΚΤΡΙΝΗ

## a Spectrin dimer



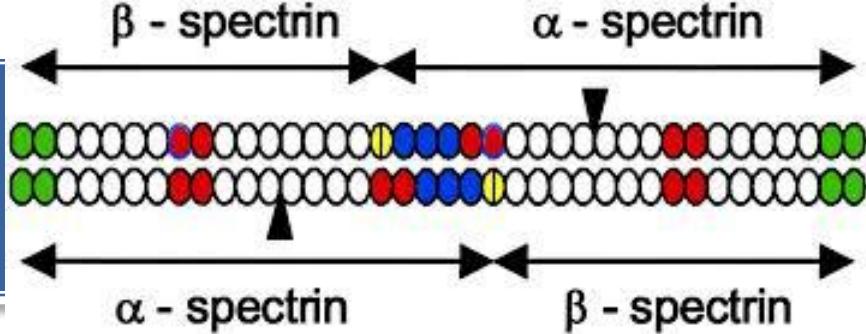
Baines AJ. Protoplasma 244:99; 2010

Spectrin  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains associate side-by-side and antiparallel.

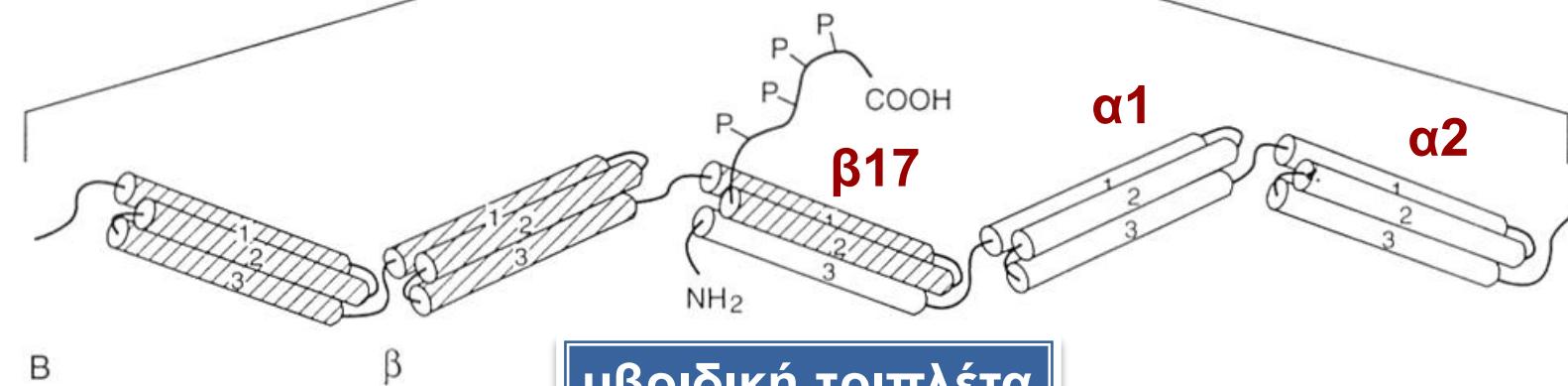
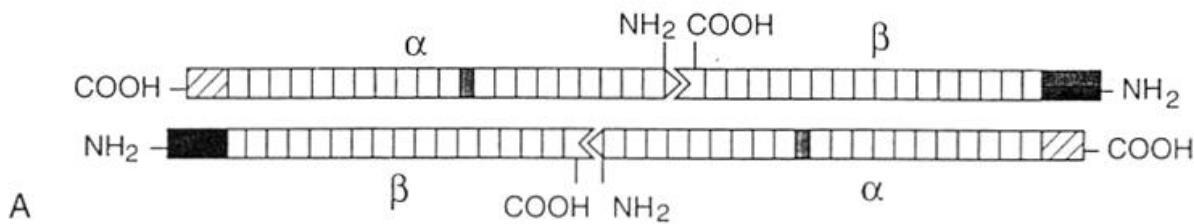
Sites of interaction between the chains are indicated with a grey box.

Some examples of protein and lipid interaction sites are also annotated.

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ



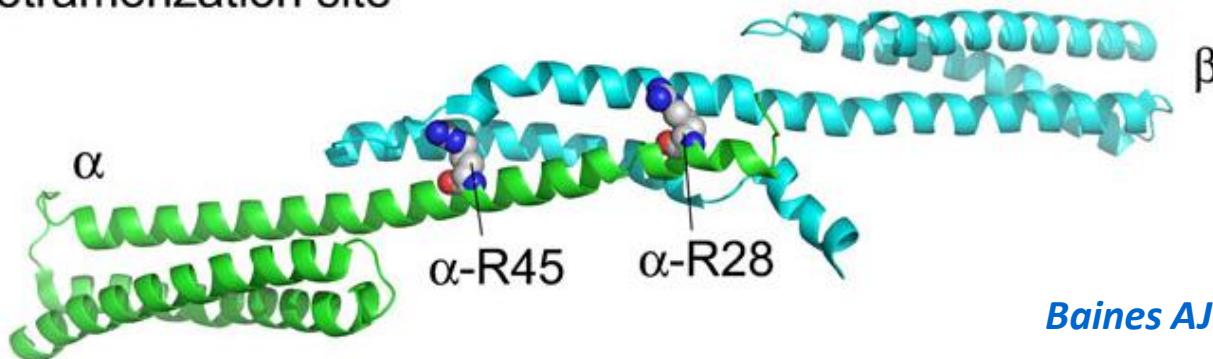
## Αυτοσυγκρότηση ετεροτετραμερούς



Μη-ομοιοπολική διασύνδεση, ενδογενής ιδιότητα (Hb)

# ΣΤΕΚΤΡΙΝΗ

f Tetramerization site



Baines AJ. Protoplasma 244:99; 2010

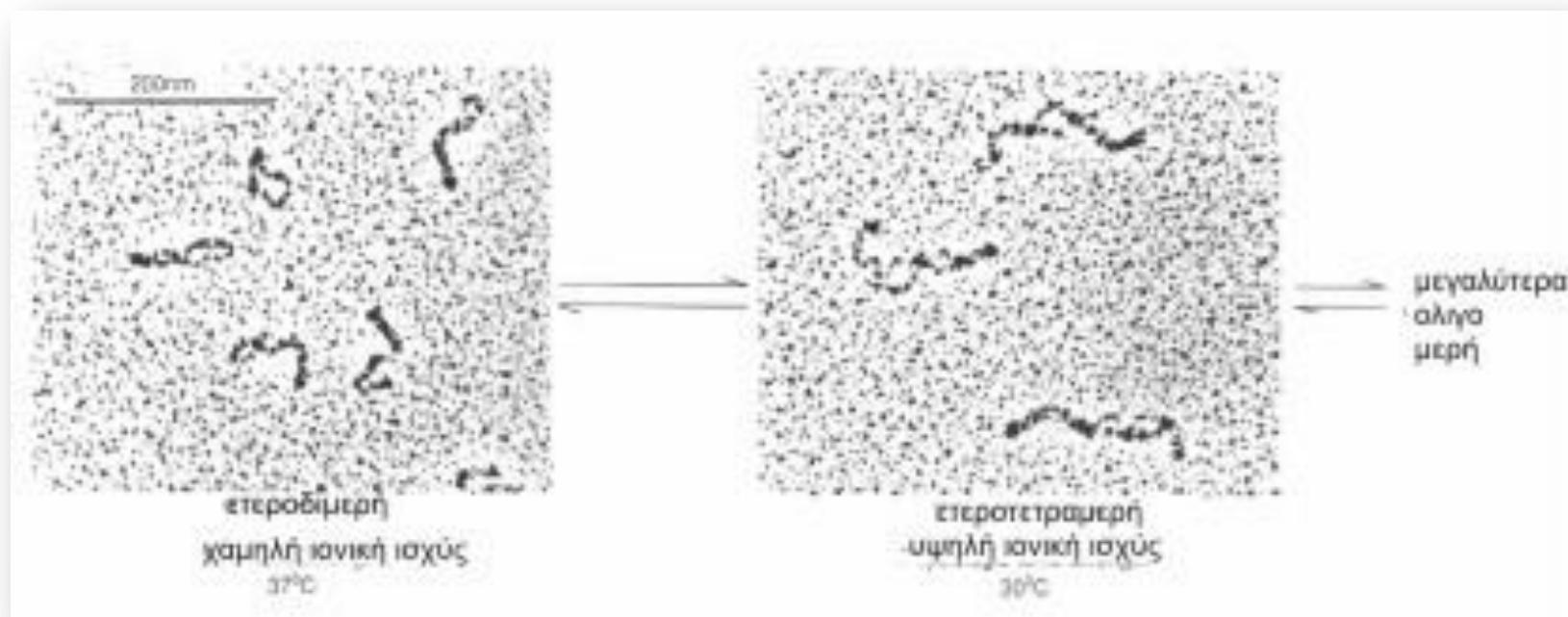
To form a spectrin tetramer by the interaction of two dimers, a single helix from  $\alpha$  interacts with **two helices** from  $\beta$  to recapitulate a **full triple helix**.

Two residues which when mutated disrupt the formation of tetramers are indicated: mutations at these sites can result in **elliptocytosis**.

Σε ασθενείς με **HE** ή **HP (HPP)**, οι μεταλλαγές εντοπίζονται κυρίως στη συγκεκριμένη περιοχή ή κοντά σε αυτήν ([Delaunay, 1995](#)).

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ

- Οι σπεκτρίνες είναι μόρια **αυτοσυγκροτούμενα**, υψηλή συγγένεια αλληλεπίδρασης
- Τα **TSp** είναι η φυσιολογική μορφή συγκρότησης της Sp στο Sk (HE)



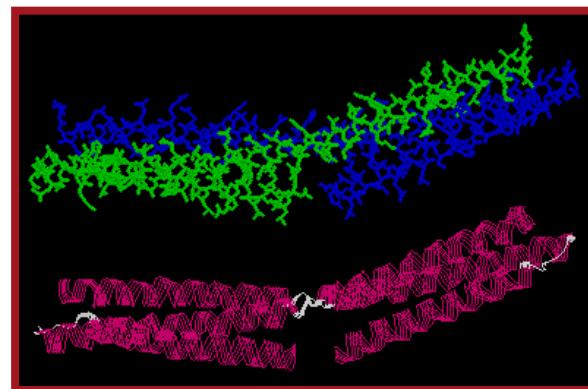
(Lux et al., 1995)

# ΣΠΕΚΤΡΙΝΗ

*In vivo* (37oC) ευνοούνται τα TS<sub>ρ</sub> λόγω πολύ υψηλής [Sp]

## Αυτοσυγκρότηση ετεροτετραμερούς

- pH
- Ιοντική ισχύ
- Θερμοκρασία
- Συγκέντρωση Sp



**Υψηλής-συγγένειας Sp-Ank**  $\Rightarrow$  τοπικές  $\uparrow$  [Sp] υπομεμβρανικά που ευνοούν τον ολιγομερισμό

Αντίθετα, η διασύνδεση **Sp-actin είναι χαμηλής συγγένειας** (μη-αυτοσυγκροτούμενη) και χρειάζεται την 4.1R

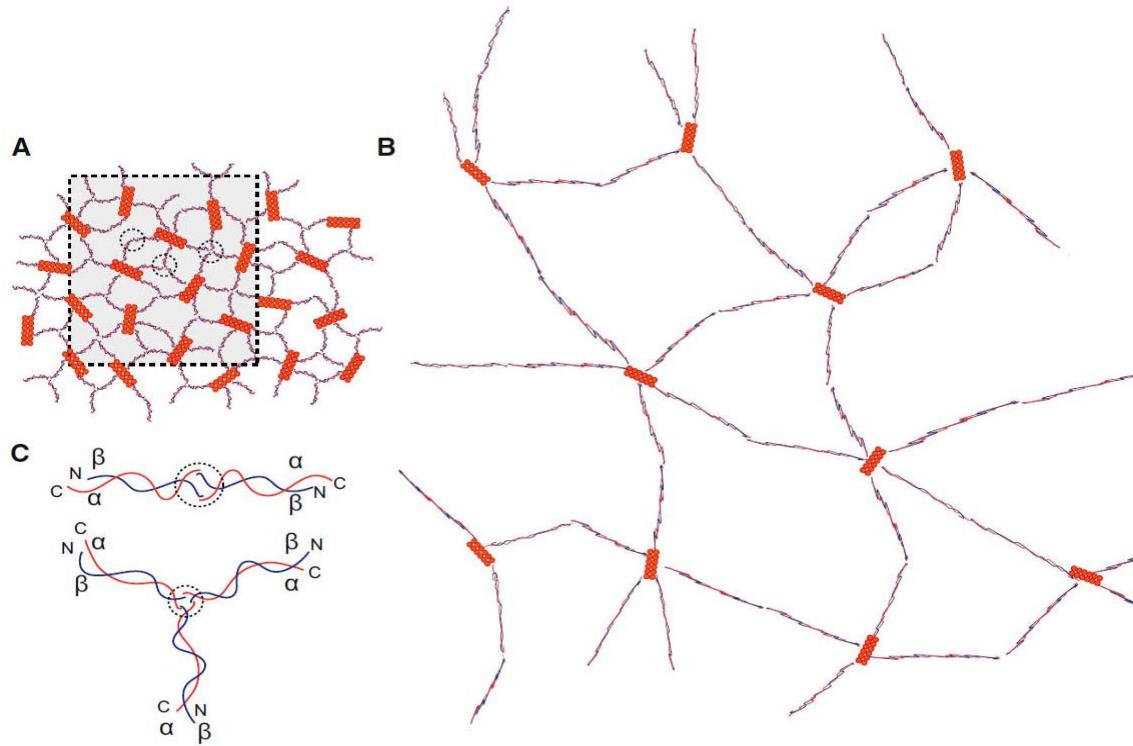
# ΣΤΕΚΤΠΙΝΗ

the **oligomeric state of spectrin (6Sp, 8Sp)** is in a dynamic equilibrium in the Sp network (transient formation of Sp oligomers) that facilitates remodeling of the network as the cell changes **shape** in response to **shear stress**.

*Nans et al., BIOPHYSICAL JOURNAL 101:2341, 2011*

# ΣΤΕΚΤΠΙΝΗ

(A) Higher-order tetramers, hexamers, and octamers are formed by self-association sites halfway between the junctional complexes (circles). These self-association sites are transient and that coupling between individual spectrin molecules is continually being reconfigured.



(B) expansion of the boxed region in A: Expansion produces a lower surface density of spectrin molecules- shift of higher-order spectrin oligomers (hexamers and octamers) toward the tetrameric form, which is fully extended.

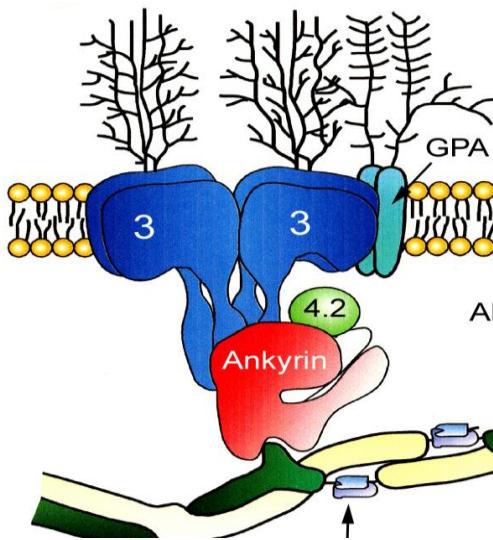
# ΣΤΕΚΤΡΙΝΗ

Spectrin has three main functions:

- Supporting** the lipid layer
- Maintaining **cell shape**
- Regulating the **lateral movement** of integral membrane proteins

# ΑΓΚΥΡΙΝΗ

Ankyrins are ubiquitous adapter proteins that target diverse proteins to specialized membrane domains of smooth muscles and endoplasmic reticulum



“Sp-receptor”

Πρωτεΐνη-συνδέτης (215 kDa), φωσφορυλίωση

Vertebrates have three ankyrin genes:

ANK1....ankyrin-R (**Restricted**, mammalian RBCs ankyrin)

ANK2... ankyrin-B (**Broadly expressed**)

ANK3....ankyrin-G (**Giant**)

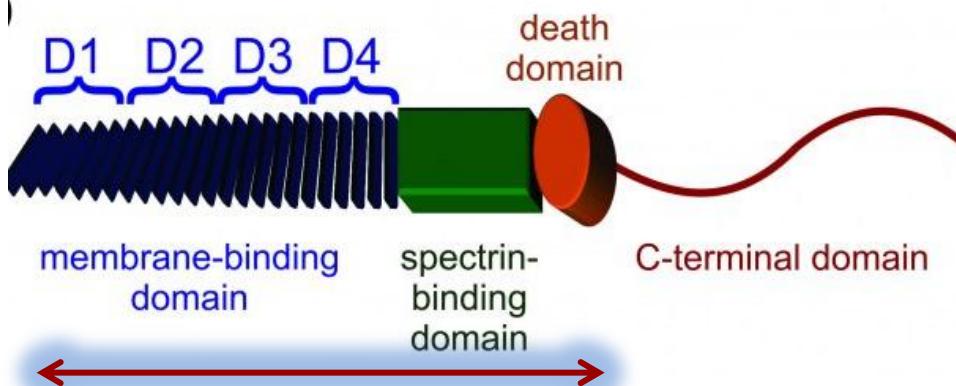
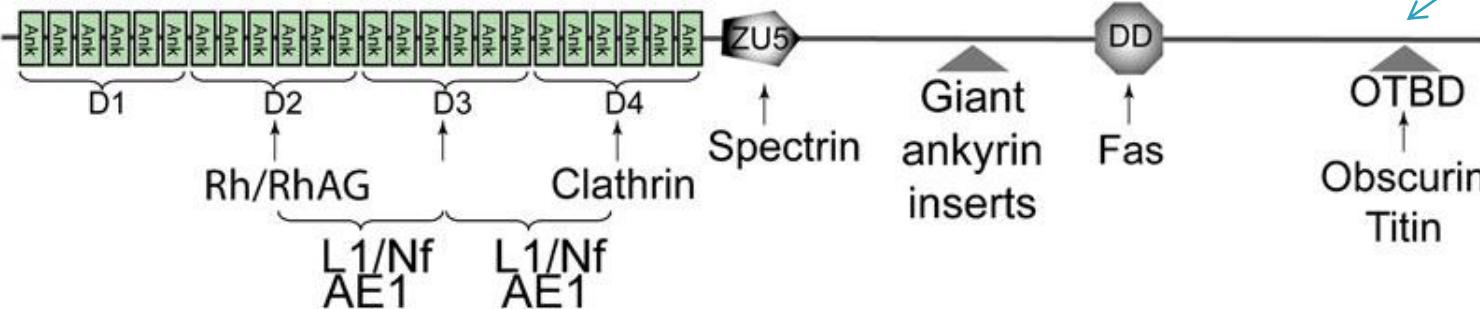
Ankyrins are subject to regulation by extensive differential mRNA splicing, but their canonical forms (about 200–250 kDa) have a common domain structure

# ΑΓΚΥΡΙΝΗ

Αρθρωτή (4 domains)

Extra domain in some muscle forms of ankyrin

## a Canonical ankyrins



These 3 domains common to all ankyrins

Baines AJ. *Protoplasma* 244:99; 2010

(-) ank  $\Rightarrow$  band 3 dimers

**Domain πρόσδεσης σε μεμβρανικές πρωτεΐνες  
24 αντίγραφα αλληλουχίας 33αα  
Επαναλήψεις ANK-divided into 4 domains D1-D4, with distinctive activities)**

**ZU5-domain binds Spectrin**

**Death-domain binds FAS**

**Regulatory domain**- interacts intra-molecularly with the **membrane binding domain** to modulate ankyrin's affinity for other binding partners. **COOH-domain** (εναλλακτ.μάτισμα)  
2.2\* ank (186 kDa), ανθρώπινη αγκυρίνη

# ΑΓΚΥΡΙΝΗ

## Domain structure and variants of ankyrin proteins

Death domain: the most highly conserved domain

Regulatory domain: the most variable region of ankyrins.

All ankyrins are subject to **alternative splicing**, which further increases their **functional diversity**.

### C Ankyrins



- Domains:
- Membrane binding domain (24 ANK repeats)
  - Spectrin binding domain
  - ZU5 Domain
  - Death domain
  - Regulatory domain
  - Inserted sequence

Canonical ankyrins: B, G and R



Neuronal variants: B and G



*D. melanogaster* giant Ank2



Bennett and Baines. *Physiological Reviews* 81: 1353; 2001

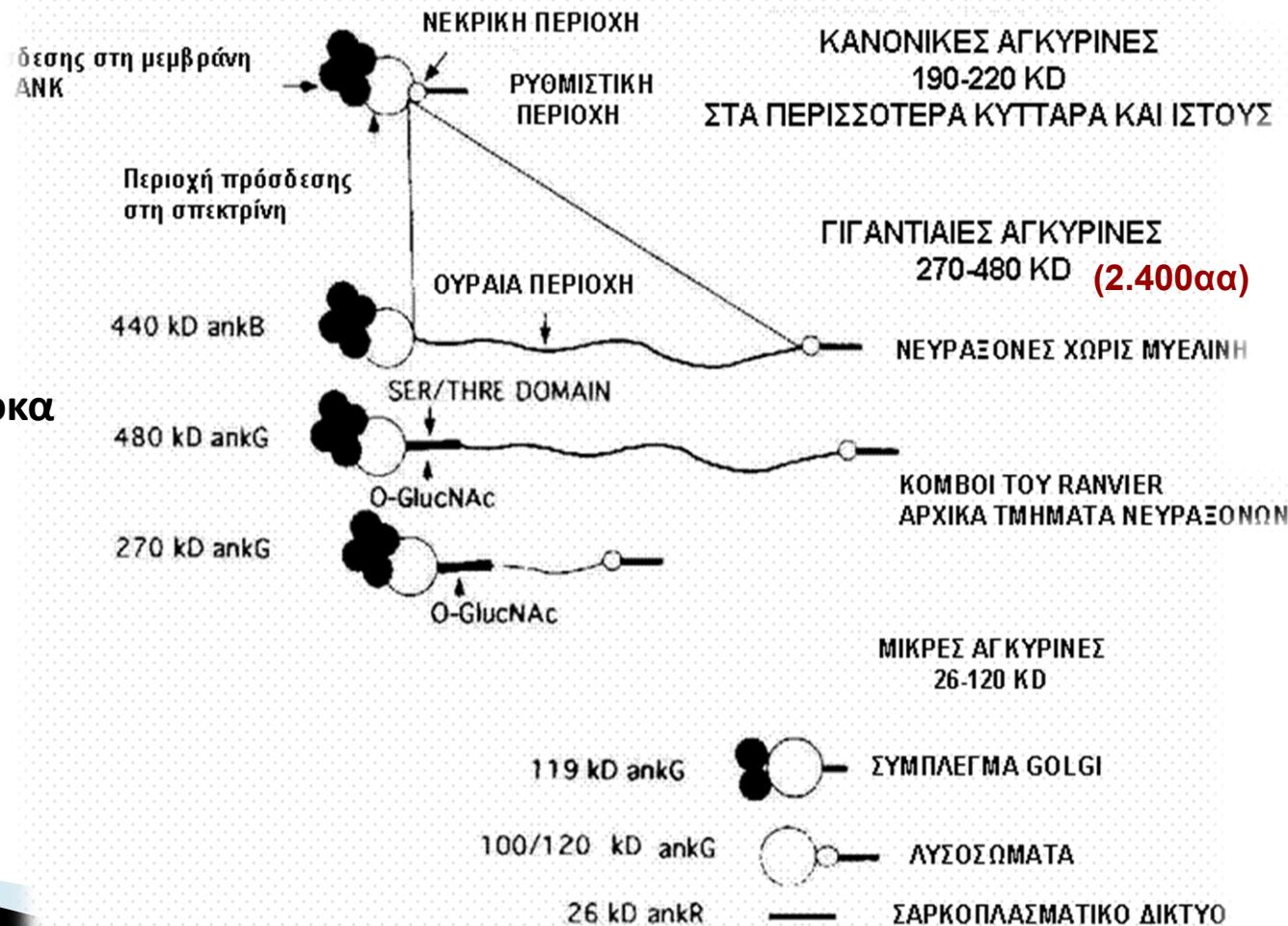
# ΑΓΚΥΡΙΝΗ

Σύνοψη των γονιδίων της αγκυρίνης στον άνθρωπο και των παραλλαγών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα.

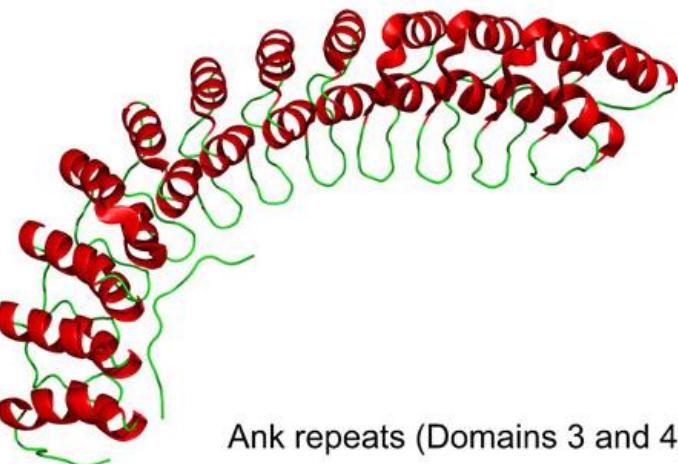
(Restricted, Broadly, Giant)

- Μεταγωγή σήματος
- Ενδοκυττάρωση
- Πολωμένη κατανομή πρωτεΐνων στη μεμβρ.

Γονίδια: ANKYRIN-R, ANKYRIN-B, ANKYRIN-G



# ΑΓΚΥΡΙΝΗ

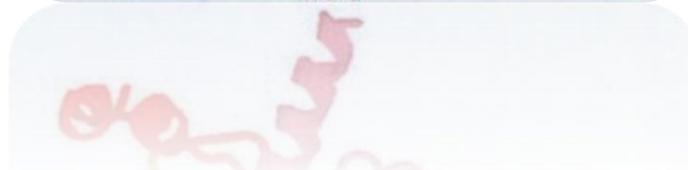
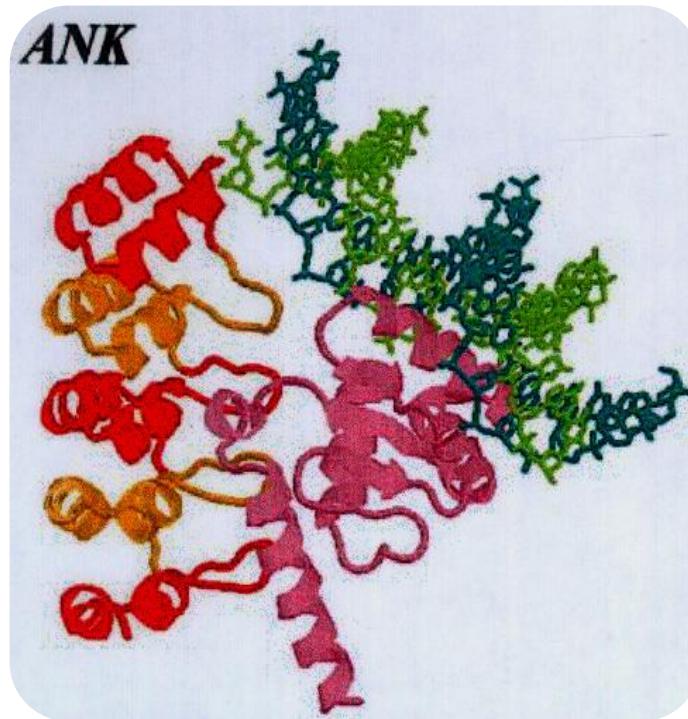


Ank repeats (Domains 3 and 4)

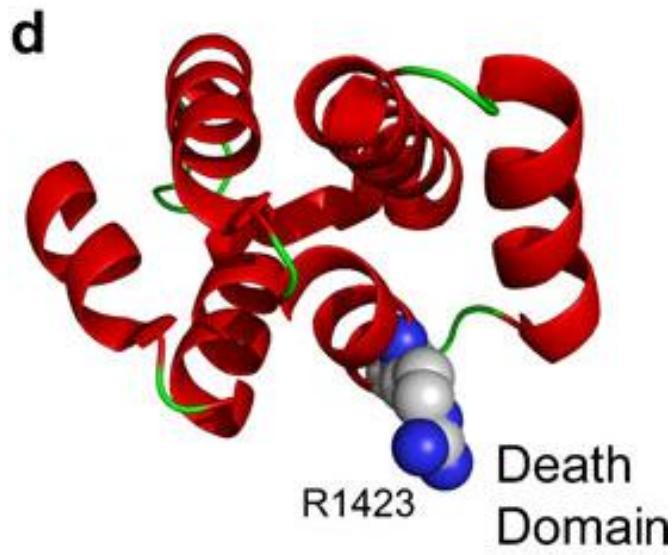
Baines AJ. *Protoplasma* 244:99; 2010

## The structure of ank repeats

Each repeat is a helix–loop–helix structure. Μία σειρά αντιπαράλληλων αναδιπλωμένων α-ελίκων συνδεόμενων με θηλιές σε διάταξη κάθετη ως προς τις έλικες



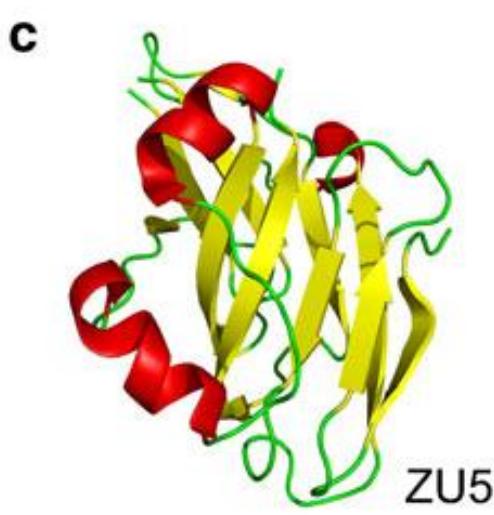
- Μεταγραφικοί παράγοντες, σκελετικές πρωτεΐνες, τοξίνες
- Μηχανισμοί αναγνώρισης και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις



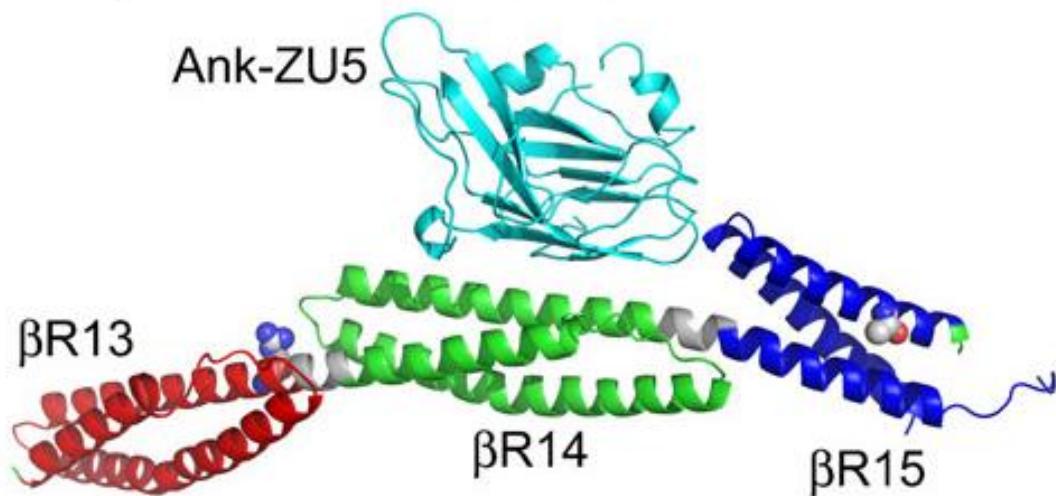
**ZU5 domain (Sp-binding)**

**death domain**. Residue R1423 is required  
for the interactive properties of this domain.

# ΑΓΚΥΡΙΝΗ



d Spectrin-Ankyrin complex



## structure of the interactive domains in Sp and ankyrin

The region in ankyrin that binds spectrin is the **ZU5 domain**

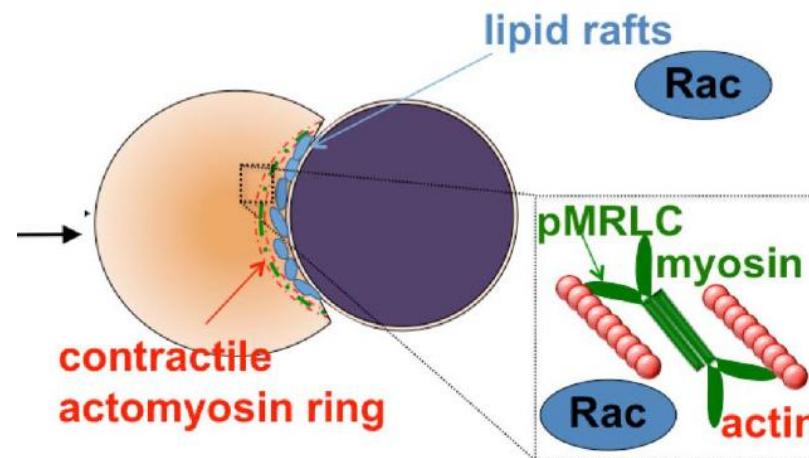
The binding site in  $\beta$ -spectrin for ankyrin is located in **repeats 14–15**

Baines AJ. *Protoplasma* 244:99; 2010

# ΑΓΚΥΡΙΝΗ

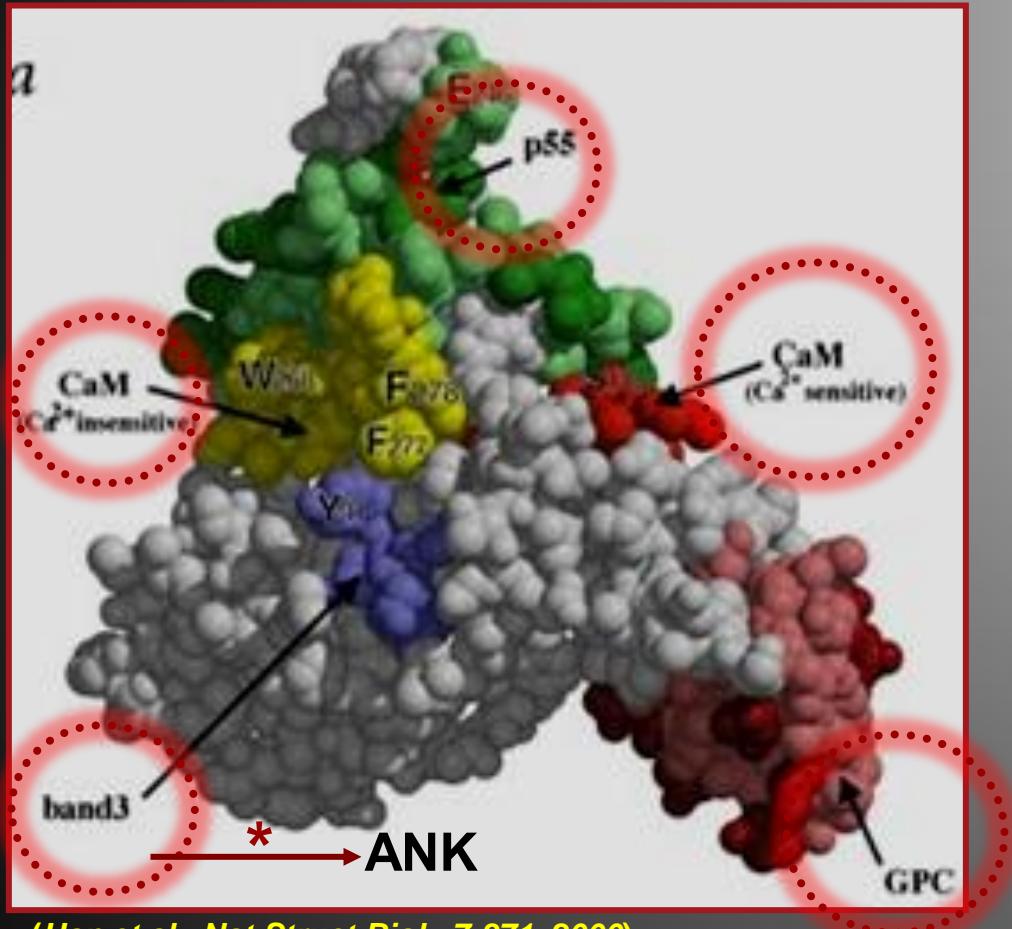
Linkage to ankyrin is required for the efficient **sorting of membrane proteins** during **maturation** of RBCs

At **enucleation**, in the absence of ankyrin-attachment, the **anion exchanger** and **Rh complex** are missorted to the **nuclear remnant**



(Konstantinidis et al., *BLOOD* 119(25):6118; 2012)

# 4.1 R



(Han et al., Nat.Struct.Biol., 7:871, 2000)

Βοηθητική Sp-actin, GpC-p55-4.1R

Σύμπλοκα ζεύξης

200.000 αντίγραφα/RBC

Αρχετυπικό μέλος 4.1 family

Εγκέφαλος, ήπαρ, έντερο, πάγκρεας, μετασυναπτικές μεμβράνες, πυρήνας, κυτταρικοί σύνδεσμοι

Σχηματίζει πολυμοριακά σύμπλοκα με διαμεμβρανικές & άλλες πρωτεΐνες με ρόλο στη δομική σταθερότητα και μεταγωγή σήματος

# 4.1 R

vertebrates have many 4.1 genes:

**EPB41.....4.1R protein (RBCs)**

**EPB41L1....4.1N protein (Neuron)**

**EPB41L2.....4.1G protein (General)**

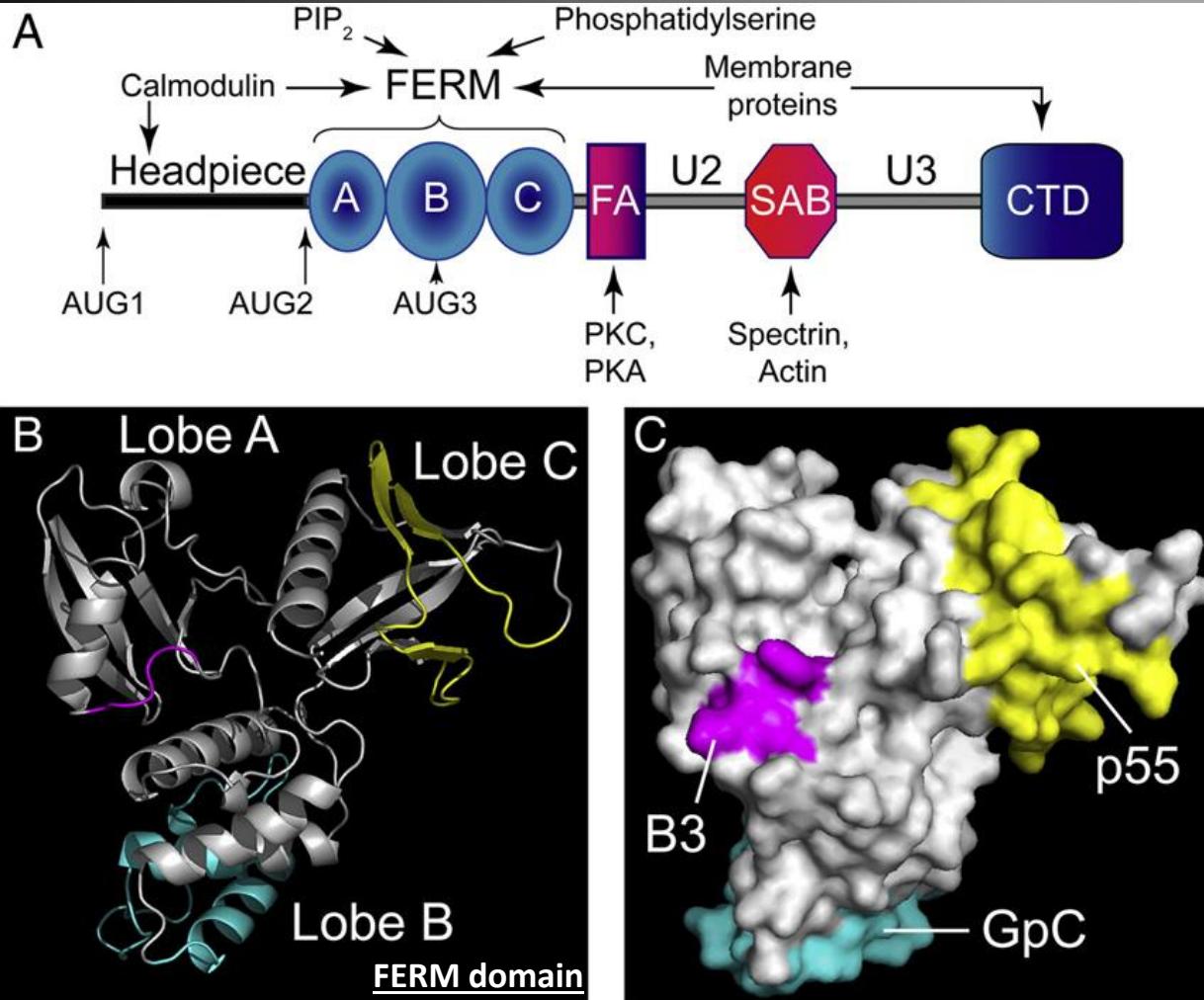
**EPB41L3.....4.1B protein (Brain)**

Protein 4.1R: abundant in RBCs (although it is expressed in many other cell types)

Proteins 4.1N, G, B: essentially absent from RBCs, but expressed widely in other cell types

4.1R is associated with the **mitotic spindles** and **centrosomes** as well as interphase **microtubules** of mammalian cells

# 4.1R



## Domain structure of 4.1 proteins.

(A) major regions of interaction and regulation in vertebrate 4.1:

**FA**, FERM adjacent domain

**SAB**, spectrin–actin binding domain

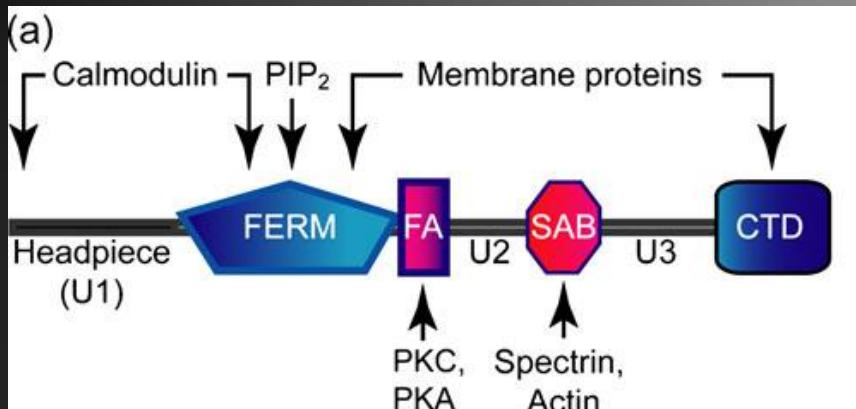
**CTD**, C-terminal domain

(B) Cartoon representation of the fold of the FERM domain. The three lobes are indicated (A, B, C).

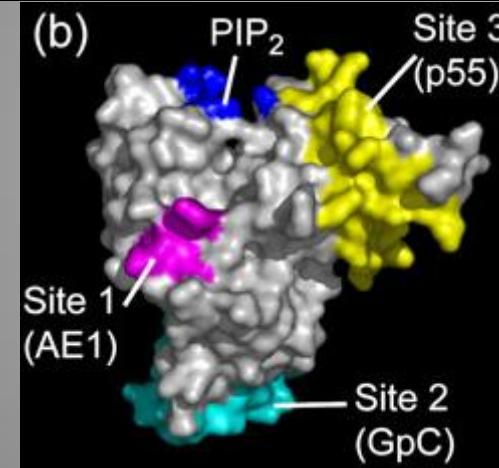
(C) Space filling model of the FERM domain showing binding sites for transmembrane protein **Band 3** (**B3**), glycoprotein C (**GpC**) and **p55**. The colours in (C) and (B) represent the same sequences

(Baines et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1838:605;2014)

# 4.1 R



structure of the FERM domain



Baines AJ. Protoplasma 244:99; 2010

Αρθρωτή πρωτεΐνη –protein domains:

**FERM domain:** Πρόσδεσης σε μεμβράνη (PS, B3, p55, calmodulin and PIP2). Regulated by phosphorylation

**FERM adjacent (FA) domain-** a substrate for phosphorylation by PKA and PKC

**SAB (Spectrin Actin Binding) domain:** Πρόσδεσης σε Sp/actin (σπονδυλόζωα, HE)

**COOH domain (CTD):** απόλυτα συντηρημένη στα μετάζωα-Binds certain membrane proteins

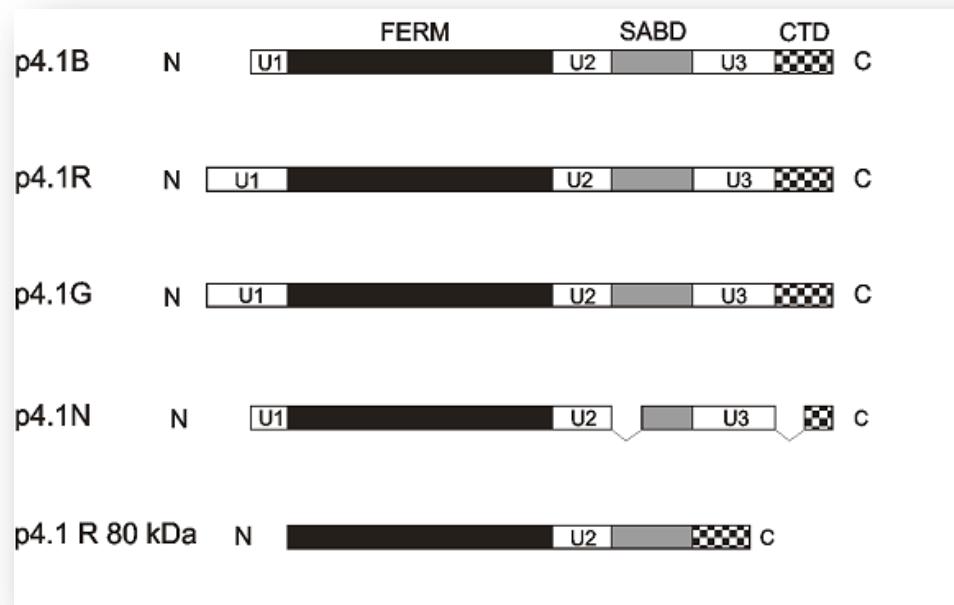
Between the major structural domains are regions relatively conserved between 4.1 proteins (**U1–U3**). U1, also known as the **headpiece**, also binds **Ca<sup>2+</sup>/calmodulin** and modulates **nuclear import** of 4.1R

# 4.1R

Common aspect of the 4.1 genes: are subject to extensive tissue- and development-specific mRNA splicing

eg. 4.1R, more than **half** of the >20 exons of the gene are subject to **splicing**

This regulates cytoskeletal interaction and intracellular targeting

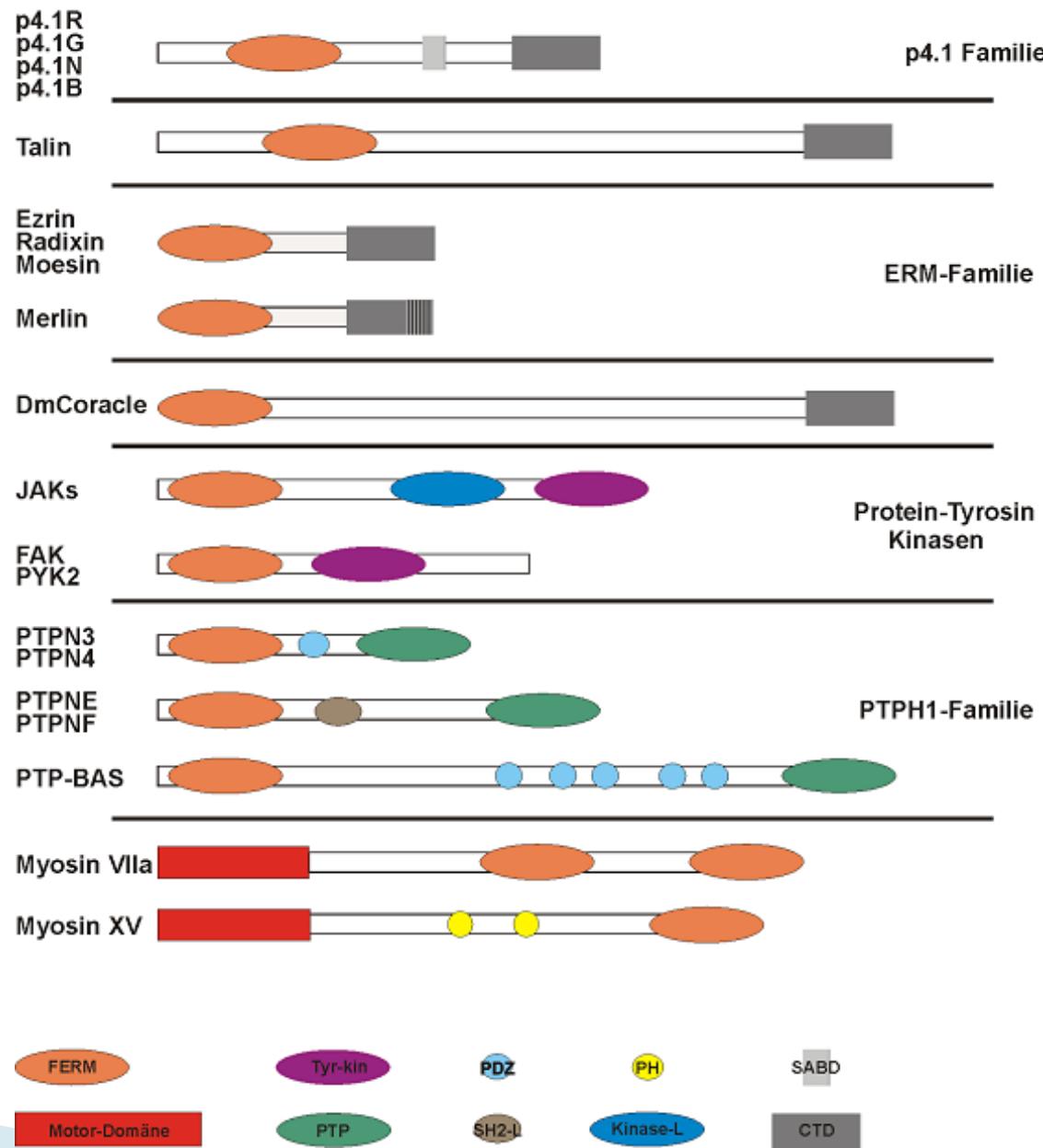


Θηλαστικά: πολλαπλές θέσεις έναρξης ΜΦΡ mRNA

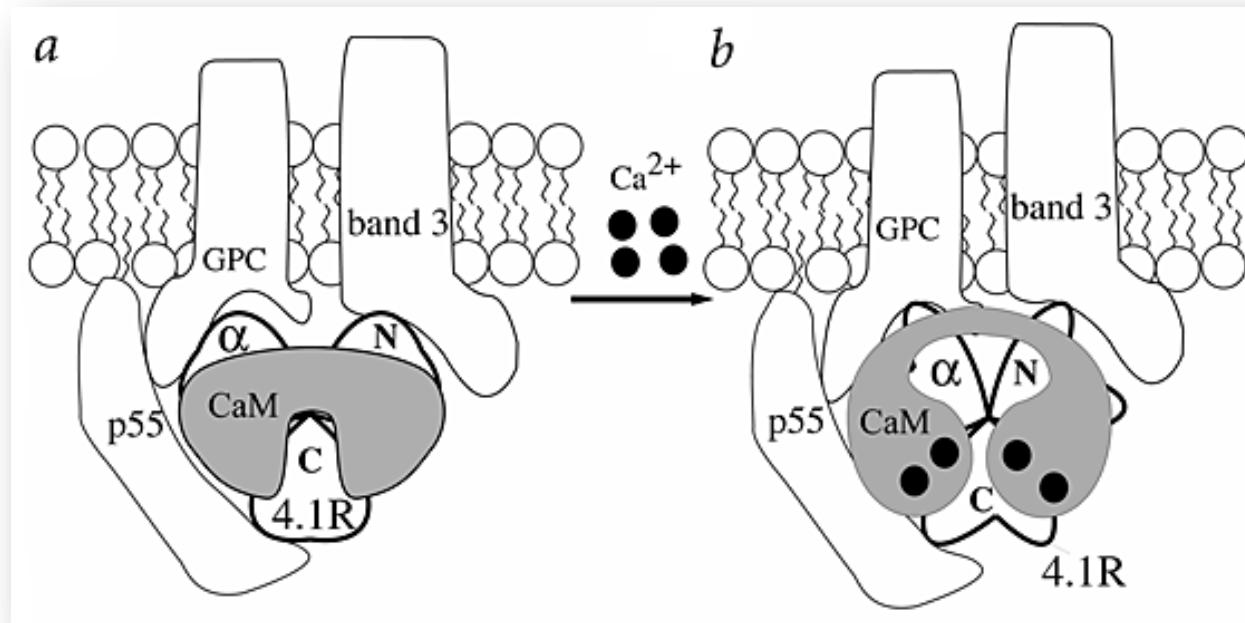
# 4.1R

**FERM domain:** Common in  
4.1 protein-Ezrin-Radixin  
and Moesin.....

**FERM domain:** nexus of regulation in response to signals regulating gene expression, signalling through protein kinases and Ca<sup>2+</sup>



# 4.1R



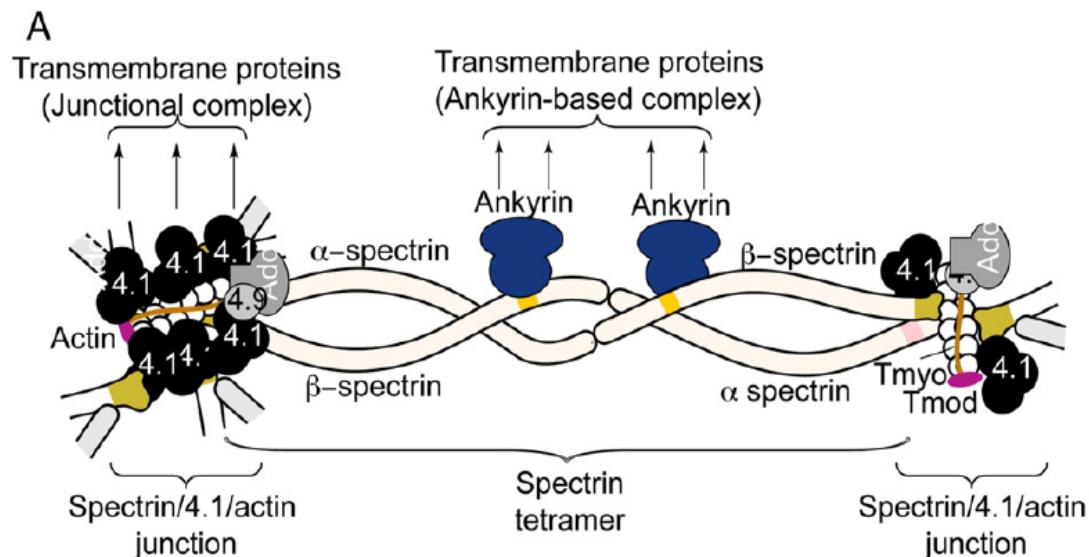
- Οι αλληλεπιδράσεις της 4.1R ρυθμίζονται με Φωσφορυλίωση και από το σύστημα calmodulin/Ca++ (αναστολή σύνδεσης σε μεμβράνη & Sp/actin).
- Η πρόσδεση  $\text{Ca}^{2+}$  στην calmodulin αυξάνει (20x) την πρόσδεση της calmodulin στην εξαρτώμενη από ασβέστιο θέση πρόσδεσης calmodulin της **4.1**. Αυτό προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της 4.1 που επιφέρει εξασθένιση των αλληλεπιδράσεών της με τις **p55, GpC, B3**.

# 4.1R

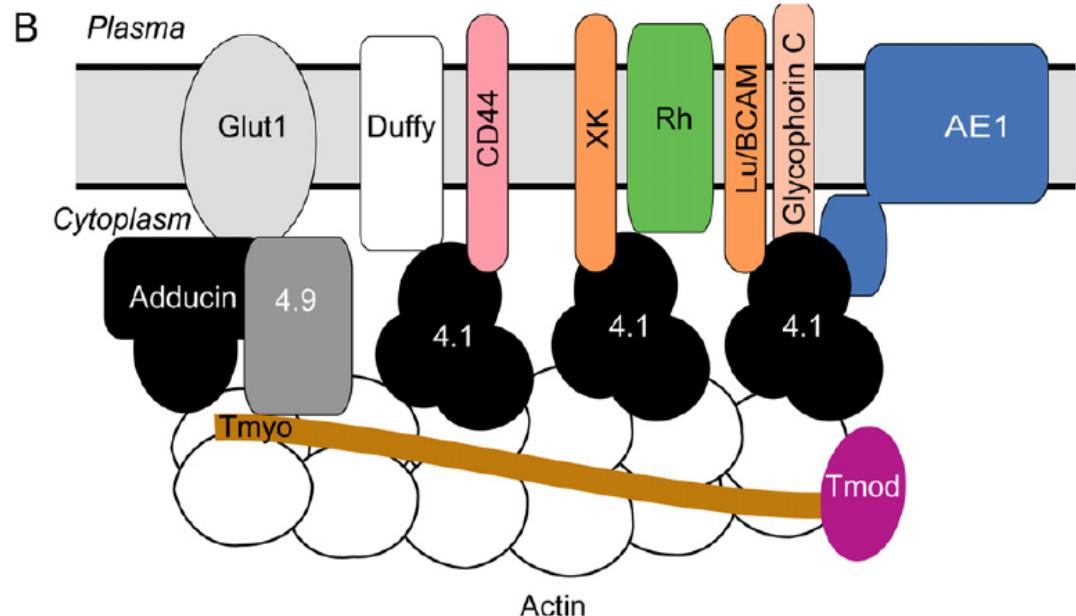
A.J. Baines et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1838 (2014) 605–619

## 4.1 complexes in RBCs

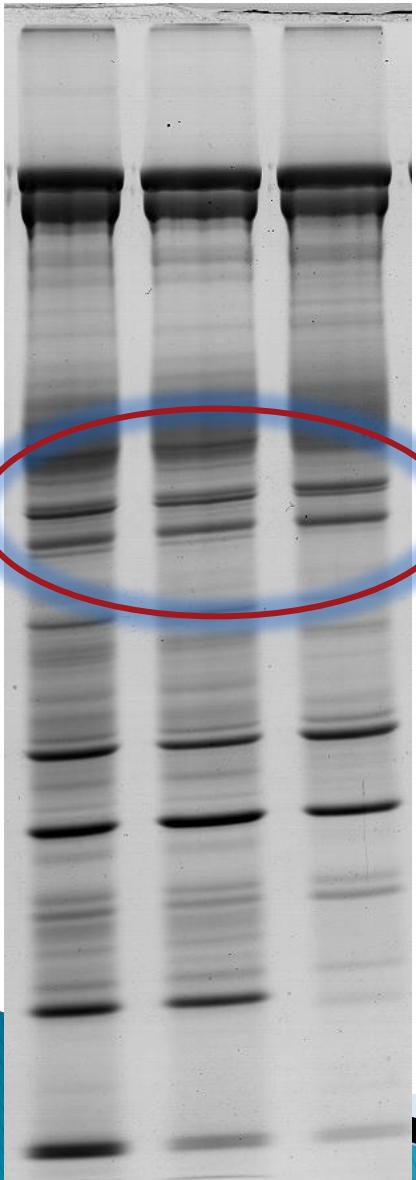
(A) JC: 4.1, Sp and actin bind together to form a **junctional complex** that enables 4.1 to interact with **transmembrane proteins**.



(B) **(B) Several 4.1R molecules bind to the short stretch of actin at the JC allowing a number of 4.1 binding partners to be associated with it.**  
**The transmembrane proteins shown are those found in the RBC**



## 4.1R



- Ο **καλύτερος δείκτης της ηλικίας** του RBC
- SDS-PAGE:  $4.1^\alpha/\beta$ , 80 & 78 kDa
- Μετα-ΜΦΡ τροποποίηση της Asn502 που συμβαίνει σταδιακά και αργά και προκαλεί  $\beta \rightarrow \alpha$ .
- ↑ $4.1^\beta/\alpha$ : περιφερική αιμόλυση, αυξημένα ΔΕΚ
- Πρόκειται για κοινό μηχανισμό σε πολλά είδη Θηλαστικών αλλά η τιμή του λόγου διαφέρει από είδος σε είδος.

$4.1(-) \rightarrow \underline{\text{HE}}$

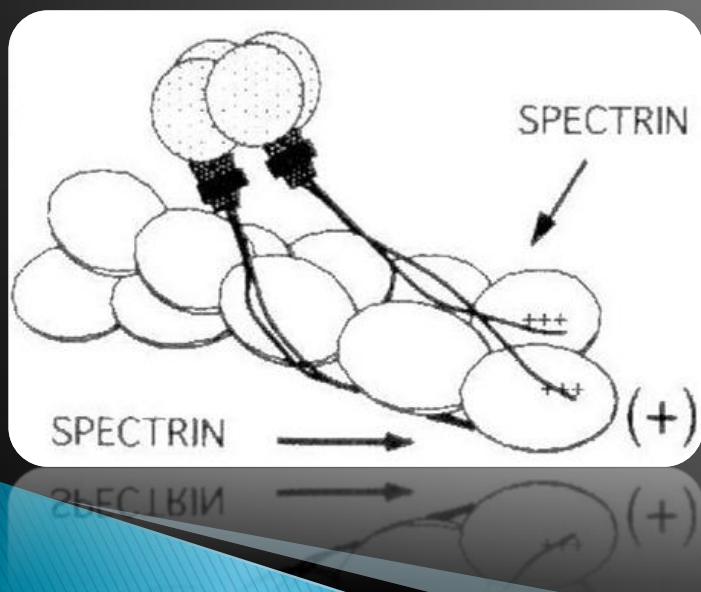
# ΑΔΟΥΣΙΝΗ

Vertebrates: 3 adducin genes (ADD1–3)

$\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  polypeptides, respectively

Vertebrate adducin is a heterotetramer of  $\alpha$ - $\beta$  or  $\alpha$ - $\gamma$  polypeptides

- RBC: ετεροτετραμερή ( $2\alpha\beta$ ), 15.000 μόρια/RBC (διμερή αβ και τετραμερή)



## (1) Πρωτεΐνη κάλυψης των νηματίων ακτίνης

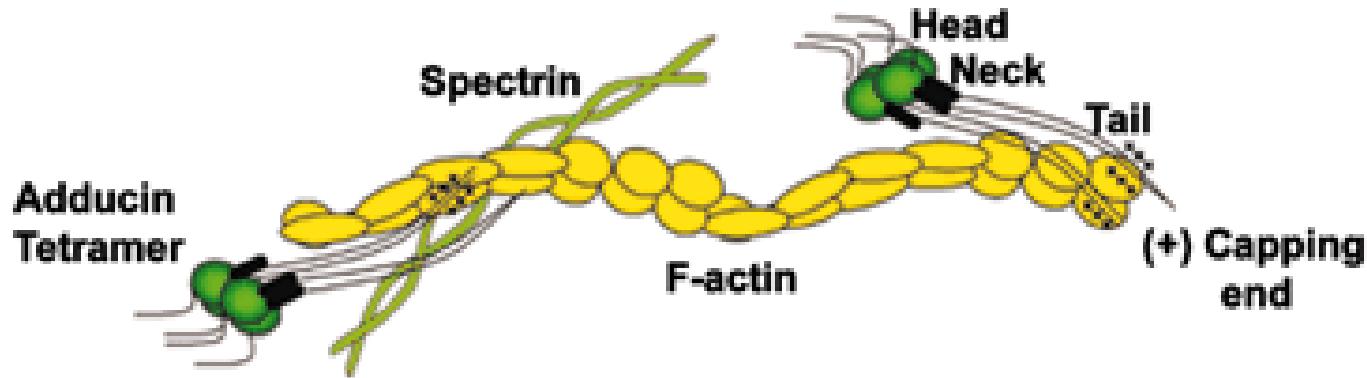
(παρεμποδίζει μεταβολή μήκους τους σε F-actin και προάγει πρόσδεση Sp).

## (2) Βοηθητική πρωτεΐνη του συμπλόκου Sp-actin

(Σταθεροποιεί τη σύνδεση-τριαδικό σύμπλοκο-assuring that the junctional complex remains intact during the mechanical distortions experienced by the circulating cell)

Συνδέεται απευθείας σε **ακτίνη** αλλά με μεγαλύτερη συγγένεια σε **Sp/actin**

## Spectrin/Actin/Adducin Interactions



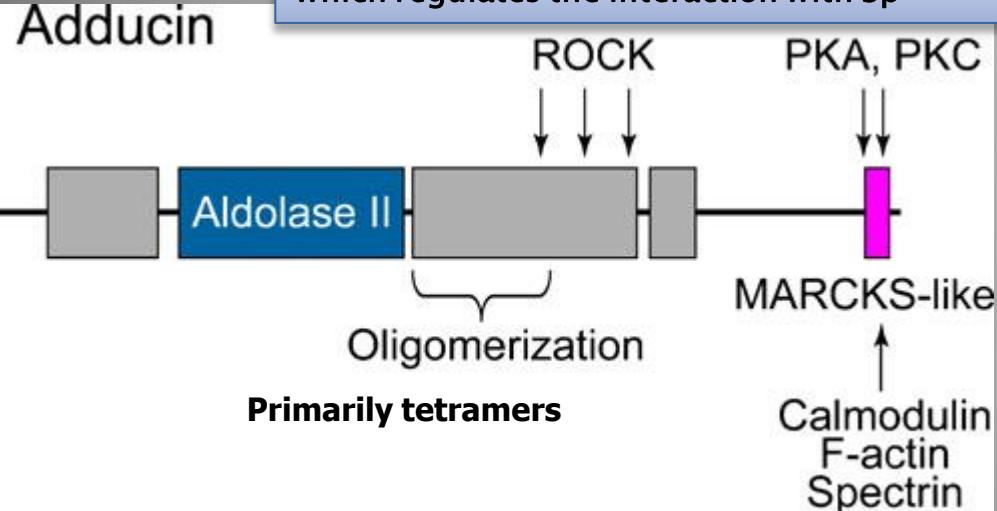
β-Adducin forms complexes between spectrin and actin promoting the association of spectrin with actin filaments

(*PNAS* 102(35):12407; 2005)

# ΑΔΟΥΣΙΝΗ

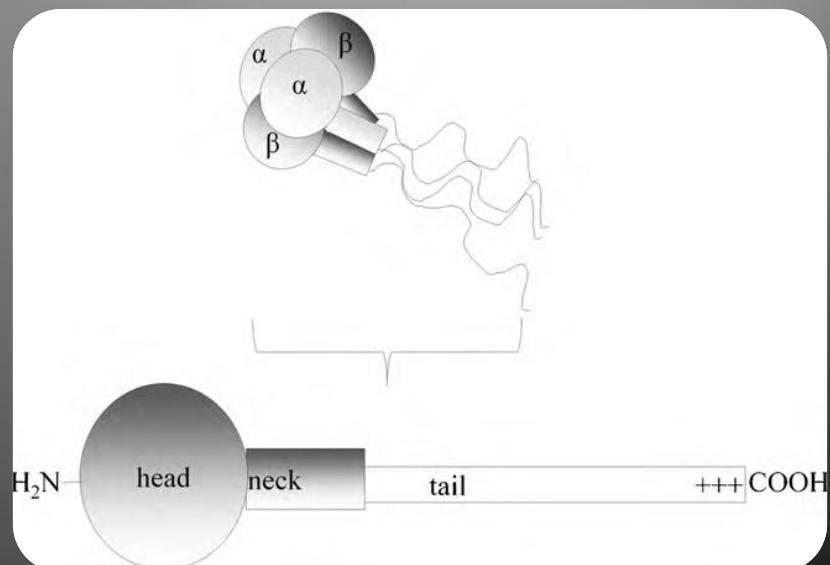
- 1) **N-terminal globular head domain:** homologous to the aldolase-II family
- 2) **short interconnecting (neck) region:** for oligomerization
- 3) **protease-sensitive tail:** basic region- contains a MARKS-like domain that binds Ca++/calmodulin- Can be phosphorylated by PKC - multiple protein–protein interactive site (Sp, actin...).  
Require dimerisation/oligomerisation to be functional: this is driven by the neck domain.

Calmodulin and PKC are negative regulators of adducin interactions with Sp and actin



Baines AJ. *Protoplasma* 244:99; 2010

Regions showing high sequence similarity between adducin polypeptides are indicated in grey boxes.

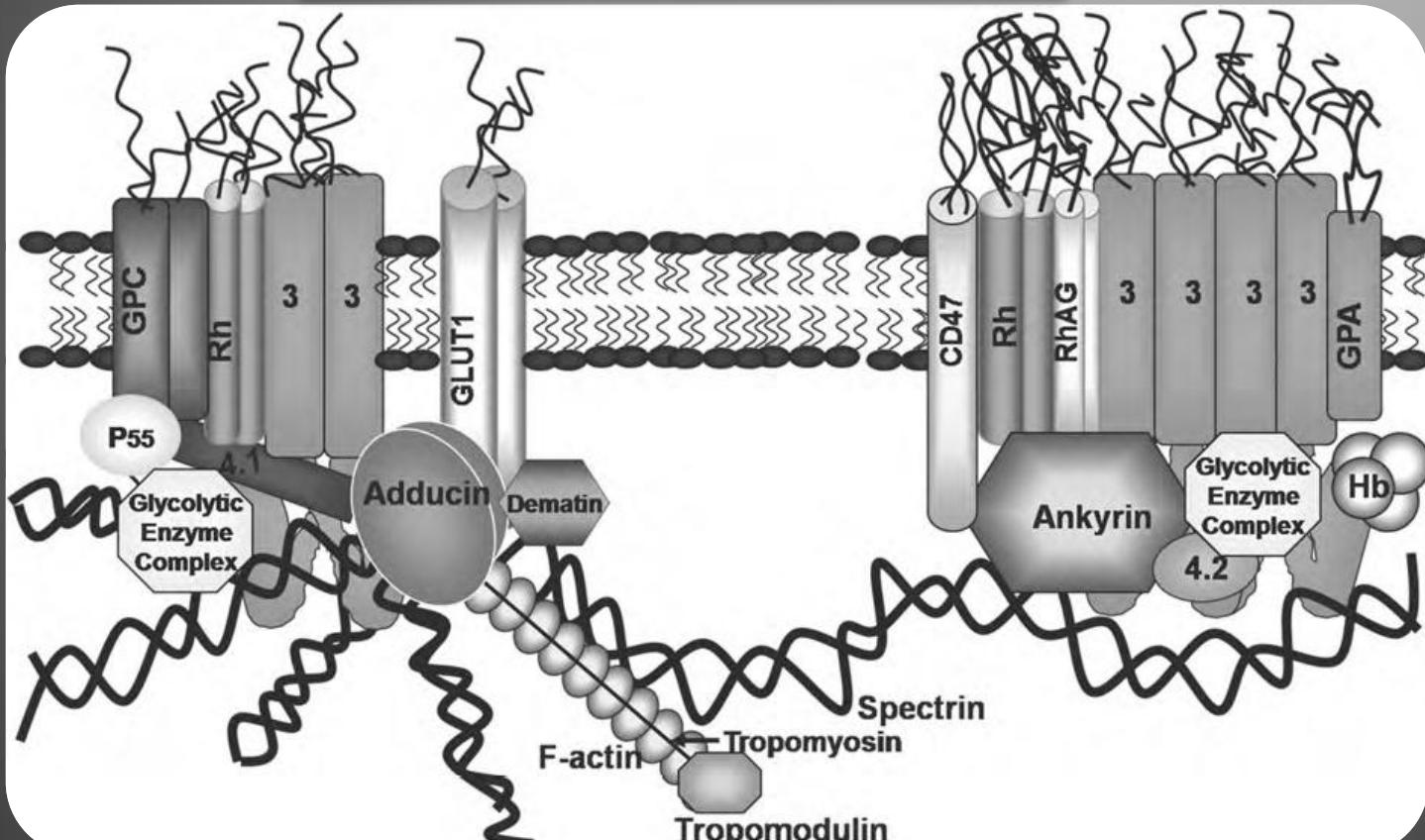


## B3-Adducin –Sp complex

ΑΔΟΥΣΙΝΗ

## Dematin-Adducin –GluT1 bridge

binds Sp, directly  
binds to B3   ⇒



adducin forms a bridge that connects the spectrin–actin JC to band 3.  
Rupture of this bridge leads to membrane instability and spontaneous fragmentation

# ΑΔΟΥΣΙΝΗ

- (1) Structural role (βοηθητική Sp/actin, Κάλυψη ακτίνης, Γεφύρωση JC σε μεμβράνη)
- (2) response to stimuli that may be important in regulating the global properties of the cell, possibly including cation transport, cell morphology and membrane deformability

a- and b-adducin subunits interact directly with stomatin. Association with stomatin may serve as a sensor that enables the membrane to respond to mechanical stresses by altering its permeability to cations

Not surprisingly, because of the critical nature of these disparate functions, the interactions of adducin with its binding partners on the membrane appear to be sensitively regulated by kinases, calcium/calmodulin and cytokines.

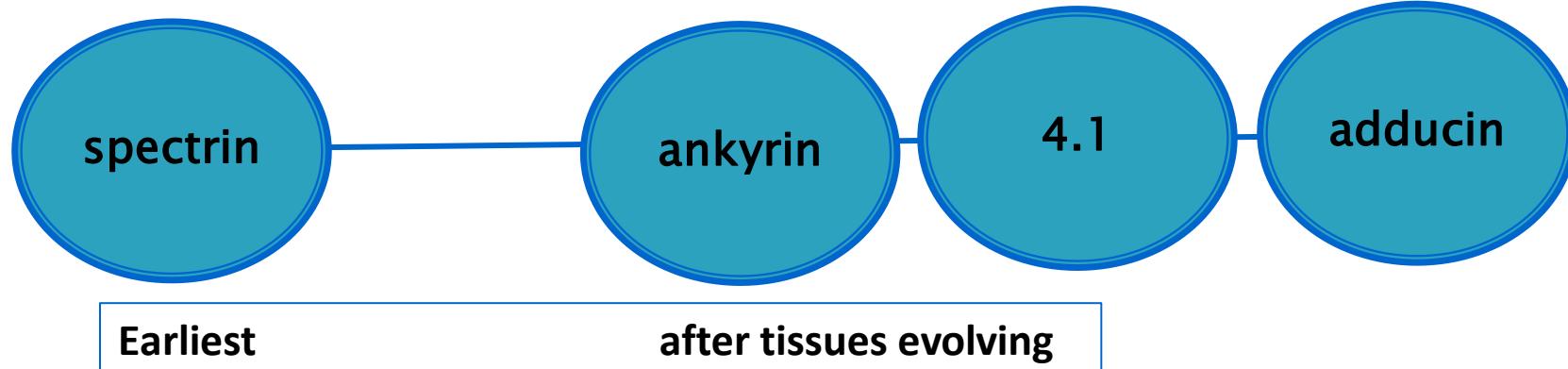
# spectrin–ankyrin–4.1–adducin membrane skeleton: an adaptation of the eukaryotic cells to the demands of animal life

e.g. Movement (different stresses on PM)

Integration of cells into tissues

Specialization of membrane domains

Formation of signaling complexes

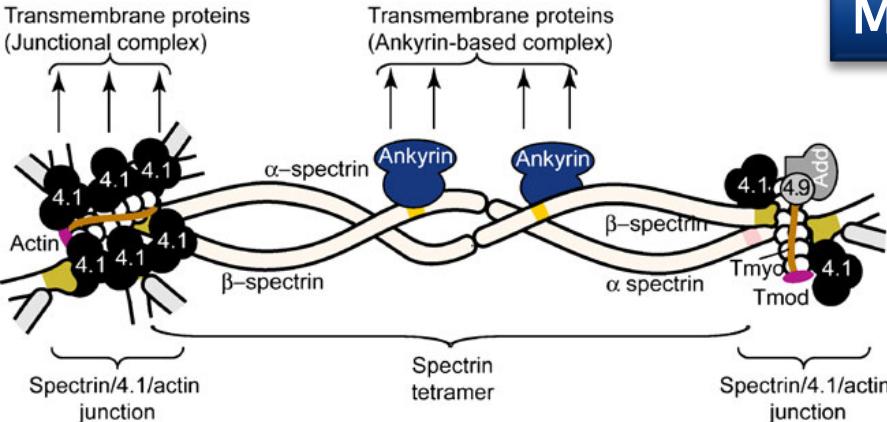


Interaction of **Sp** with **ank**: is probably a prerequisite for the formation of **tissues**

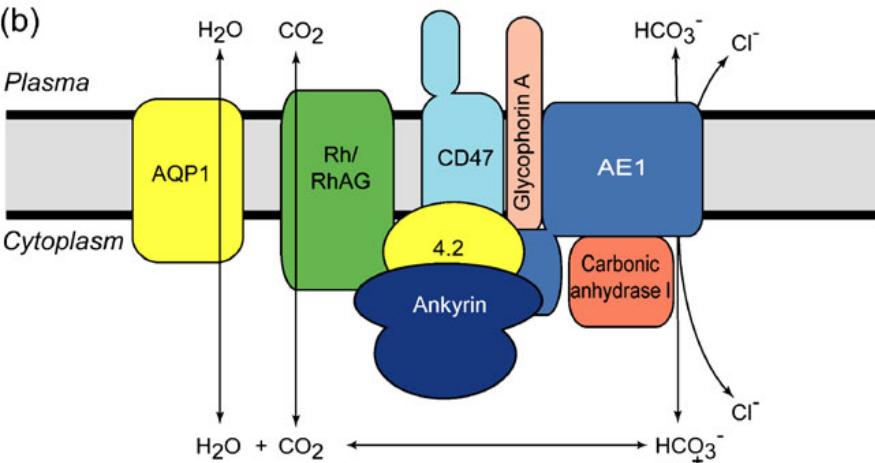
only in **vertebrates** the **4.1** acquires the ability to **bind Sp and actin**. This allowed to the **Sp** complex to regulate the **surface accumulation** of various proteins

**4-protein complex** implicated in: formation of **apical** and **basolateral** domains, membrane trafficking, assembly of **signalling** and **cell adhesion complexes**, providing **stability** to otherwise **mechanically fragile** cell membranes

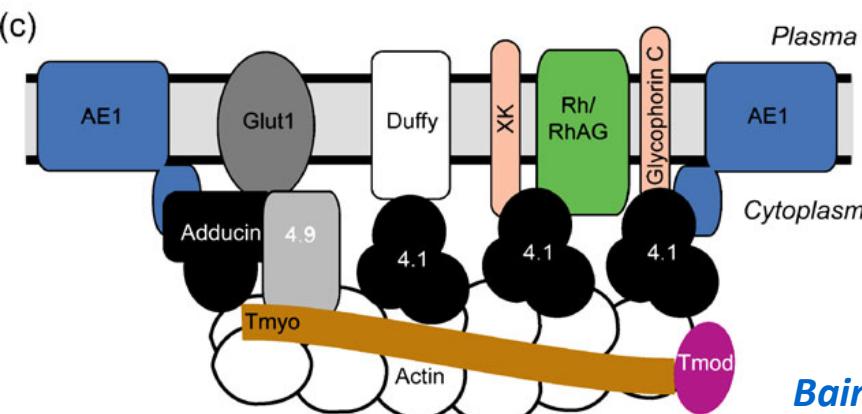
(a)



(b)



(c)



# Major RBC membrane-MSk complexes

## (a) Sp-actin complex

**SpT** are bound at their ends to short **actin** filaments. The actin filaments are long enough to bind a **TM** and are capped at the minus-end by **Tmod**. Proteins **4.1** and **adducin** regulate the interaction of Sp with actin.

## (b) The ankyrin-based complex.

**Ankyrin** links to **β-Sp** and joins to membrane macrocomplexes (band 3 (AE1) and the Rh proteins).

**c) The junctional complex.** The **Sp-actin** junction is linked to membrane proteins via **4.1**, **adducin** and **dematin** (4.9). Several **4.1** proteins are bound to each junction point; each is capable of interacting with various **membrane proteins**. **Adducin** can bind **band 3**; it also forms a complex with **dematin** that binds to the **GLUT1**.

Note the overlap in the proteins of the JC and of the ankyrin-based complex

## Major RBC membrane-MSk complexes

A) the **actin-based JC** coordinates membrane linkages to a large range of **membrane proteins**

Some of these: have roles in **red cell stability**

eg. rupture of the **adducin-band 3 linkage**: weakening of RBC membranes

Combined loss of **adducin** and **dematin**: alters **cell shape** and **membrane stability**

B) On the other hand, only the **domain of protein 4.1** that binds to spectrin and actin is required for RBC **membrane stability**⇒

The function of 4.1-transmembrane protein complexes is to ensure that transmembrane proteins are **trapped at the cell surface after their synthesis**

Both **ankyrin** and **protein 4.1** are necessary for the **stable accumulation of certain membrane proteins at the cell surface** (Band 3, Rh complex, Duffy Ag etc). In their absence, they are lost being **missorted** during erythroid maturation-  
**Not only in RBCs**

## **spectrin-ankyrin-4.1-adducin membrane skeleton: an adaptation of the eukaryotic cells to the demands of animal life**

**These proteins are very likely to be essential to all animal life.**

**As a consequence, defects in these proteins caused by mutation or by modifications, such as proteolysis, are associated with numerous disease states ranging from hereditary anaemia to heart disease.**

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

**Σκελετοί Sp-ΑΝΚ εκτός της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης**

- 1. Δομική υποστήριξη κυτταρικής μεμβράνης**
- 2. Ρύθμιση κατανομής/λειτουργίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και μεμβρ. ενζύμων σε πολωμένα κύτταρα**
- 3. Διαλογή πρωτεϊνών**
- 4. Αρχιτεκτονική πυρήνα κατά τη μίτωση**
- 5. Ρύθμιση μονοπατιών μεταγωγής σήματος**

# ΣΚΕΛΕΤΟΙ Sp-Ank

RBC

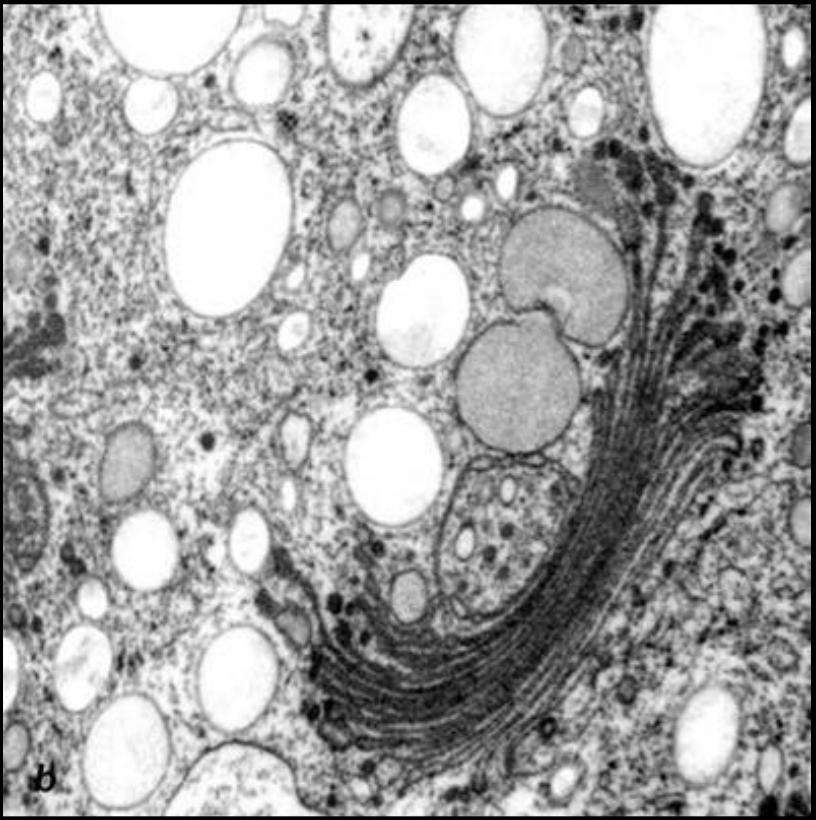
- Πυκνοί
- Εκτεταμένοι
- Ομοιογενείς
- Κοντά πρωτονημάτια ακτίνης

ΕΚΤΟΣ RBC

- Σποραδικοί
- Μακρύτερα νημάτια ακτίνης
- Μικροσωληνίσκοι
- (δυνείνη, δυνακτίνη)
- υποδοχείς/ microdomains/ πρωτεΐνες μη-RBC

Επιθήλια, Νευρικό, Golgi

# GOLGI



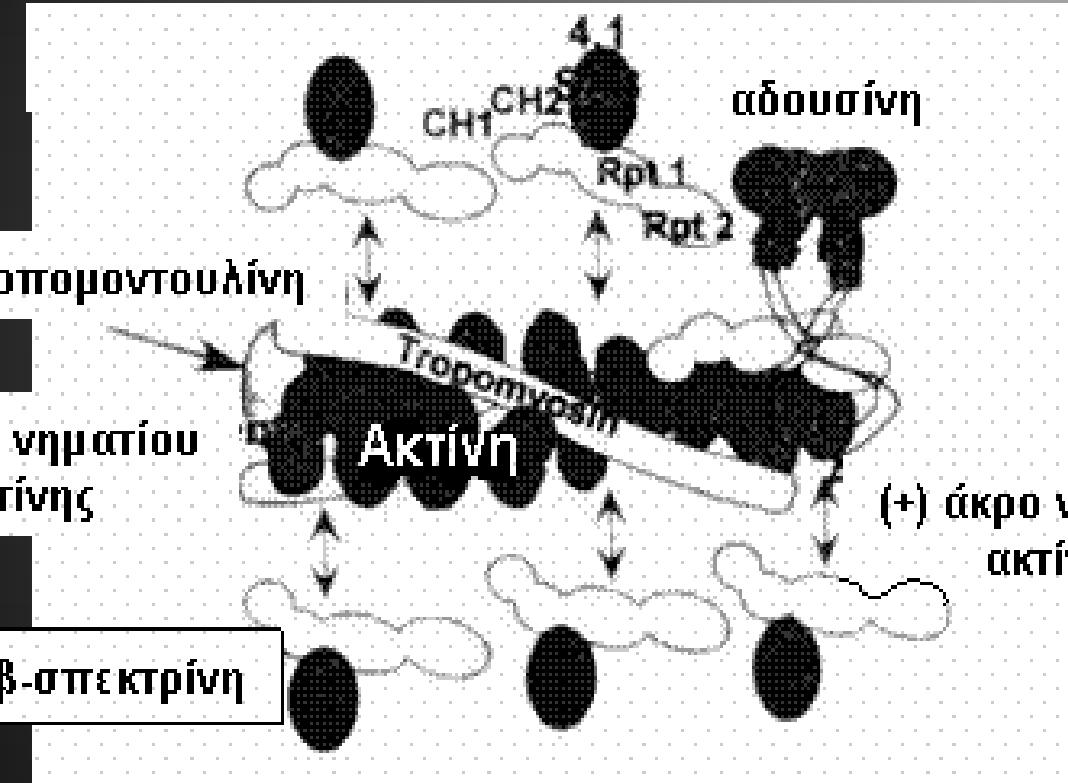
Διατήρηση δομής, δυναμικής φύσης,  
διαμερισματοποίησης

Διαλογέας πρωτεΐνών ανάλογος της  
κλαθρίνης στα καλυμμένα βοθρία

1. Προσδένει ποικιλία πρωτεΐνών
2. Επιλεκτική συγγένεια
3. 2D-ολιγομερείς δομές
4. Κατάσταση δυναμικής συγκρότησης

Ρυθμίζει συγκράτηση πρωτεΐνών στις μεμβράνες Golgi εμποδίζοντας την  
είσοδό τους σε εκκριτικά κυστίδια μεταφοράς

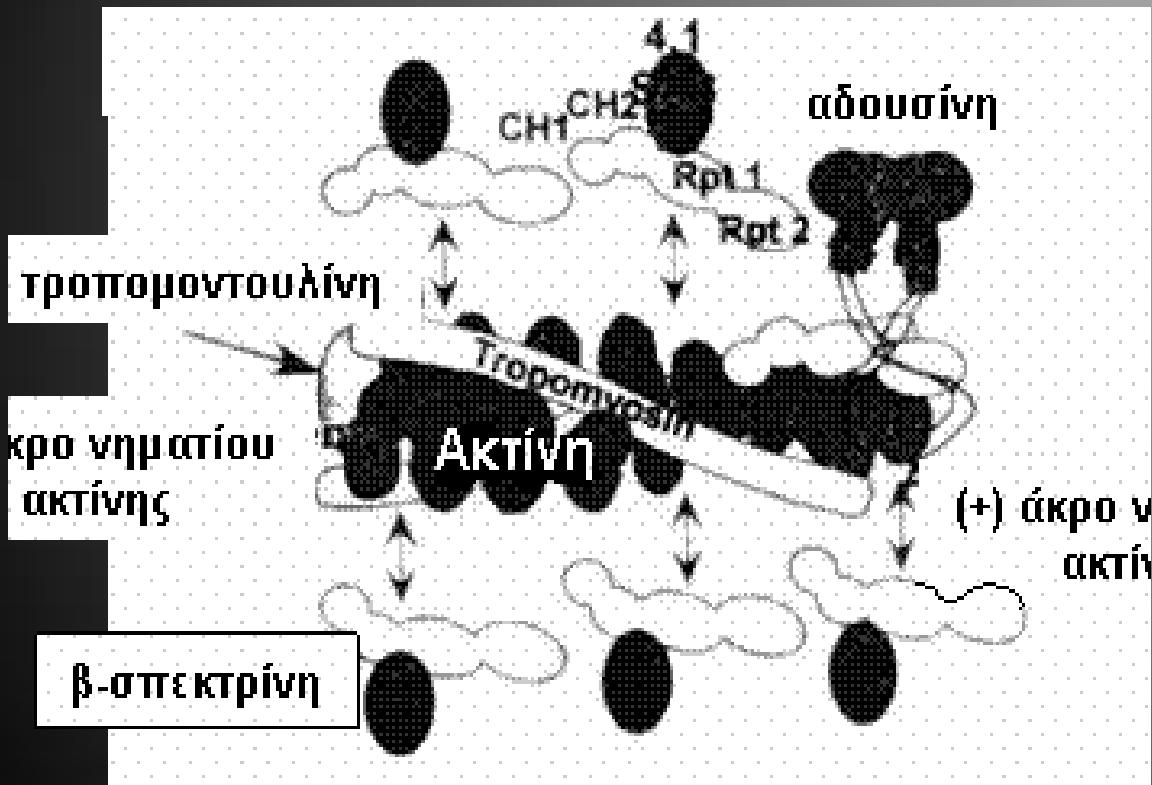
# ΤΡΟΠΟΜΥΟΣΙΝΗ (TM)



- 1) Αλληλεπιδρούν με 6 μόρια ακτίνης,
- 2) έχουν ↑ συγγένεια για TD/actin

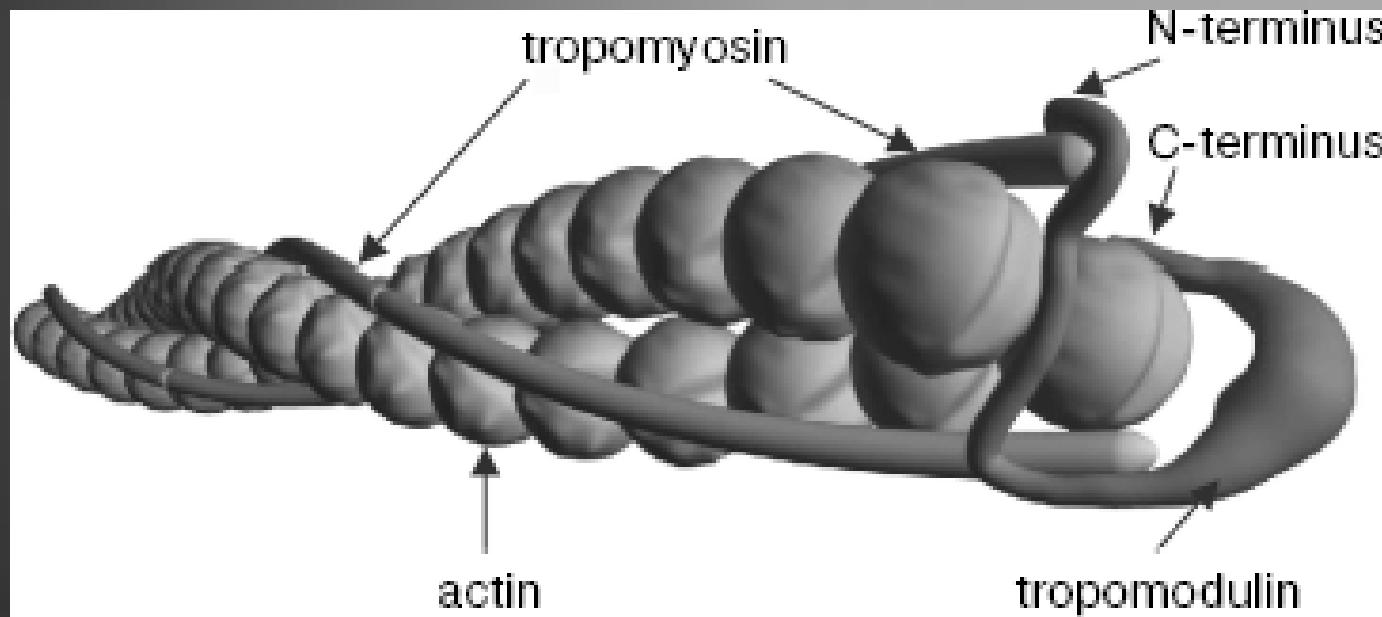
- Actin-binding protein
- 2 monomeric units that autoassociate at their heads, forming a dimeric molecule. The heads are called άδουσίνη (dousinein) and τροπομοντουλίνη (tropomodulin). The tails are called Aktíni (actin) and (+) ákro v aktíni (plus end of actin).
- Characterized by a length of 33-37 nm
- Regulated by SpT (spectrin)
- 4 genes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ )
- RBC: 29/27 kDa, 70-80.000 copies/RBC
- Heterocomplexes: TM5 ( $\gamma$ ) and TM5b ( $\alpha$ ) in homo- or heterodimers
- SPECIAL ISOMORPHIC FORM

# ΤΡΟΠΟΜΟΝΤΟΥΓΛΙΝΗ (TD)



- ✓ Πρωτεΐνη κάλυψης TM
- ✓ πρώτα σε RBC
- ✓ Σφαιρική 40.6kDa
- ✓ Ισομοριακή ποσότητα με TM
- ✓ Αναστέλλει:
  - 1) Συνεργατικότητα TM
  - 2) Επιμήκυνση / αποπολυμερισμό ακτίνης

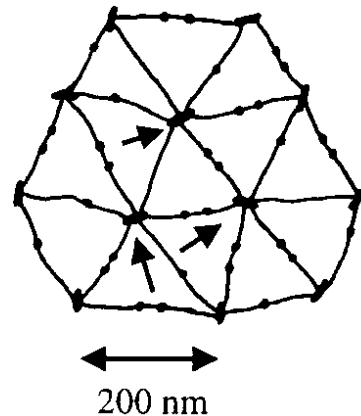
# ΤΡΙΜΕΡΕΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟ



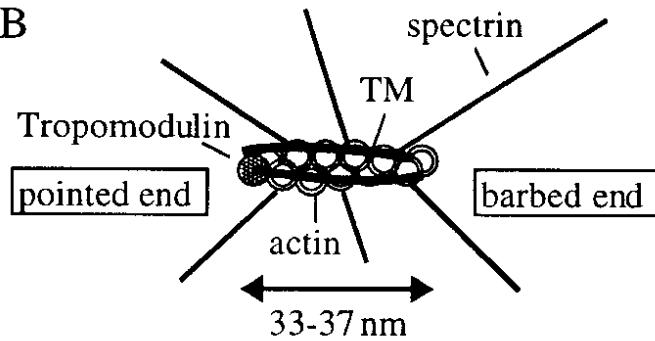
# MONTEAO SUNG et al., 2000

(Sung et al., Blood 95(4):1473; 2000)

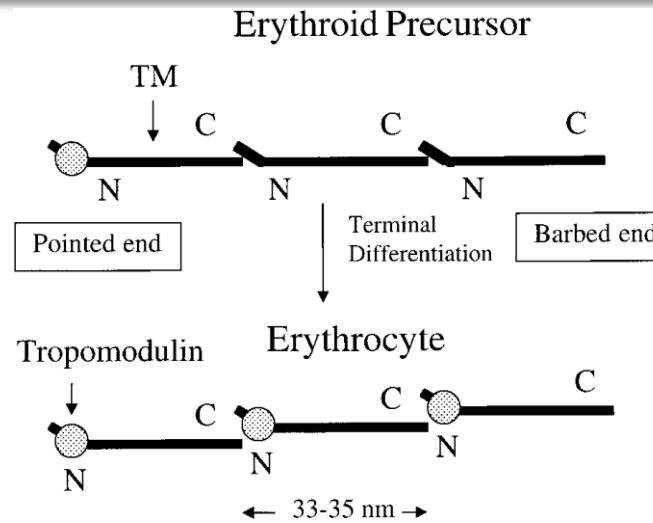
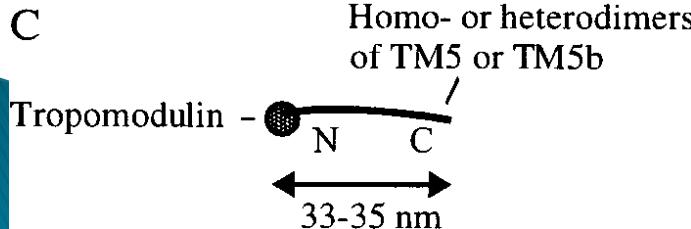
A



B



C

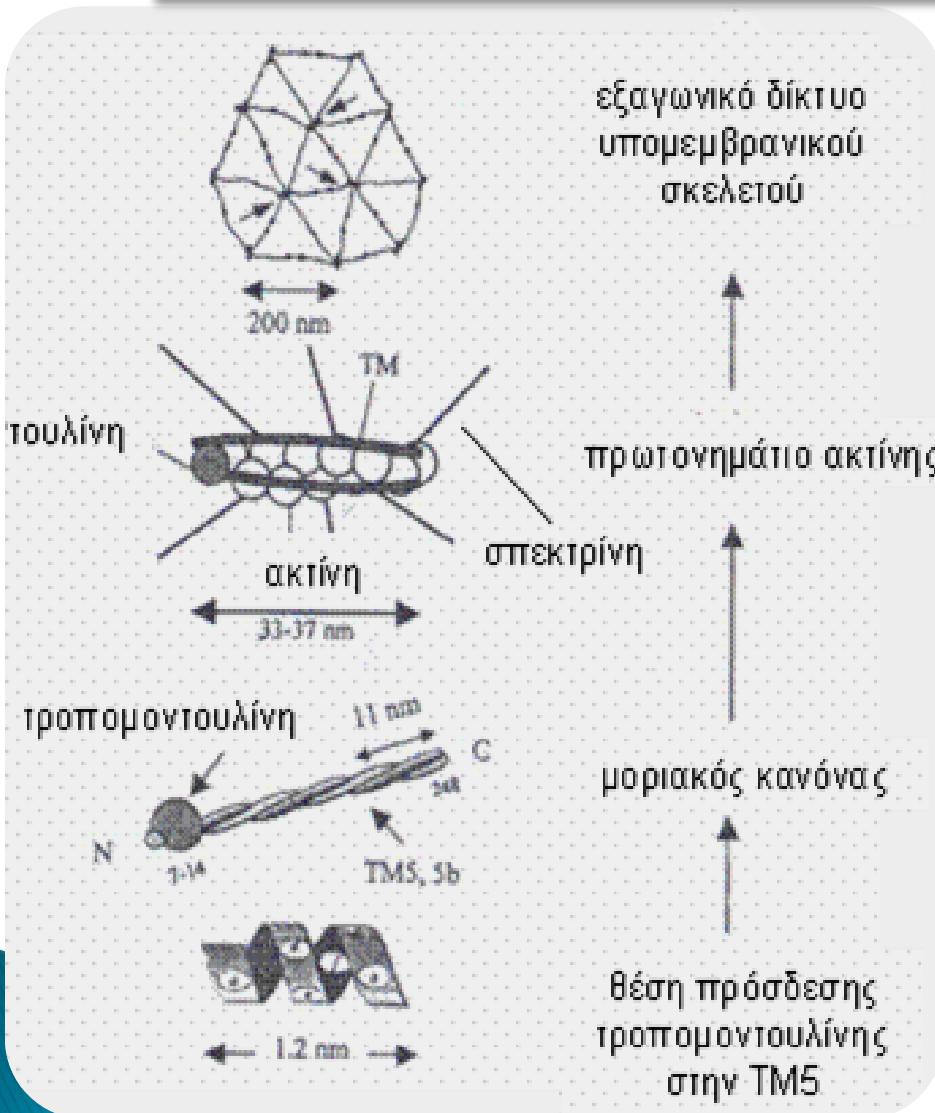


A switch of other **TM isoforms** to TM5 or TM5b and/or an increase of **tropomodulin** would favor the formation of actin protofilaments.

The more **tropomodulin** bind to the N-terminal of homodimer or heterodimer of TM5 and TM5b (approximately 33-35 nm in length), the less the head-to-tail association of TM molecules can occur along the actin filaments.

Increasing **TM5**, **TM5b**, and/or **tropomodulin**, therefore, would favor the **stabilization of shorter actin filaments** that are of the same size as an **LMW TM molecule**.

# MONTELO SUNG et al., 2000



Γεωμετρία εξαγωνικών πλεγμάτων Sk



Τα πρωτογημάτια ακτίνης ευνοούν την πρόσδεση 6 SpT



Το σύμπλοκο TM5/TD καθορίζει ως χάρακας το μήκος ακτίνης 33-37 nm



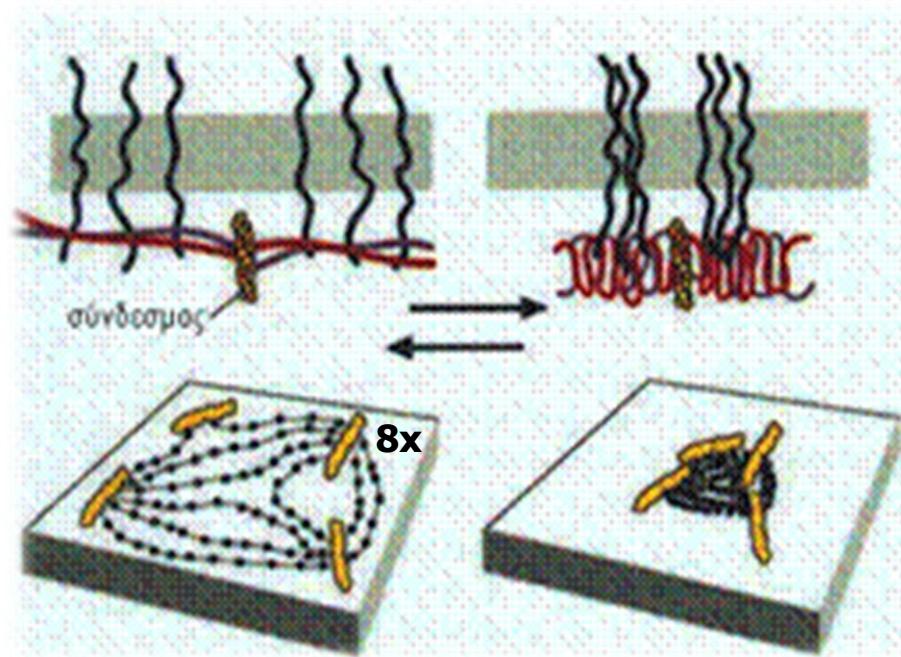
Η TM5 έχει 6 θέσεις πρόσδεσης ακτίνης



Στην πτυχωτή επιφάνεια της TM5 δημιουργείται μία θέση πρόσδεσης TD

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

Οργάνωση αντιστρεπτά μεταβλητή –Πυκνός-Ελαστικός-Εκτατός



Οι αποστάσεις ανάμεσα στα συζευγμένα μόρια υφίστανται αυξομειώσεις οι οποίες διαμέσου των συνδέσμων με τα διαμεμβρανικά συστατικά καθορίζουν την τοπολογία και την οργάνωσή τους στη μεμβράνη. Αυτός είναι ένας πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αυτοτελών δομικών και λειτουργικών μικροπεριοχών στη μεμβράνη.

# ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ

1. **Membrane protein linkages with skeletal proteins:** regulating cohesion between lipid bilayer and MSk (Prevention of membrane vesiculation)

2. **Mechanical stability of MSk (Prevention of membrane breakup)**



1. Interactions between Sp dimers
2. Interactions that define the Junctional Complex

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

• ↓ Αλληλεπιδράσεων σε ΣΖ ⇒ ↓ membrane stability

• ↑ Αλληλεπιδράσεων ⇒ ↓ deformability

## ΑΥΤΟΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΚΑΙ ΣΚΕΛΕΤΟΥ:

1. Βοηθητικές πρωτεΐνες
2. Ca++/calmodulin/calpain
3. Μετα-ΜΦΡ τροποποιήσεις:

ΔΟΜΙΚΕΣ

'Η

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ

Μη-αντιστρεπτές

μυριστιλίωση 4.2

οξείδωση

μη-ενζυματική γλυκοζυλίωση

πρωτεόλυση

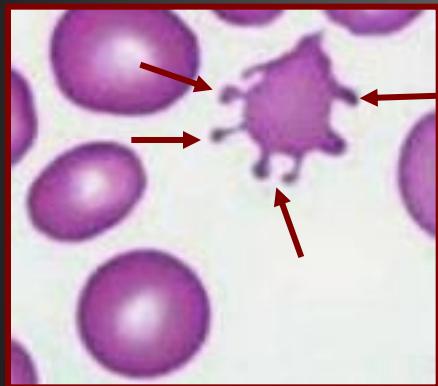
Αντιστρεπτές

φωσφορυλίωση

ακυλίωση λιπαρών οξέων

# ΣΚΕΛΕΤΟΣ

Ο Σκελετός συνιστά μηχανισμό διαλογής πρωτεΐνων στο ερυθροκύτταρο



Η εξωκυστιδιοποίηση ρυθμίζεται από  
αλληλεπιδράσεις του Sk με τη μεμβράνη