

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 9.3.2011

Cytoskelet, buněčné interakce a extracelulární matrix

doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Program přednášky:

1. Cytoskelet

- medicínské aspekty – využití v diagnostice
- medicínské aspekty – poruchy cytoskeletálních komponent a asociovaných proteinů
- cytoskeletální toxiny – praktické aplikace

2. Mezibuněčné interakce a spoje

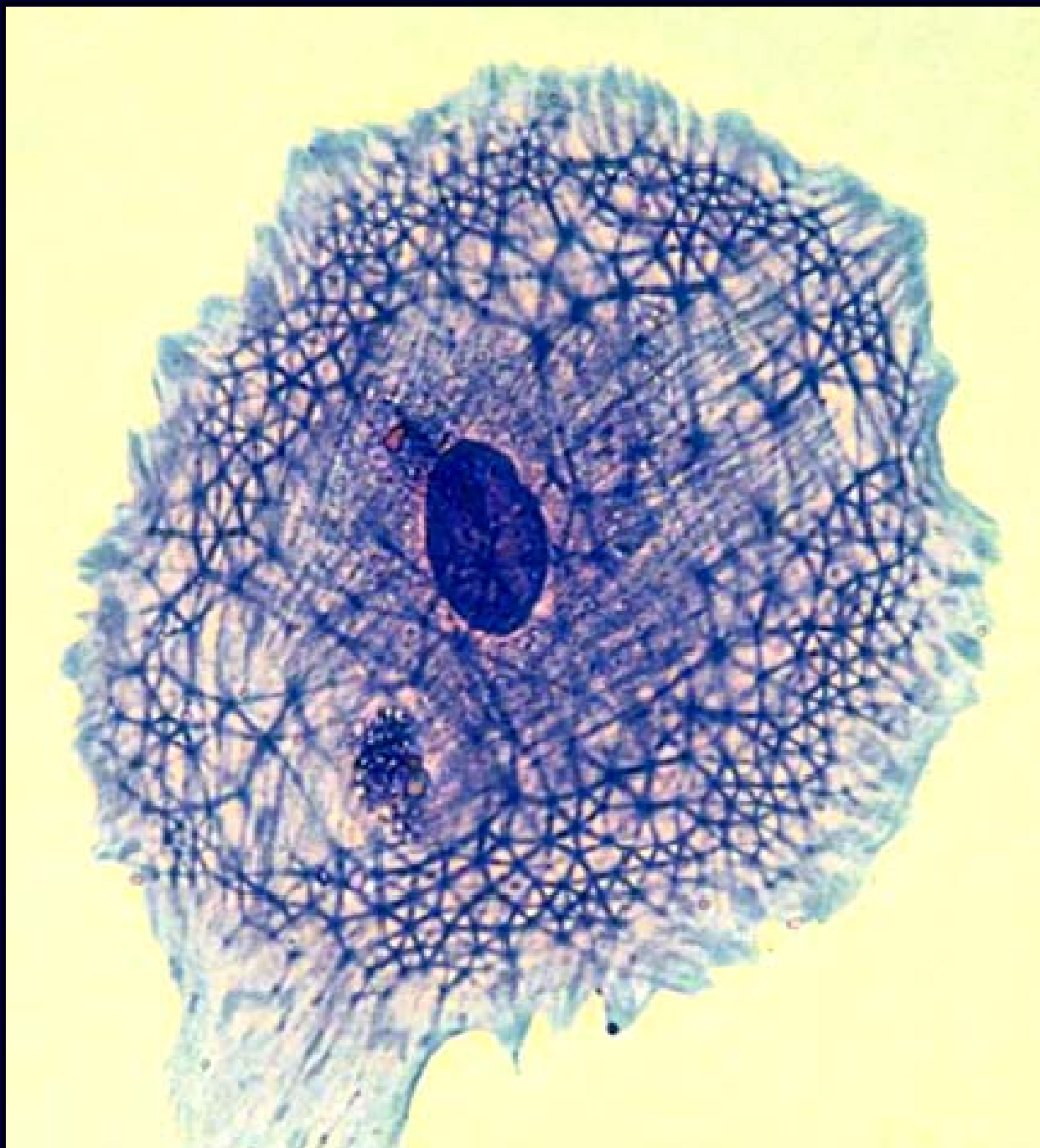
- medicínské aspekty – poruchy interakcí a spojů

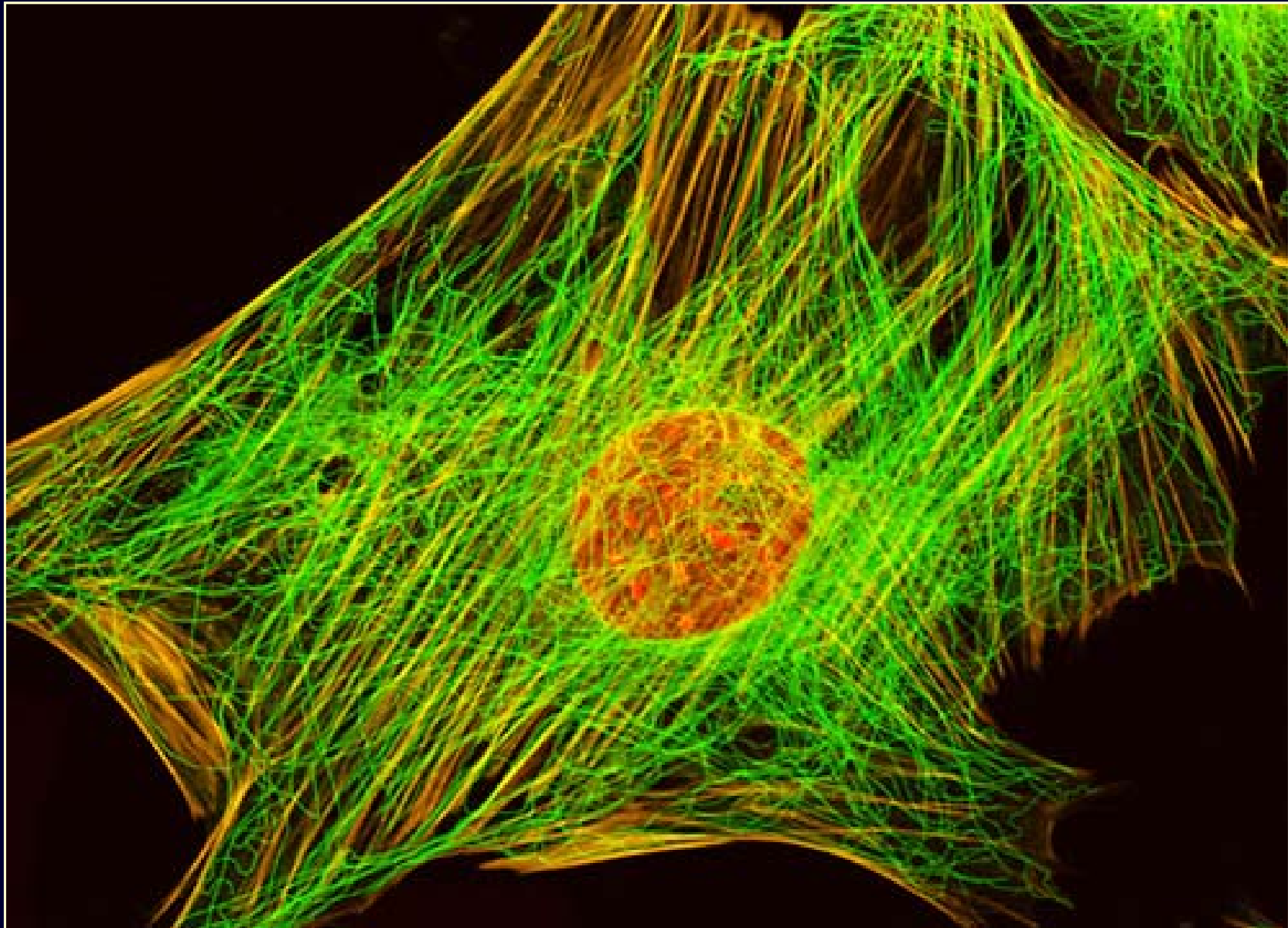
3. Extracelulární matrix (ECM)

- medicínské aspekty – poruchy ECM

CYTOSKELET:

medicínské aspekty (diagnostika, poruchy)
cytoskeletální toxiny (aplikace)





α -tubulin, F-aktin, DNA

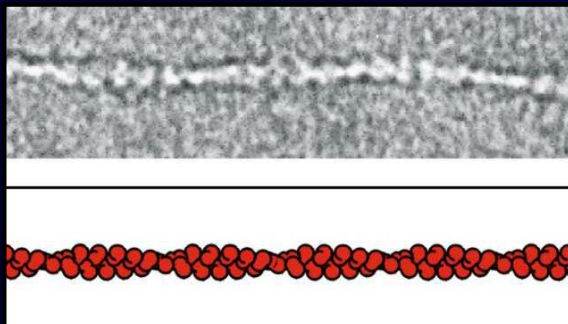
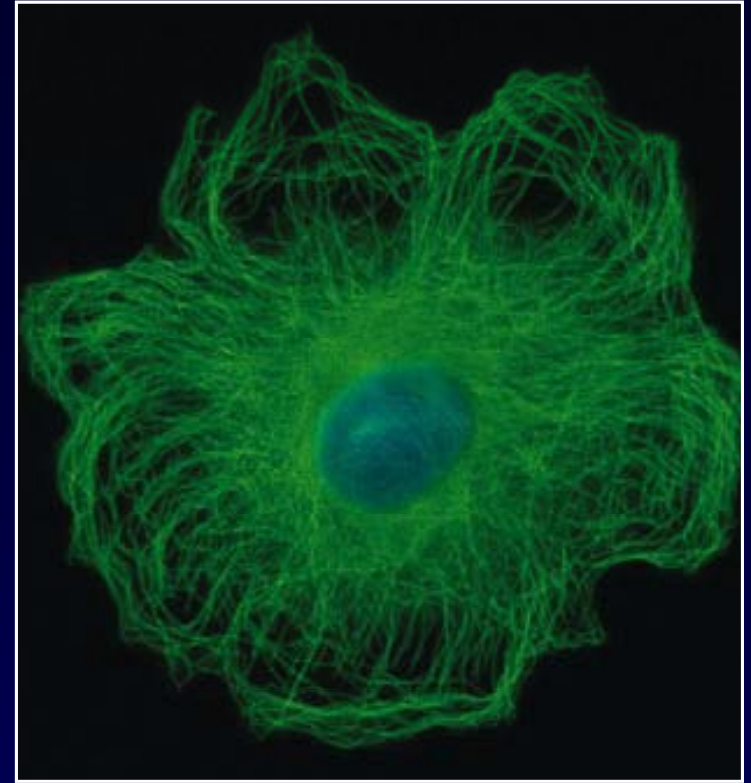
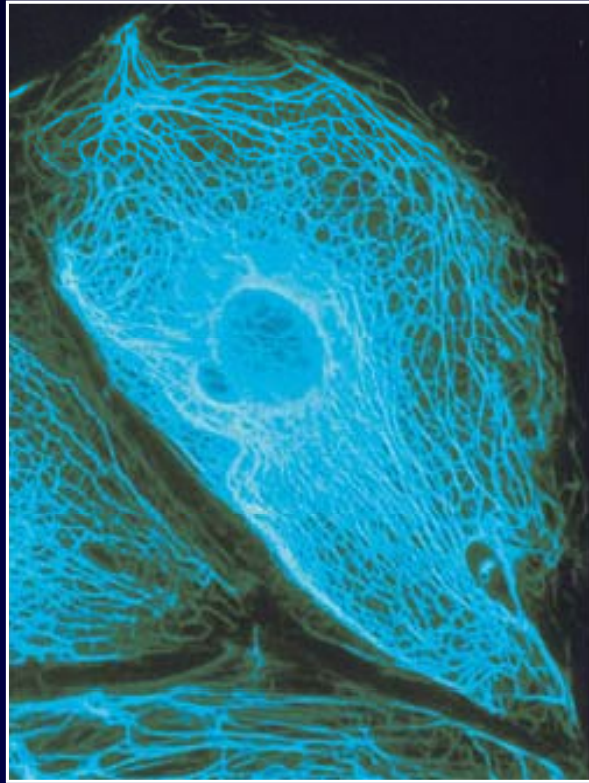
Funkce cytoskeletu

- **morfologické / strukturální**

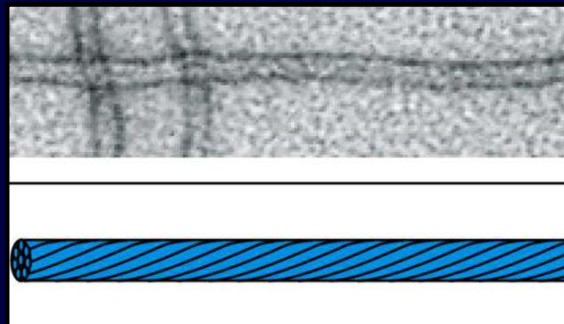
tvár buněk včetně cytoplazmatických protruzí, odolnost vůči vnějším mechanickým vlivům, vnitřní organizace buňky

- **pohybové**

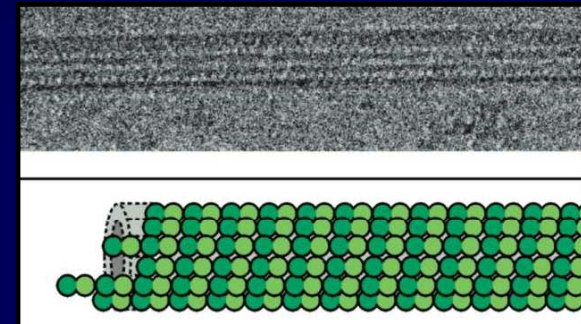
intracelulární transport, pohyb chromosomů v anafázi, pohyb buněk po substrátu, pohyb buněk pomocí kinocilií, svalová kontrakce



aktinová
filamenta - AF
(7 nm)

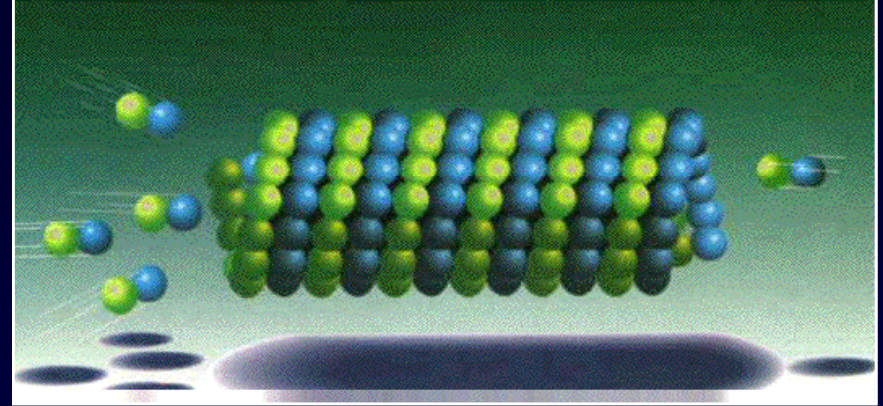


intermediární
filamenta - IF
(10 nm)



mikrotubuly - MT
(25 nm)

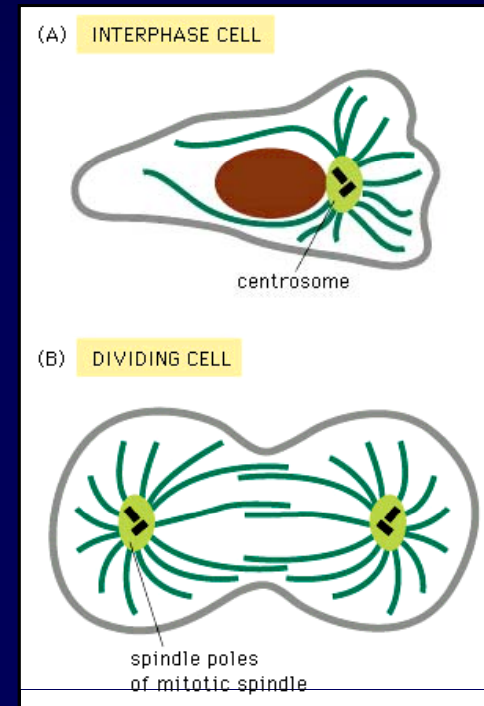
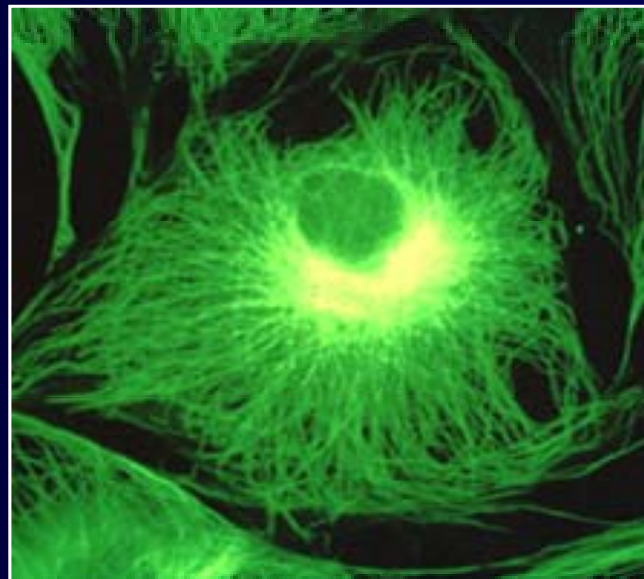
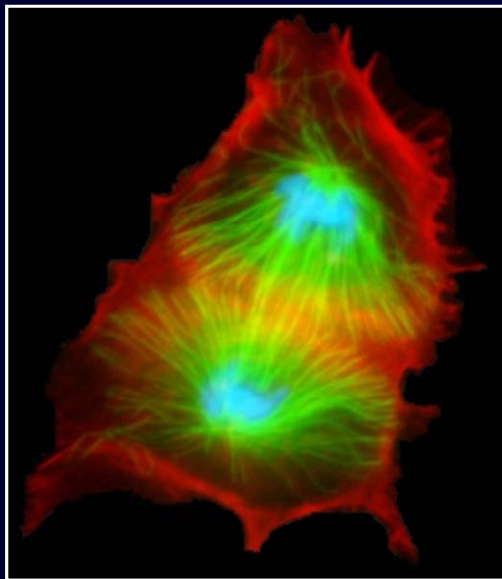
MIKROTUBULY (MT)



- tubulin:

v MT heterodimer: α a β podjednotky
 γ -tubulin (pouze v MTOC)

- MTOC = mikrotubuly organizující centrum
(centrosom, bazální tělíska)



Typy mikrotubulárních struktur v živočišných buňkách a jejich funkce:

- MTOC (mikrotubuly organizující centrum)
- síť cytoplazmatických mikrotubulů
 - intracelulární transport buněčných struktur
 - tvorba axonů a axonální transport
- mitotický aparát (dělicí vřeténko)
 - pohyb chromozomů při mitóze / meióze
- kinocilie (bičíky, řasinky)
 - pohyb buněk

Asociované proteiny (s MT) a jejich poruchy:

Nemotorové AP:

- **MAPs** (MAP-1, MAP-2, ...)
- **tau-proteiny**

Motorové AP:

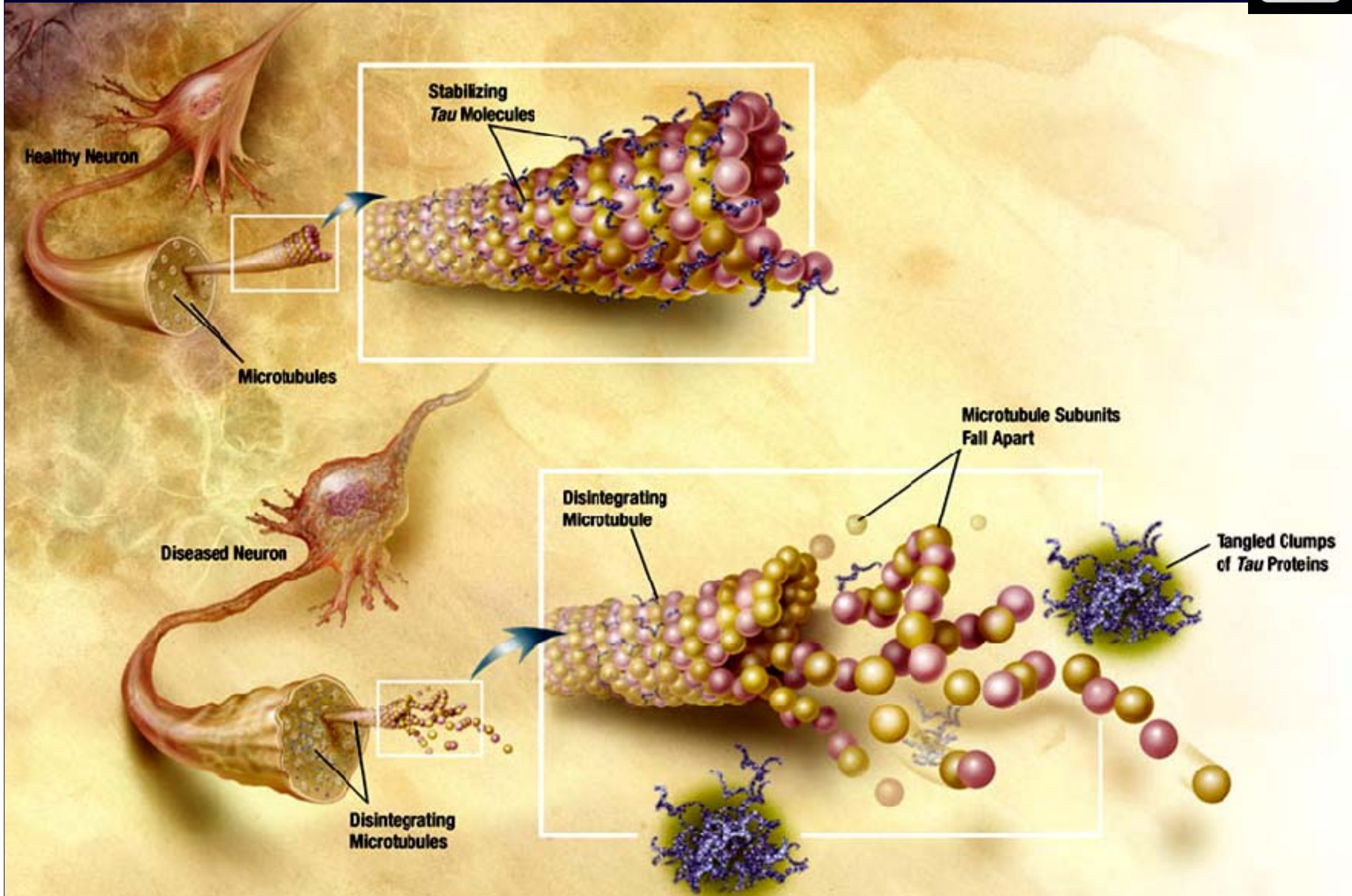
- ATP-ázová aktivita
- **dyneiny** (pohyb od + konce k – konci)
- **kinesiny** (pohyb od – konce k + konci)

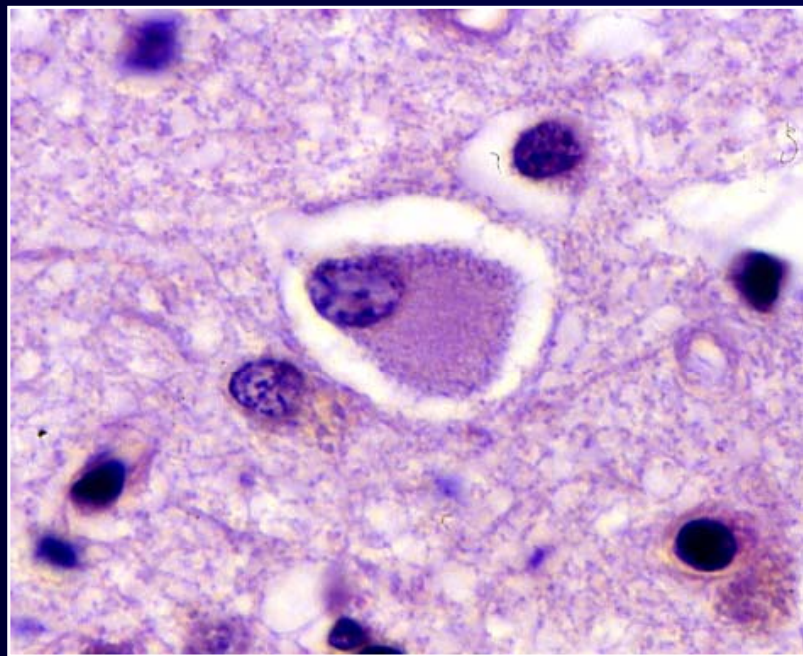
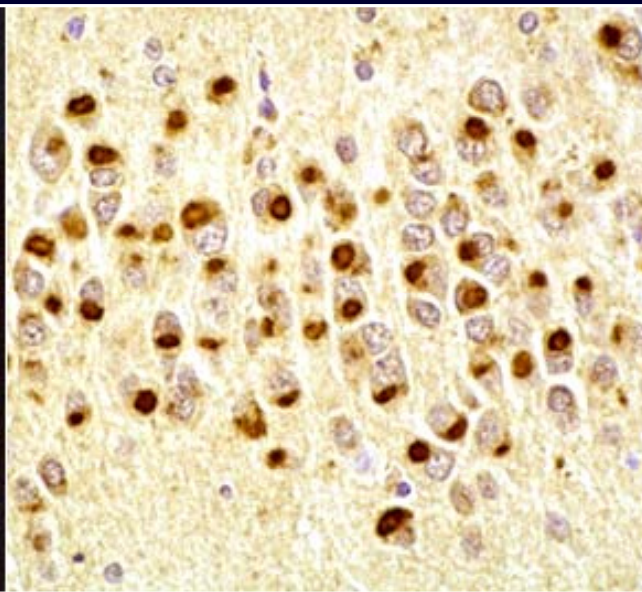


Tauopatie

- tau-protein kódovaný genem *MAPT* (17q21)
- ve fosforylované formě stabilizuje MT (axony)
- **abnormální depozity hyperfosforylovaného tau-proteinu**
 - tělo neuronu a dendrity (Alzheimerova choroba)
 - neurony i gliové buňky (ostatní tauopatie)
- **Pick's Disease**
 - Frontotemporal Dementia with Parkinsonism
 - Linked to Chromosome 17 (FTDP-17)
 - Kortikobazální degenerace
 - Progressive supranuclear palsy
 - Alzheimerova choroba (AD)

Tauopathie



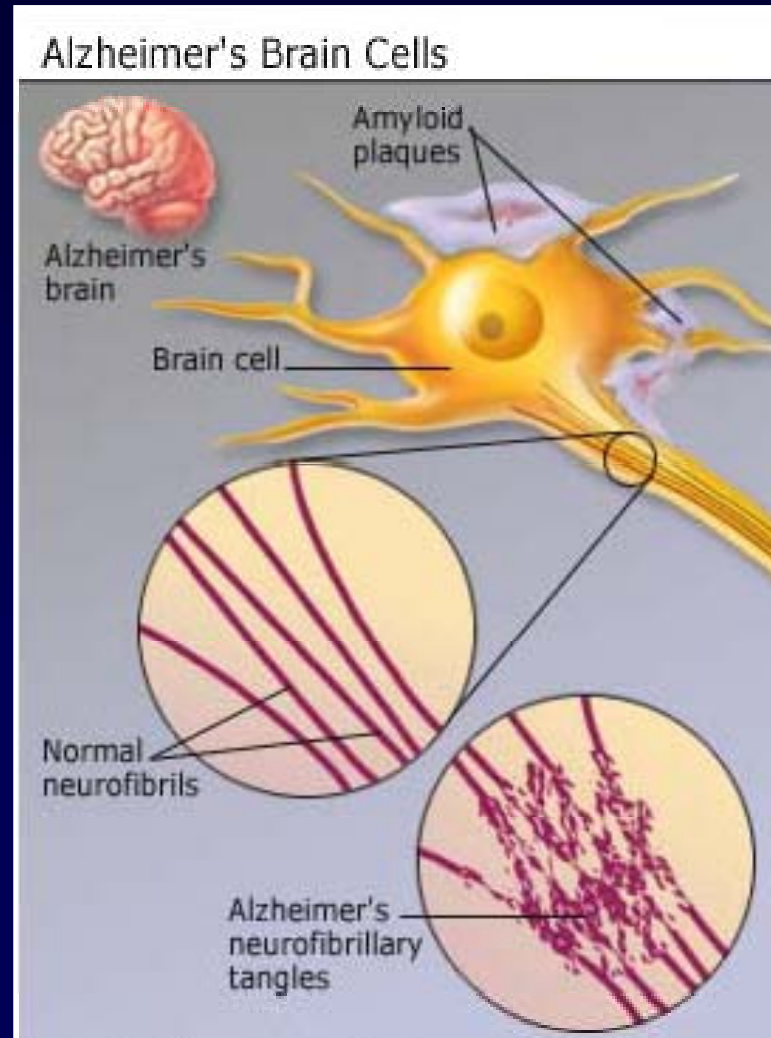
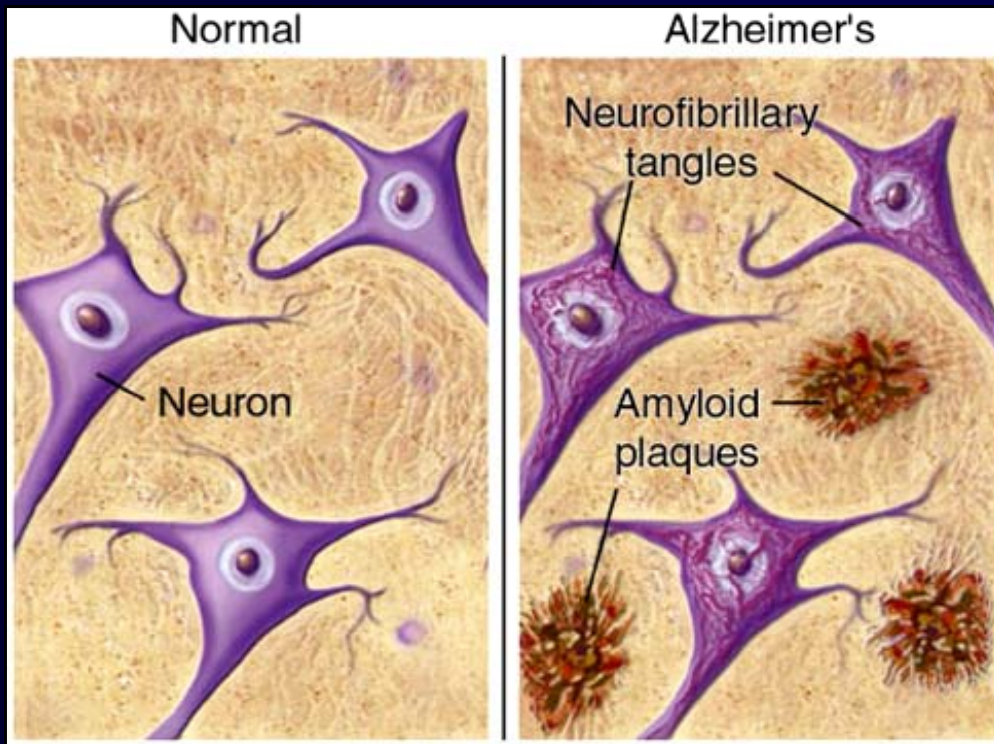
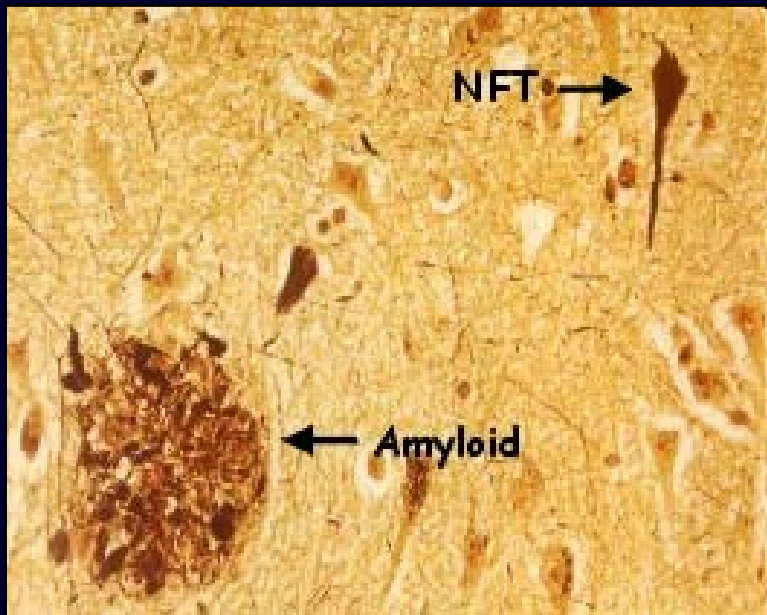


Pick's Disease



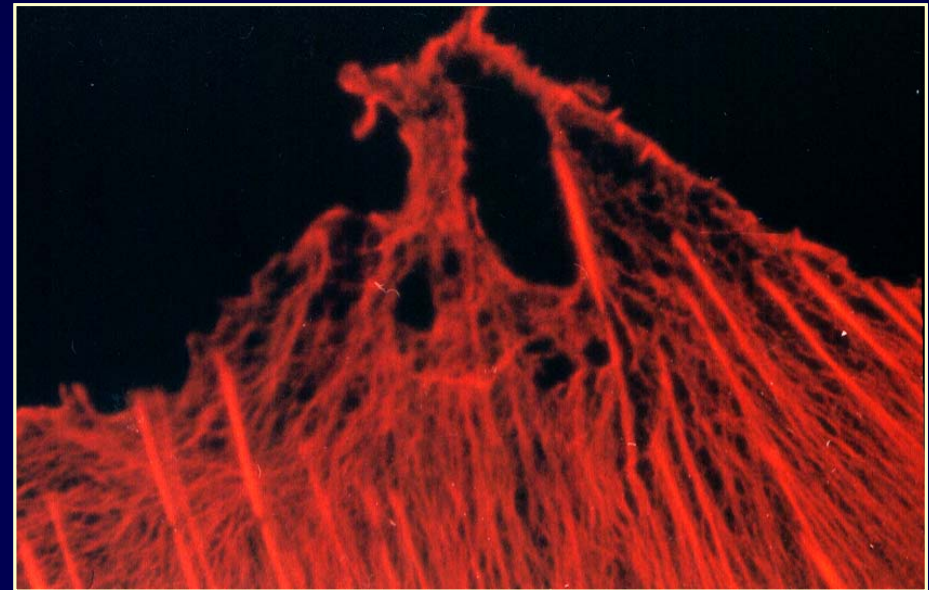
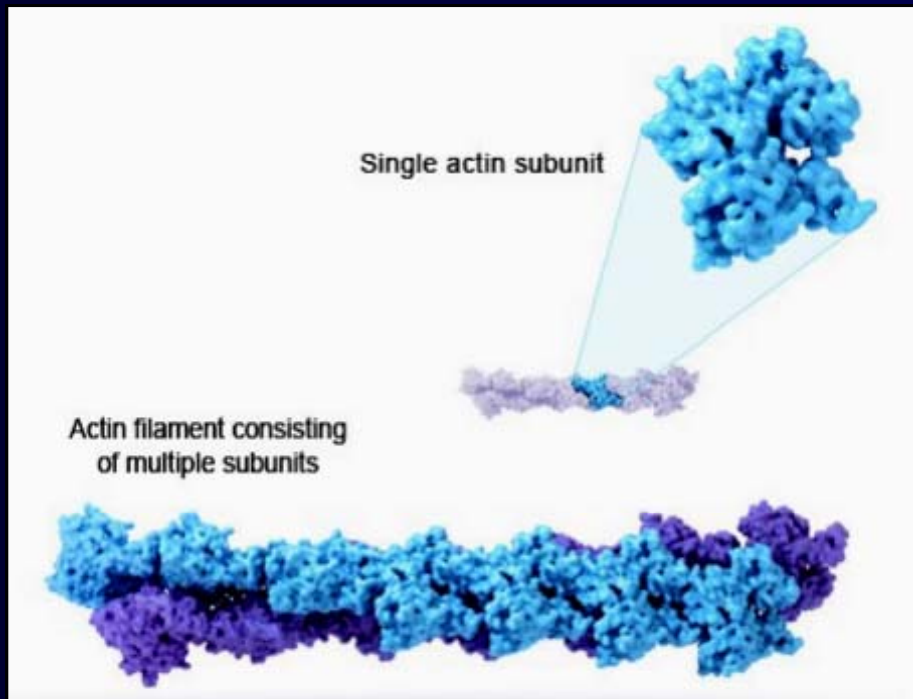
Alzheimerova choroba

- jeden z typů stařecké demence
- 7-10% nad 65 let, 40% nad 80 let
- ztráta paměti (nejprve krátkodobá), dezorientace (prostorová, časová), halucinace, upoutání na lůžko, smrt
- histologická diagnostika post mortem:
senilní plaky (β -amyloid) - extracelulárně
neurofibrilární vřeténka (forforylovaný tau-protein)
– intracelulárně
- komplexní onemocnění (genetické predispozice, vlivy prostředí - např. hliník, věk)



AKTINOVÁ FILAMENTA (AF)

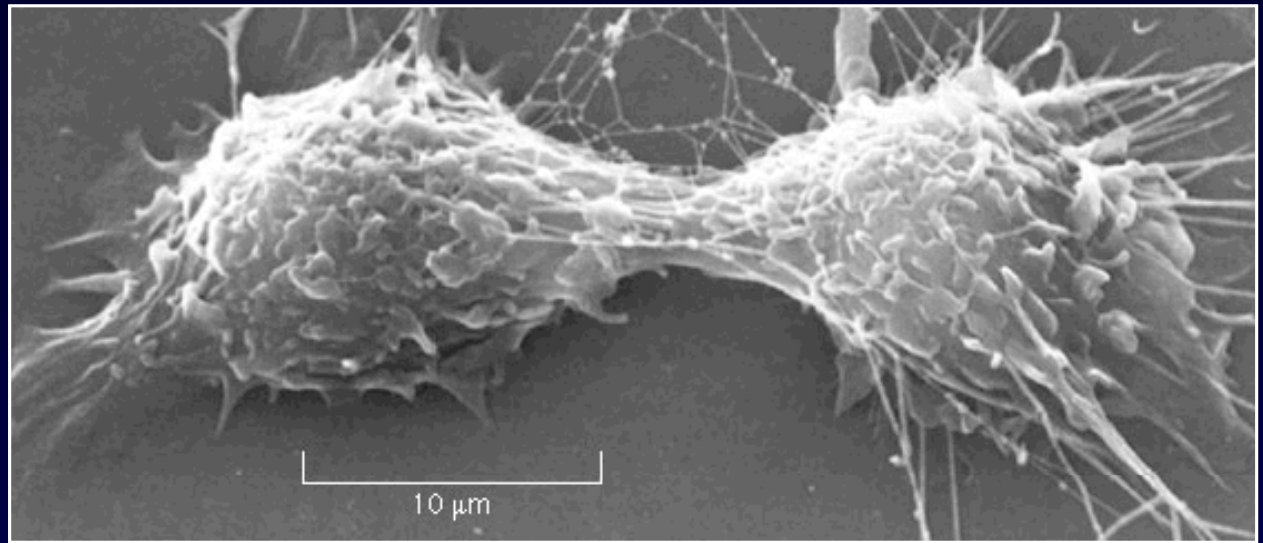
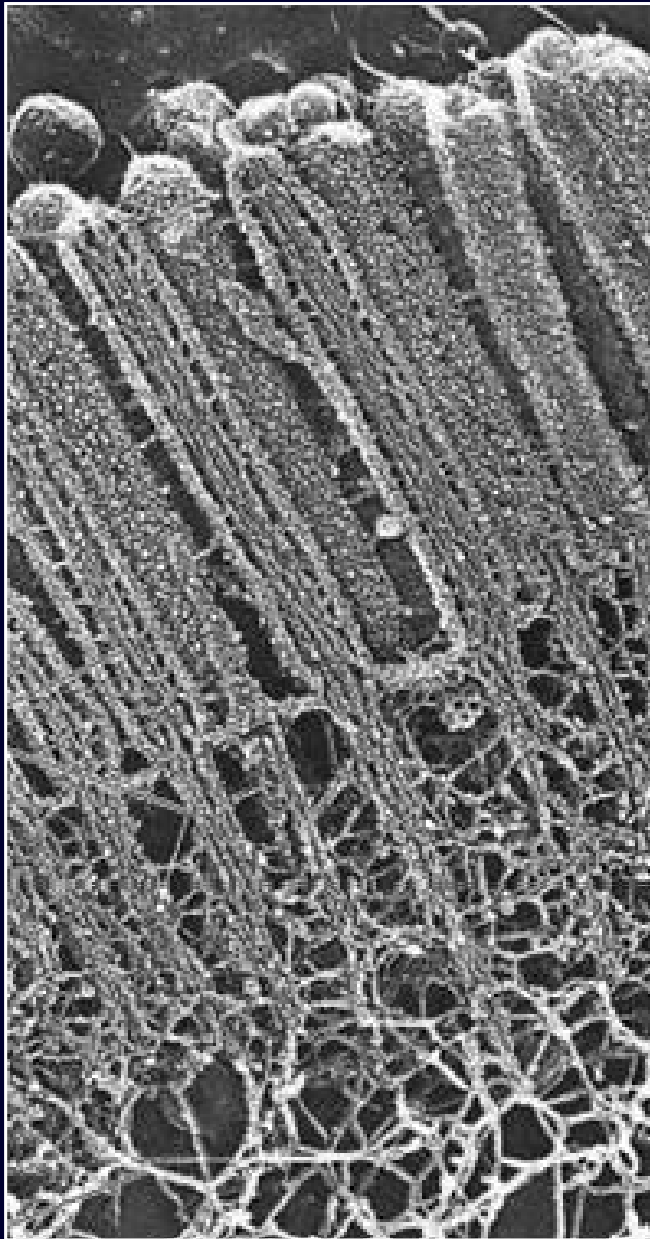
- G-aktin (globulární) → F-aktin (fibrilární)
- AF **tenčí, pružnější, kratší** (ve srovnání s MT)
- **celková délka** AF v buňce **~30x** větší (ve srovnání s MT)



Typy aktinových struktur v živočišných buňkách

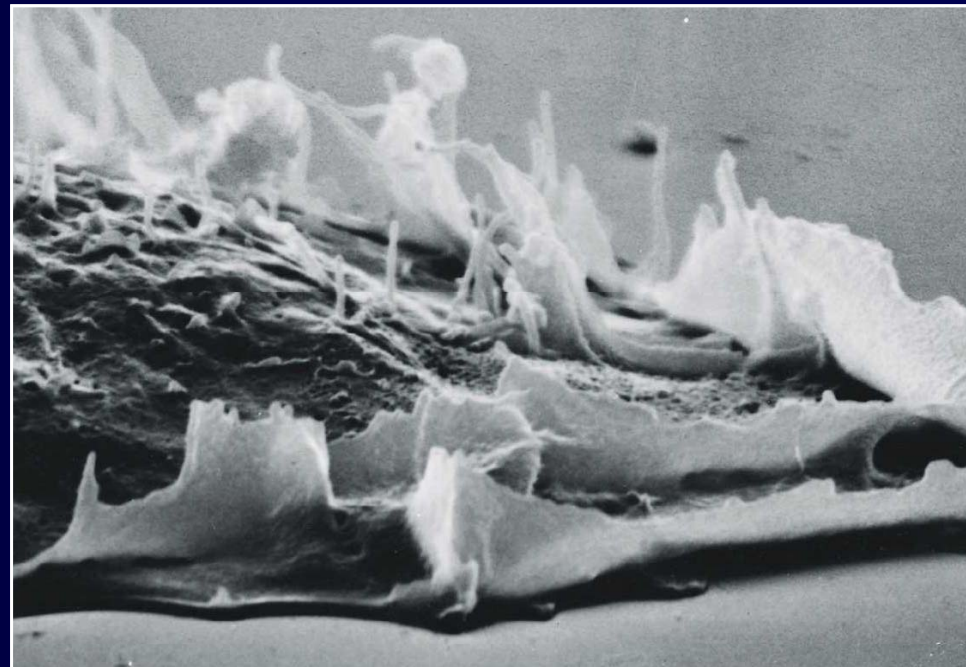
- síť aktinových filament v cytoplazmě
- membránový skelet (buněčný kortex)
- stresová vlákna
- formování cytoplazmatických protruzí:
 - microvilli
 - lamellipodia, filopodia
- kontraktilní prstenec (ring)

microvilli



kontraktilní ring

lamellipodia
filopodia



Funkce aktinových filament

- intracelulární transport (sít' cytoplazmatických AF)
- lokomoce, fagocytóza (stresová vlákna, lamellipodia)
- interakce buněk se substrátem (fokální adheze)
- změny tvaru buňky, axonální růst (lamellipodia, filopodia)
- cytokineze (kontraktilní ring)
- perforace vajíčka při fertilizaci (polymerace aktinu v akrosomech)
- zvětšení buněčného povrchu

mikrokky (microvilli) - střevní epitel
světločivné výběžky - tyčinky sítnice
stereocilie - kochleární epitel

Nemotorové asociované proteiny:

→ polymerace a prostorové uspořádání AF

- nukleace: **ARPs** (actin related proteins)
- zajištění poolu G-aktinu: **thymosiny**
- regulace délky AF: **β -aktinin, Cap Z protein, capping protein**
- stimulace polymerace AF: **profilin**
- depolymerace AF: **cofilin, ADF, depactin**
- spojování AF: **filamin, ABP, gelactin, villin, fimbrin, fascin, α -aktinin**
- štěpení AF: **gelsolin, brevin**

Motorové asociované proteiny:

→ pohybové funkce AF

- **myosiny**

- konvenční (typ II)

- cytokineze, svalová kontrakce

- nekonvenční (typ I, III až XV)

- pohyb membránových vezikulů v blízkosti plazmatické membrány

- tvorba vnitřní struktury protruzí plazmatické membrány

- **tropomyosin, troponin**



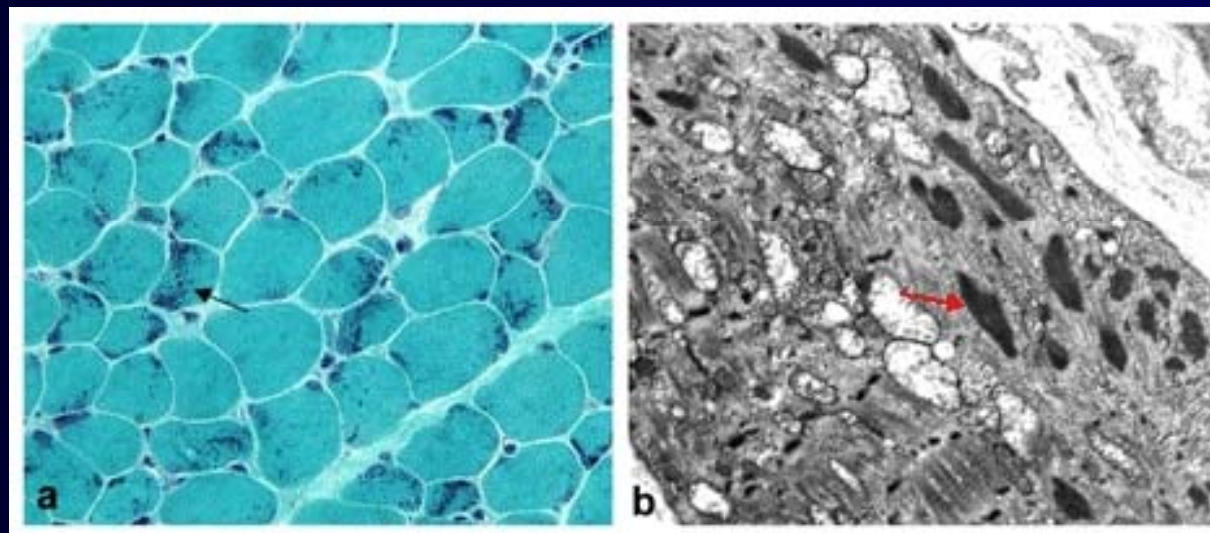
Změny AF a AP jako příčina onemocnění

Změny exprese isoformem aktinu

- kardiomyocyty u pacientů se srdečními příhodami (patologická exprese α -skeletálního aktinu)

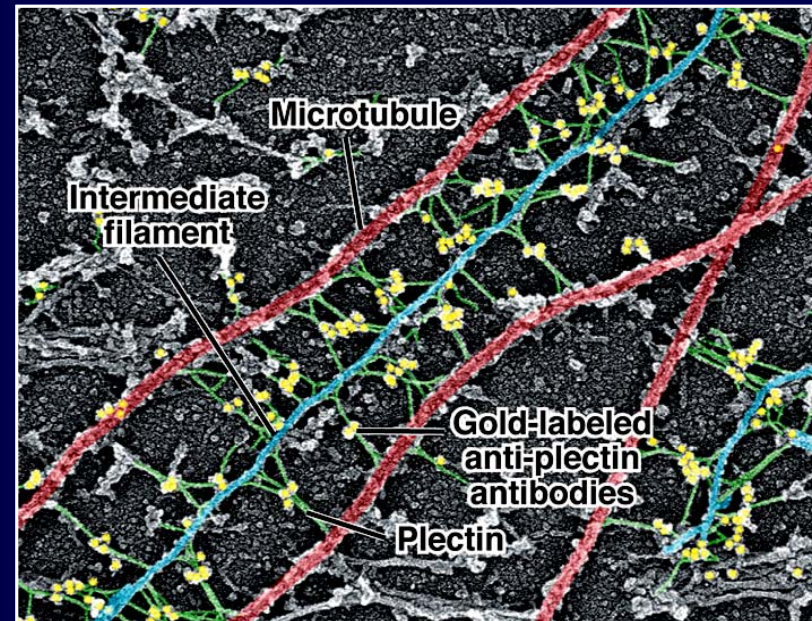
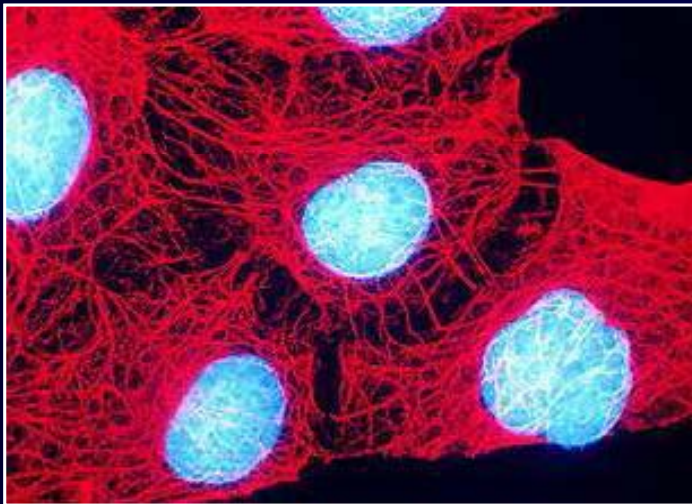
Mutace v genech pro aktin i AP

- např. nemaline myopatie



INTERMEDIÁRNÍ FILAMENTA (IF)

- stavební protein se liší podle histogenetického typu tkáně → **využití v diagnostice**
- fibrilární molekula, vždy **IF-doména** na N-konci
- **funkce IF:**
zvýšení mechanické odolnosti buňky, determinace tvaru, lokalizace organel, integrace cytoskeletu



Třídy intermediárních filament

(I) a (II) keratiny

- epiteliální buňky
- AP: filagrin, plectin, dermoplakin

(III) vimentin, desmin, GFAP, synemin, peripherin

- pojivová tkáň, svalové buňky, neuroglie
- AP: plectin, filensin, epinemin, paranemin

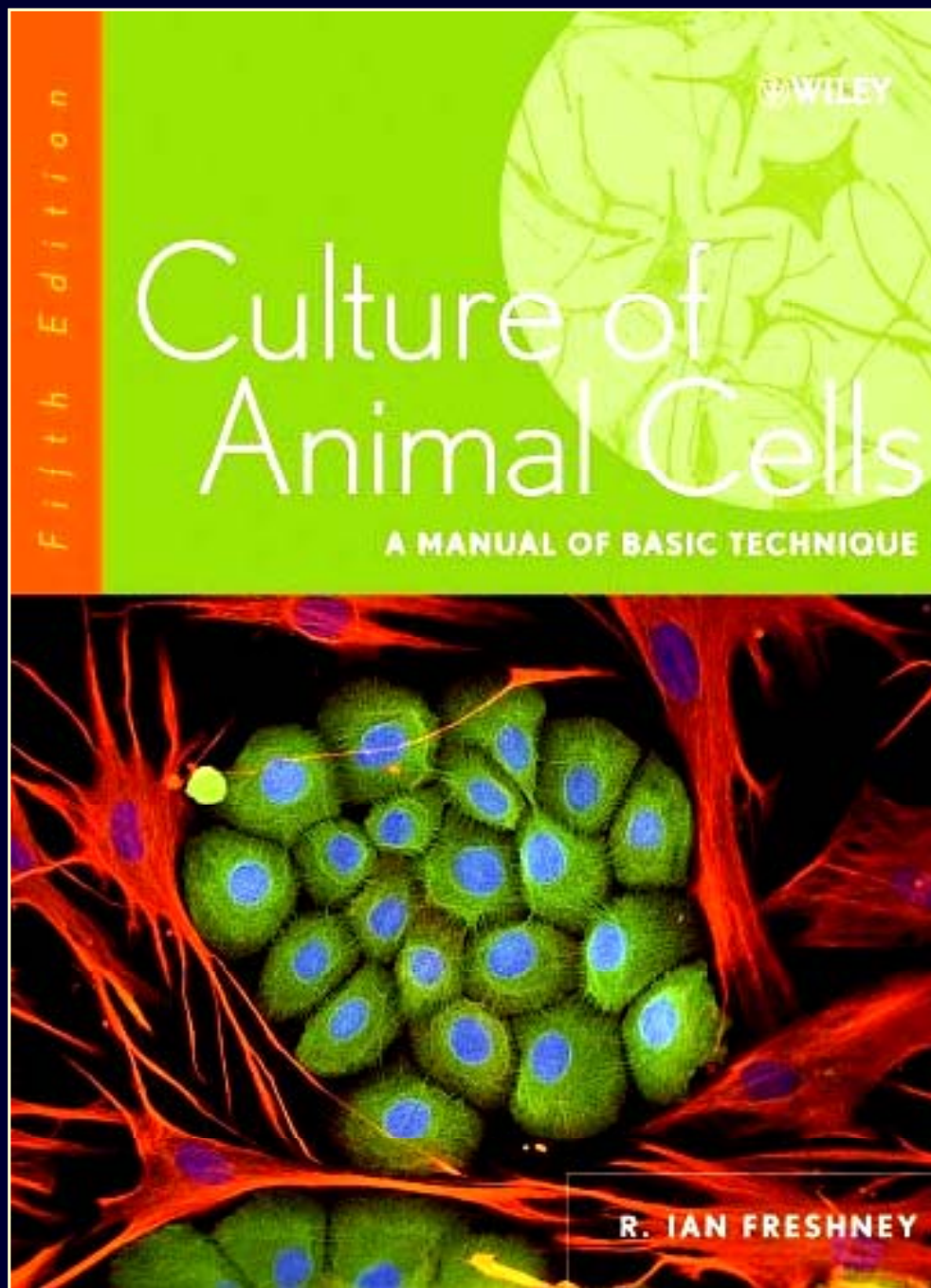
(IV) neurofilamenta, α -internexin

- neurony
- AP: plectin

(V) jaderné laminy

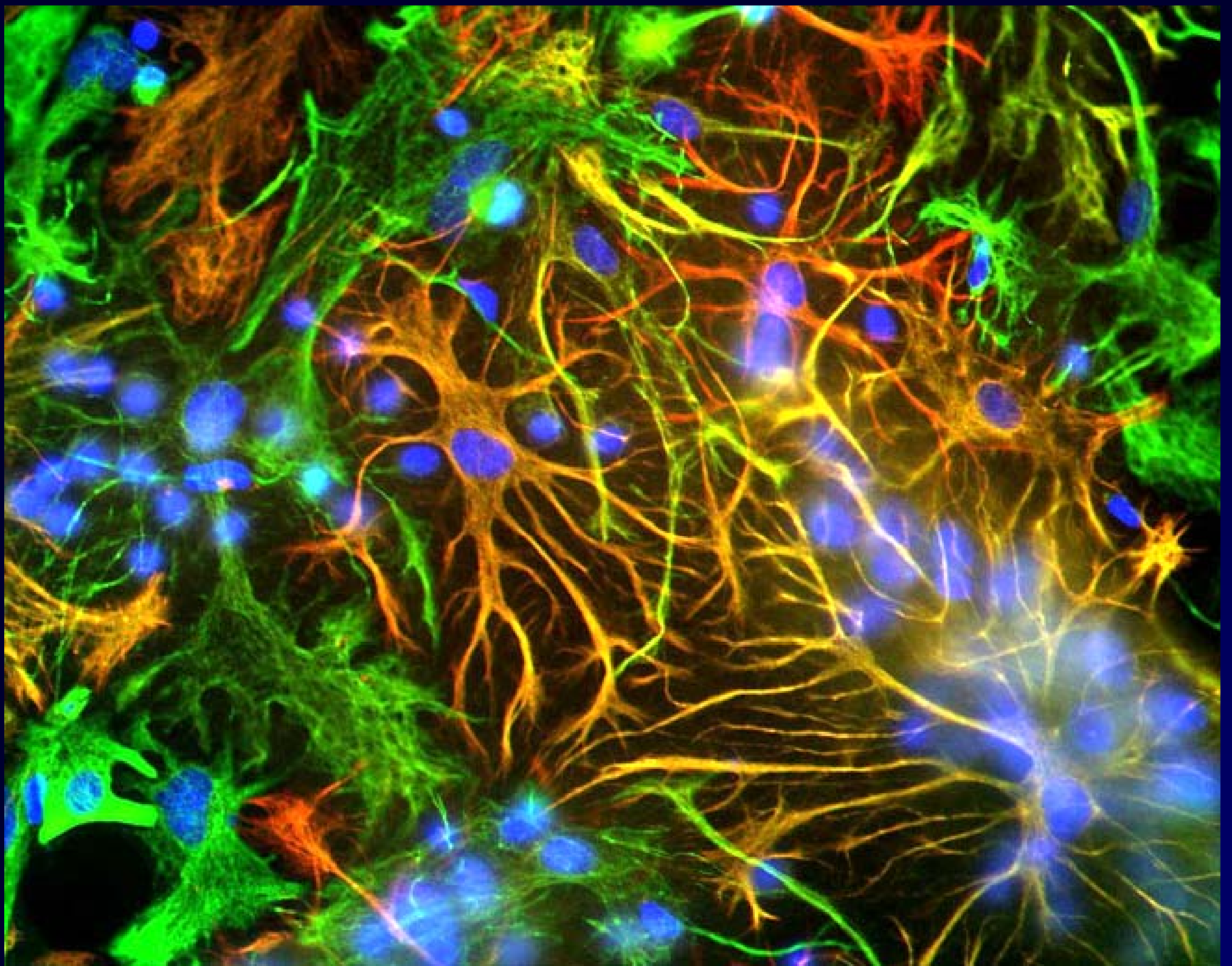
(VI) nestin

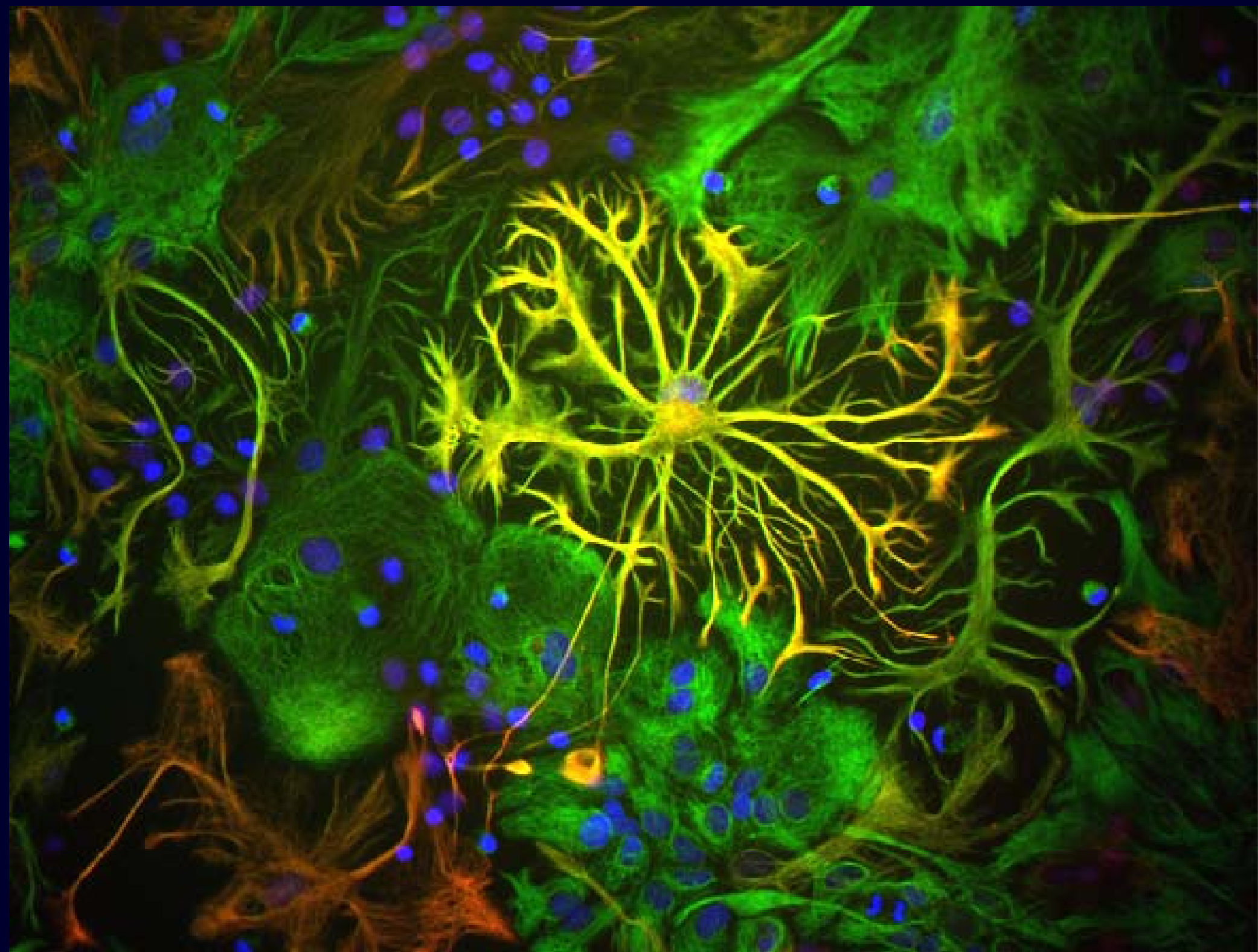
- neuronální kmenové buňky, nádorově transformované buňky, endotelie

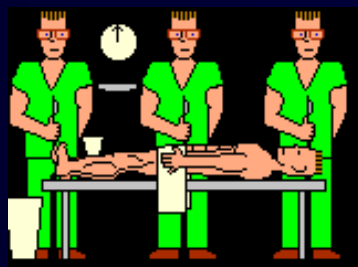


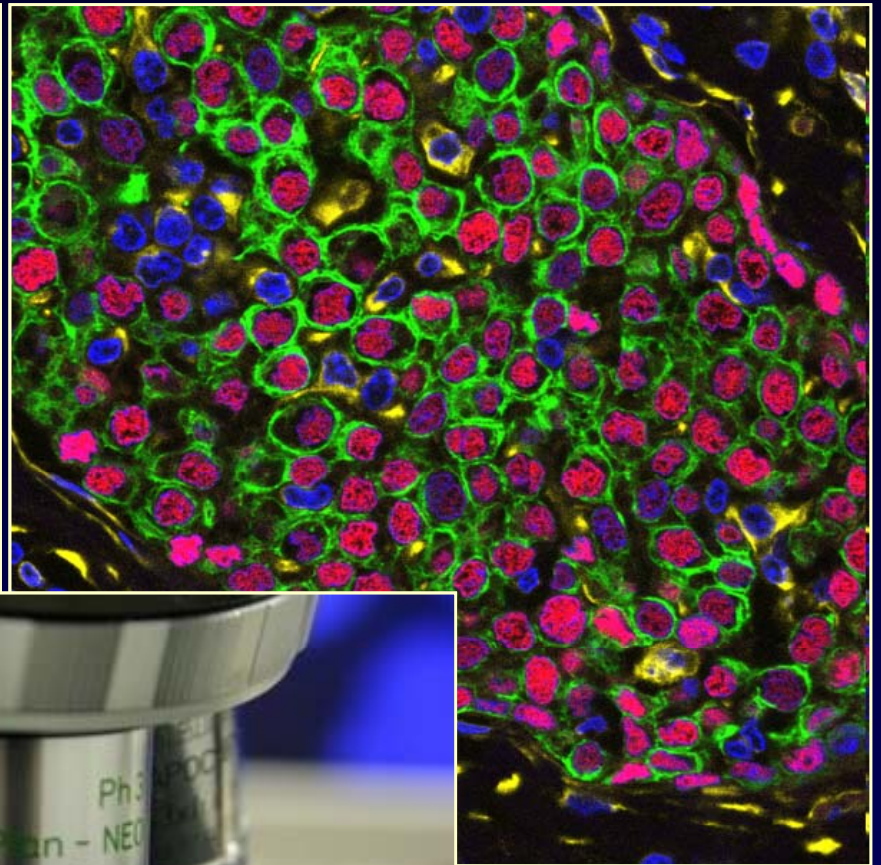
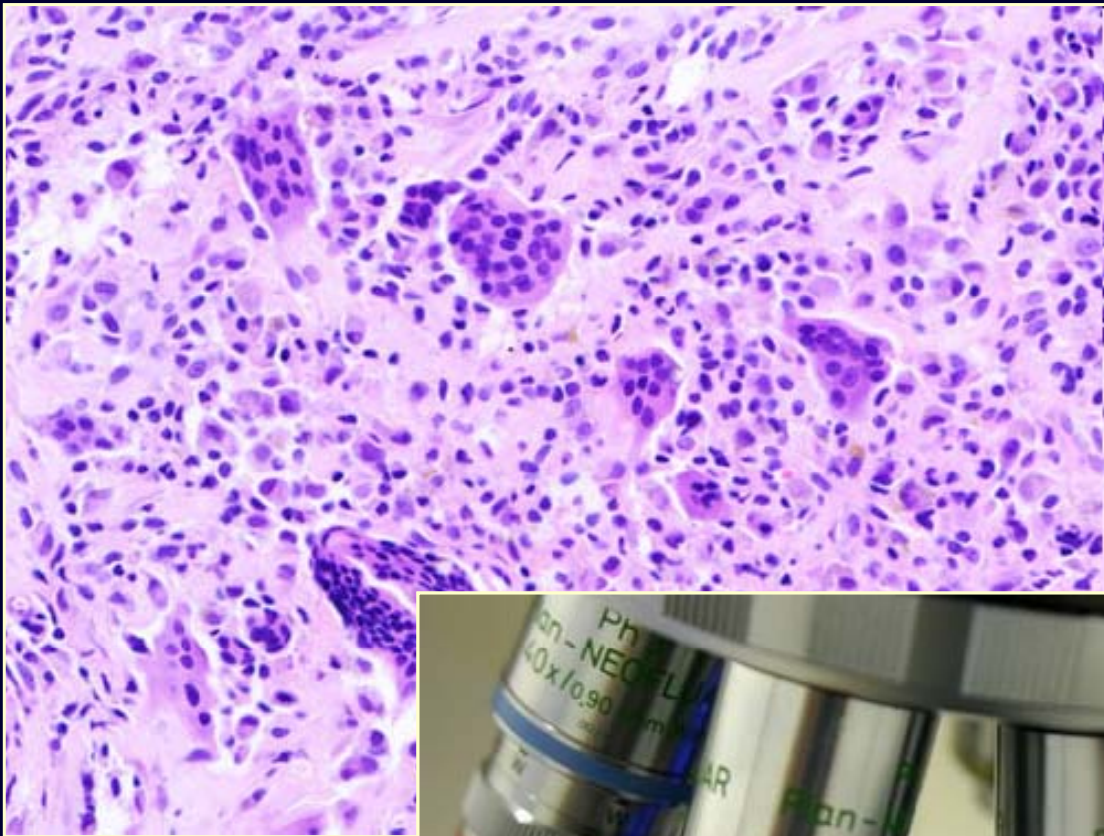
vimentin / DNA
(fibroblasty)

cytokeratin / DNA
(epitelie)

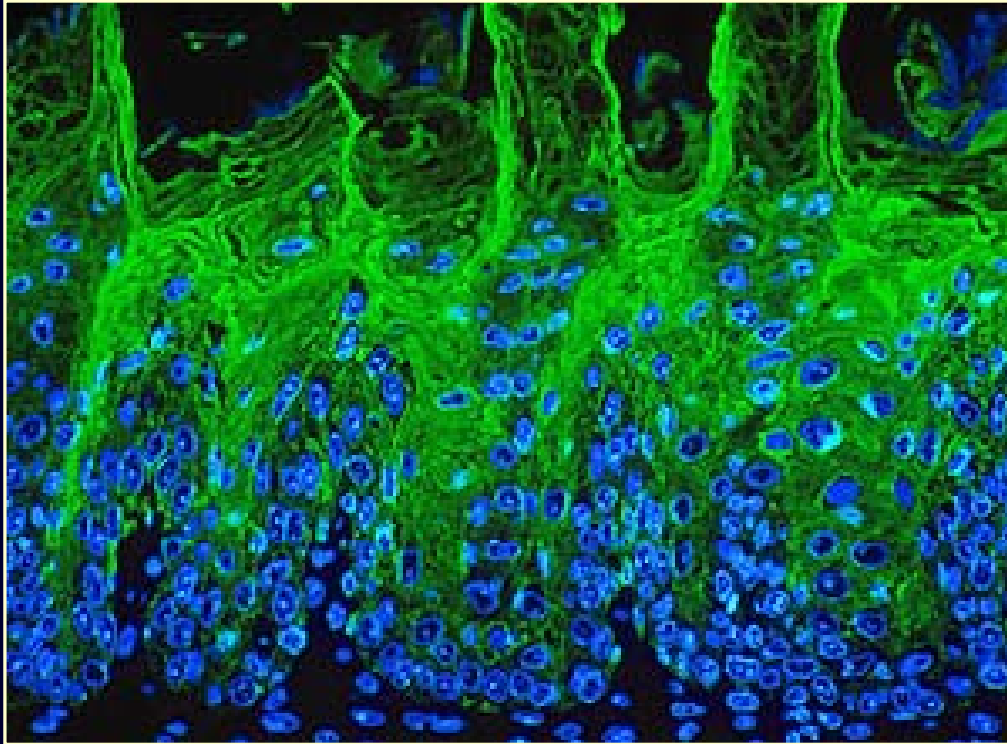




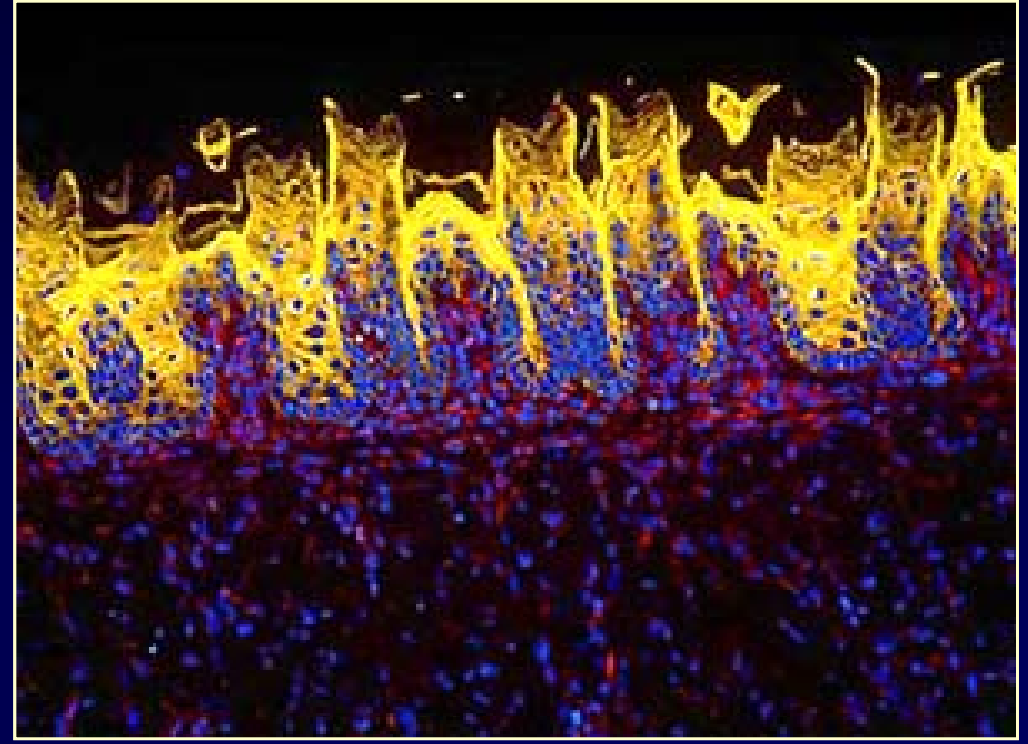




Řez jazykem krysy

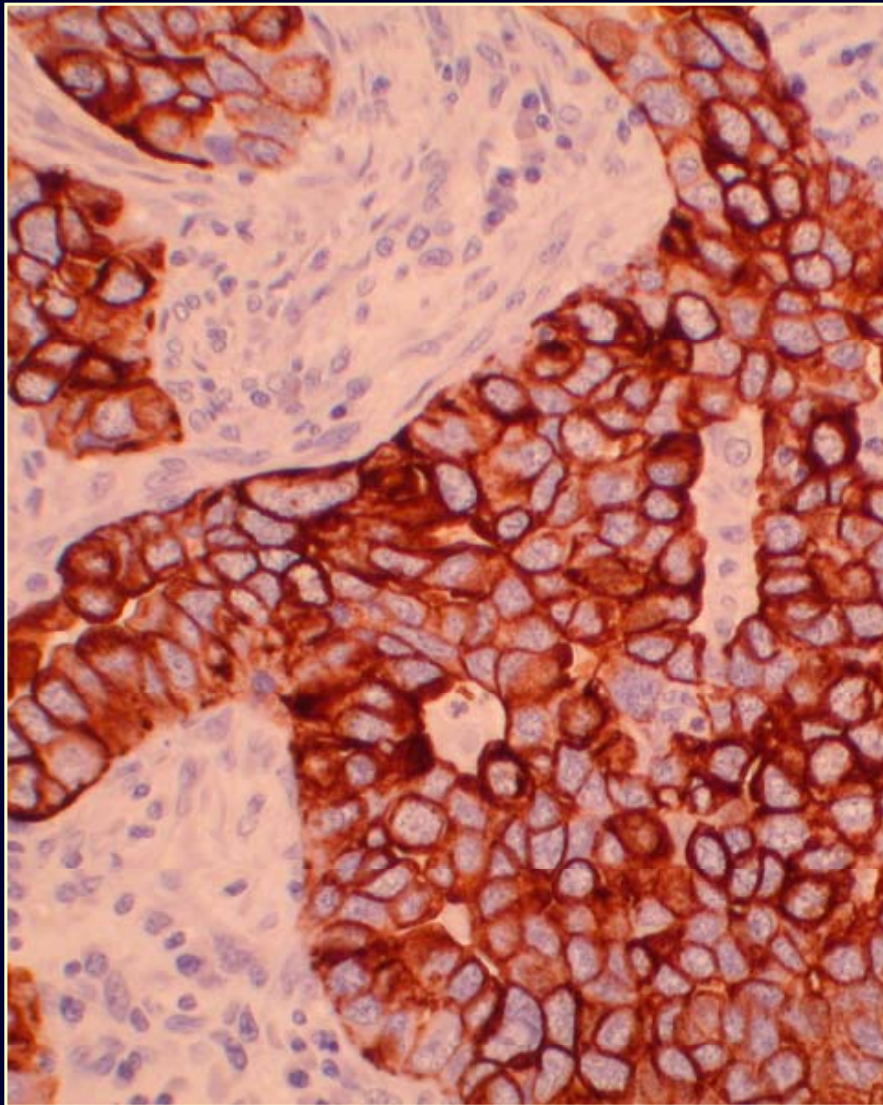


cytokeratin / DNA

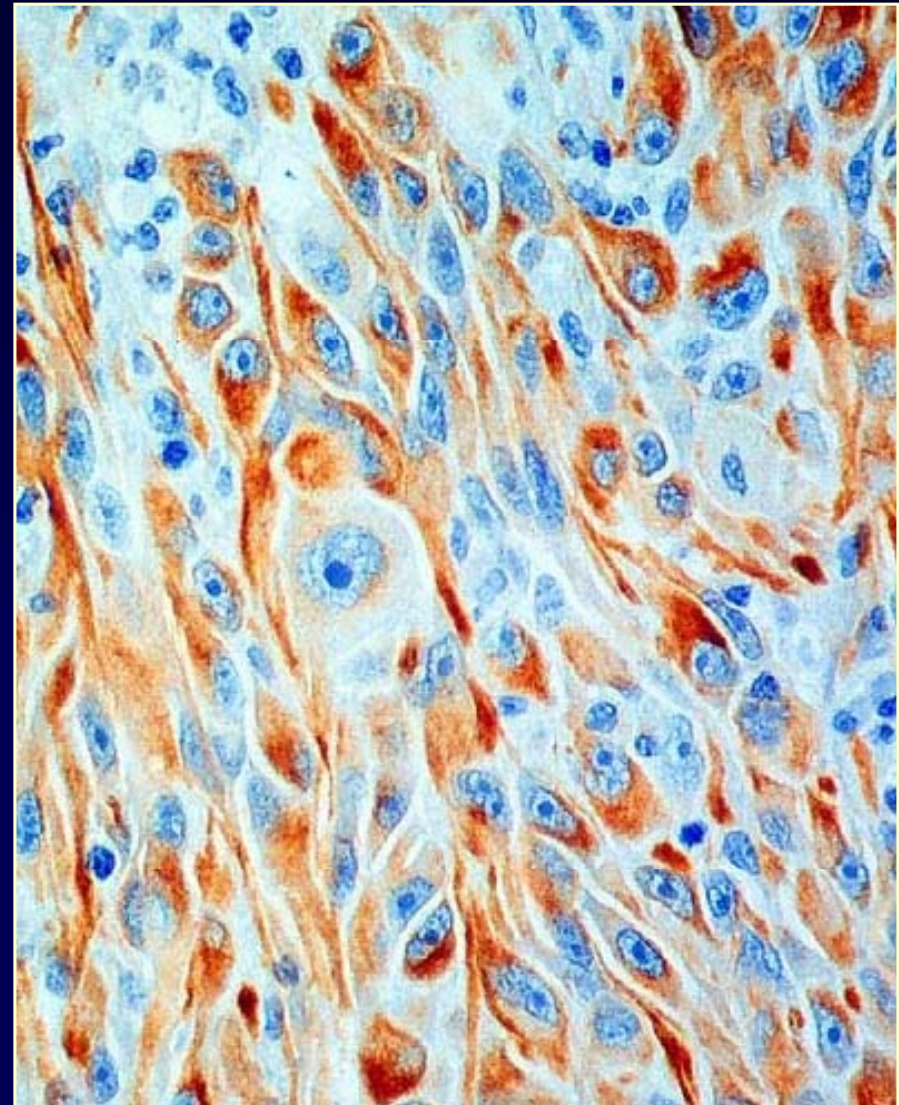


cytokeratin / vimentin / DNA

Imunohistochemická detekce proteinů IF



cytokeratin

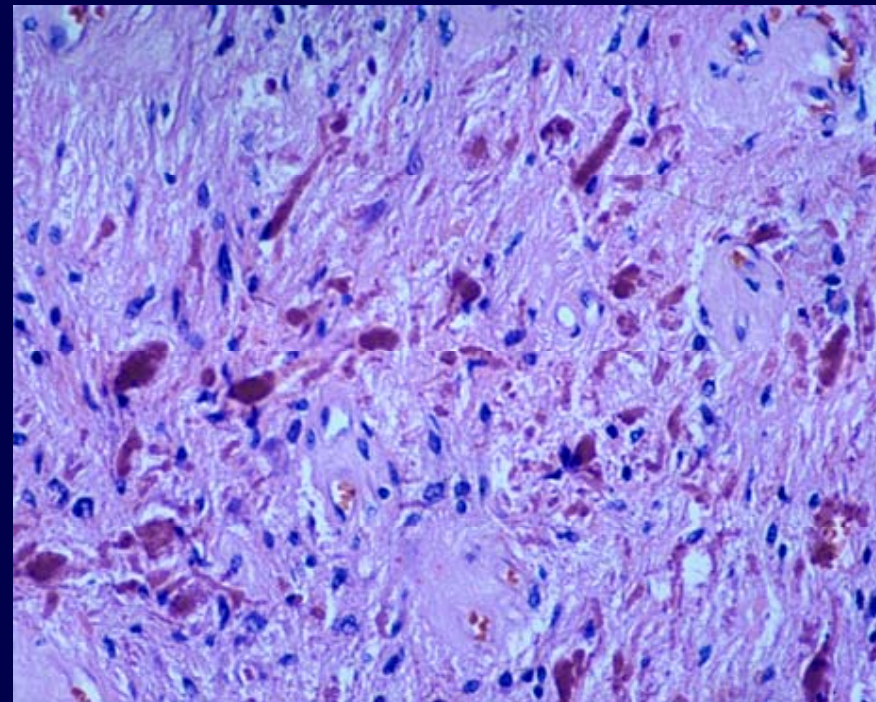
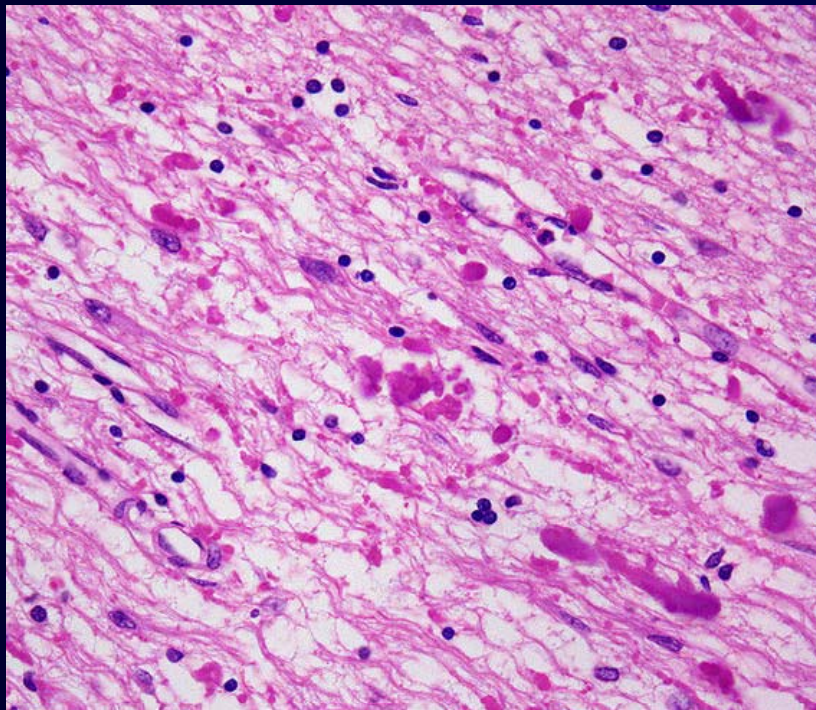


vimentin



Alexandrova choroba (Alexander disease)

- fatální neurodegenerativní onemocnění
- dominantní mutace v genu pro GFAP
- tvorba tzv. Rosenthal fibers v mozkové tkáni (eosinofilní okrouhlé nebo protáhlé struktury produkované astrocyty)



CYTOSKELETÁLNÍ TOXINY

- místem zásahu MT nebo AF
- inhibitory polymerace nebo depolymerace
- přírodní látky (rostlinné alkaloidy, mykotoxiny)



Vinca rosea /
Catharanthus roseus
(barvínek růžový)

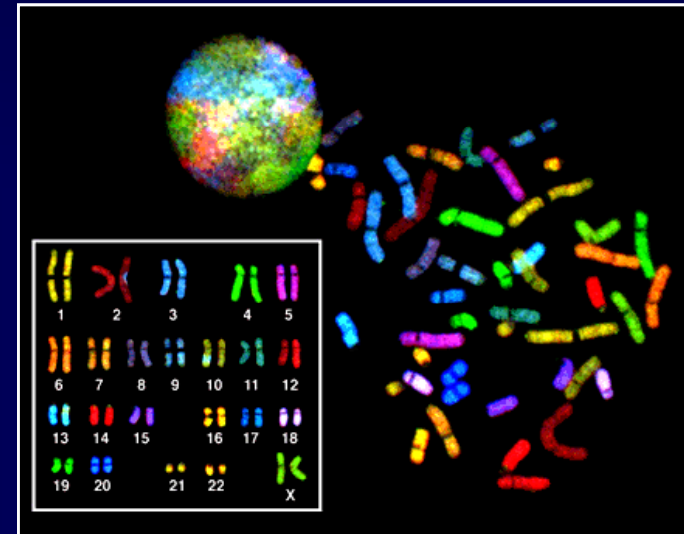
Mikrotubulární toxiny - inhibitory polymerace

- tzv. vinca-alkaloidy (*Vinca major*)
vinkristin, vinblastin, vinorelbin
- mechanismus:
tvorba parakrystalů z molekul tubulinu
- využití:
chemoterapie - např. Velban,
Navelbin



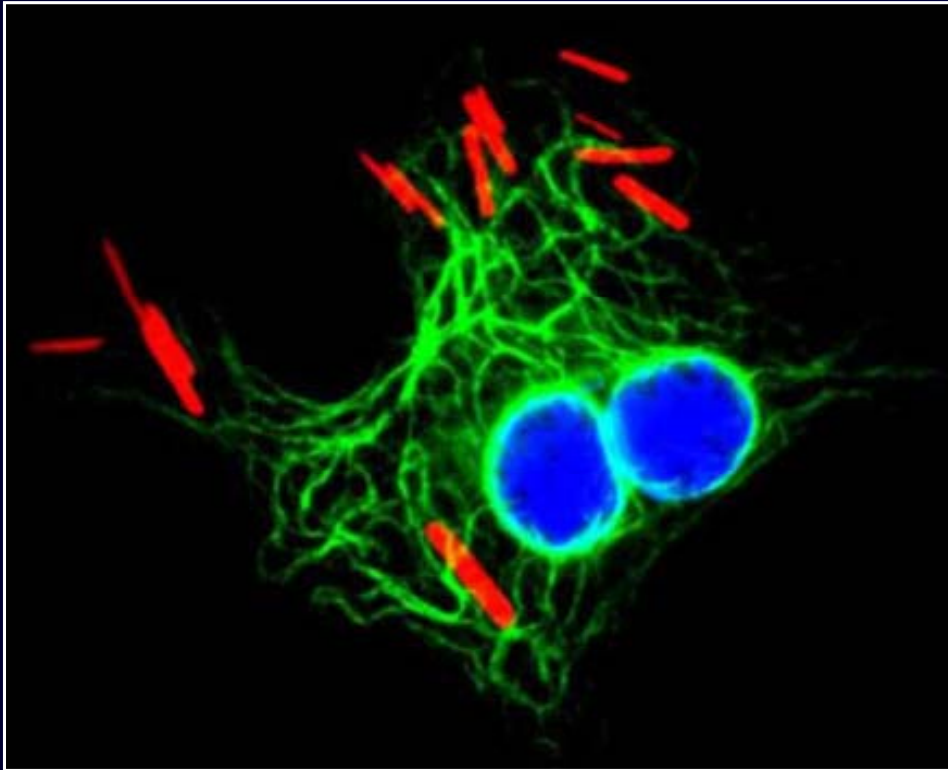
Mikrotubulární toxiny - inhibitory polymerace

- **colchicine** (*Colchicum autumnale*), colcemide
- mechanismus:
vazba na molekuly tubulinu
- využití:
cytogenetická vyšetření - tzv. c-mitózy
polyploidizace u rostlin
léčba ataků dny (pakostnice)

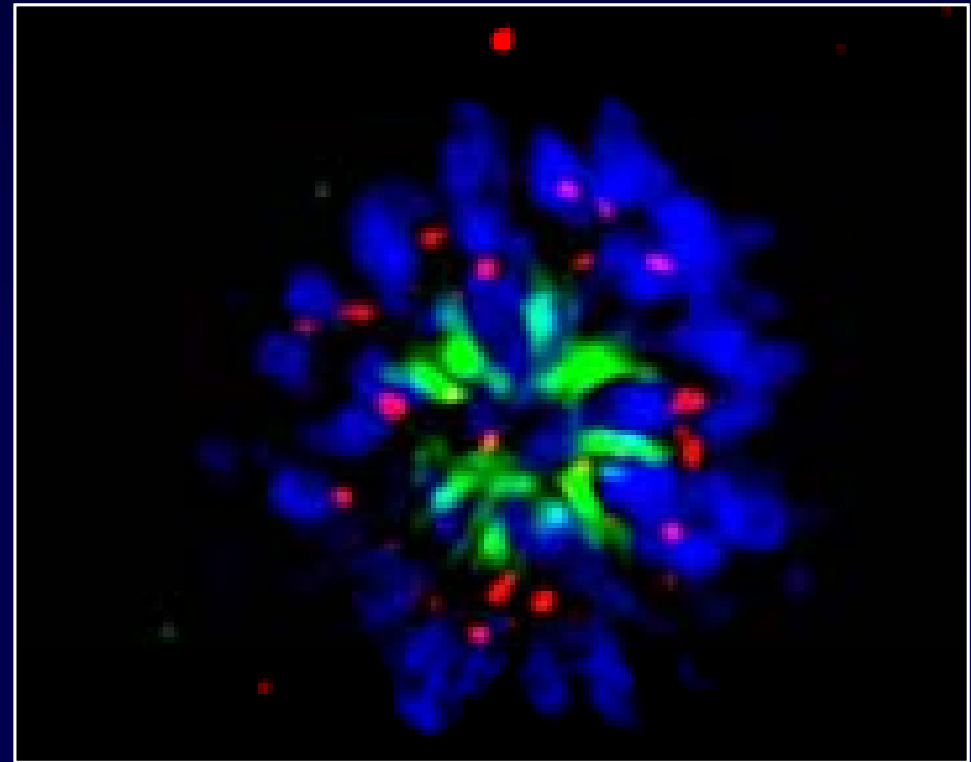


Poruchy sítě MT po působení vinblastinu

α -tubulin / DNA



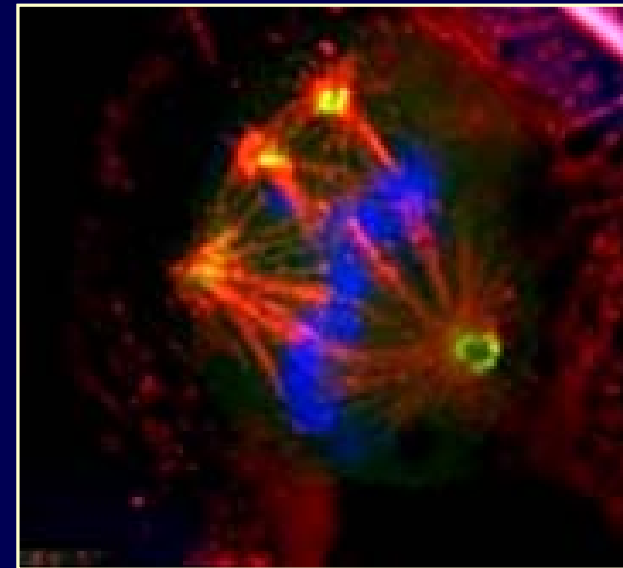
linie 3T3
(myš - kožní vazivo)



linie MDCK
(pes - ledviny)

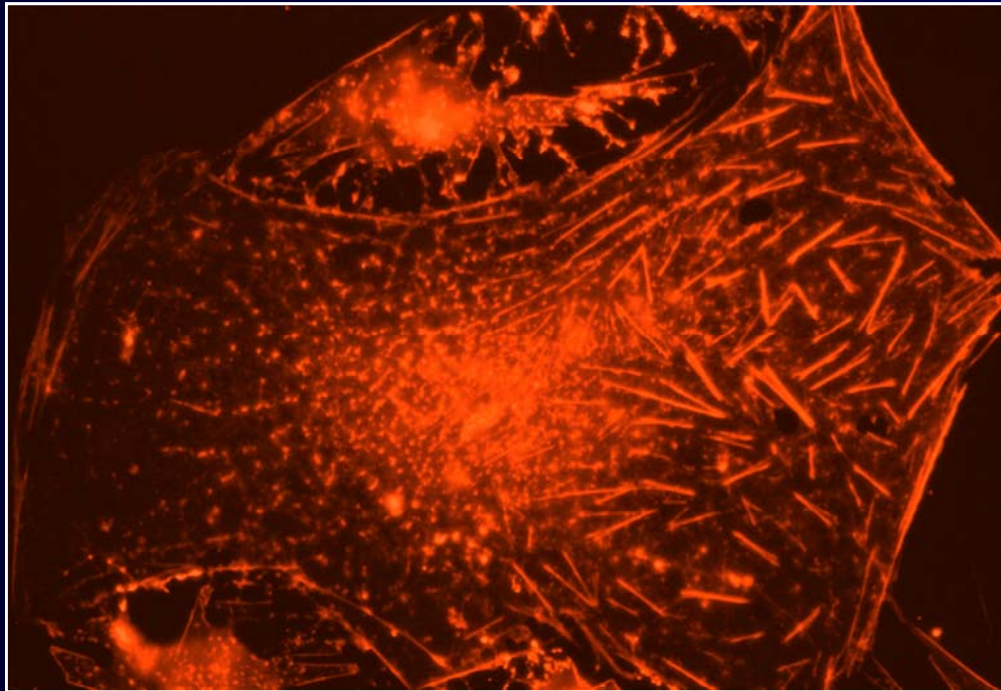
Mikrotubulární toxiny - inhibitory depolymerace

- **paclitaxel** (*Taxus baccata*), docetaxel
- mechanismus:
stabilizace mikrotubulů
- využití:
chemoterapie - Taxol, Taxotere



Toxiny aktinových filament - inhibitory polymerace

- cytochalasiny, latrunculin
- mechanismus:
vazba na barber end nebo na G-aktin
- využití:
základní i aplikovaný výzkum

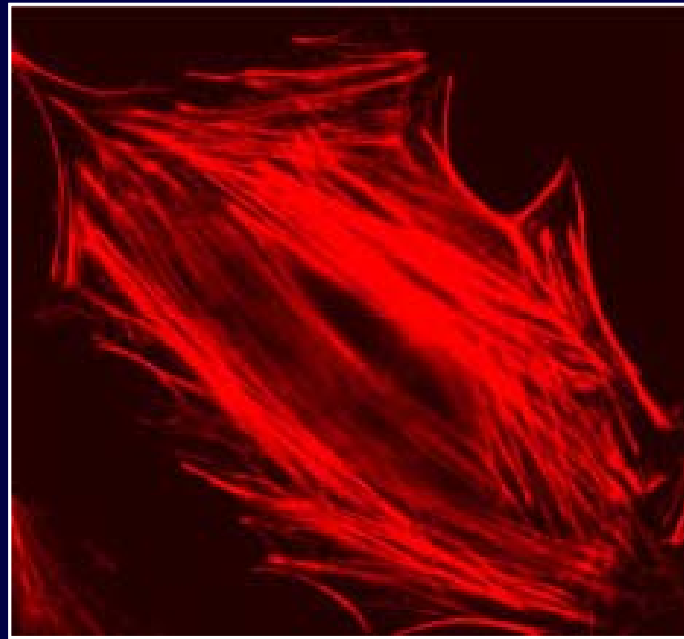


Lidský kožní fibroblast
cytochalasin

F-aktin

Toxiny aktinových filament - inhibitory depolymerace

- phalloidin (*Amanita phalloides*), jasplakinolid
- mechanismus:
vazba na F-aktin, stabilizace filament
- využití:
základní výzkum (vizualizace aktinových filament)



F-aktin:
phalloidin -
rhodamin

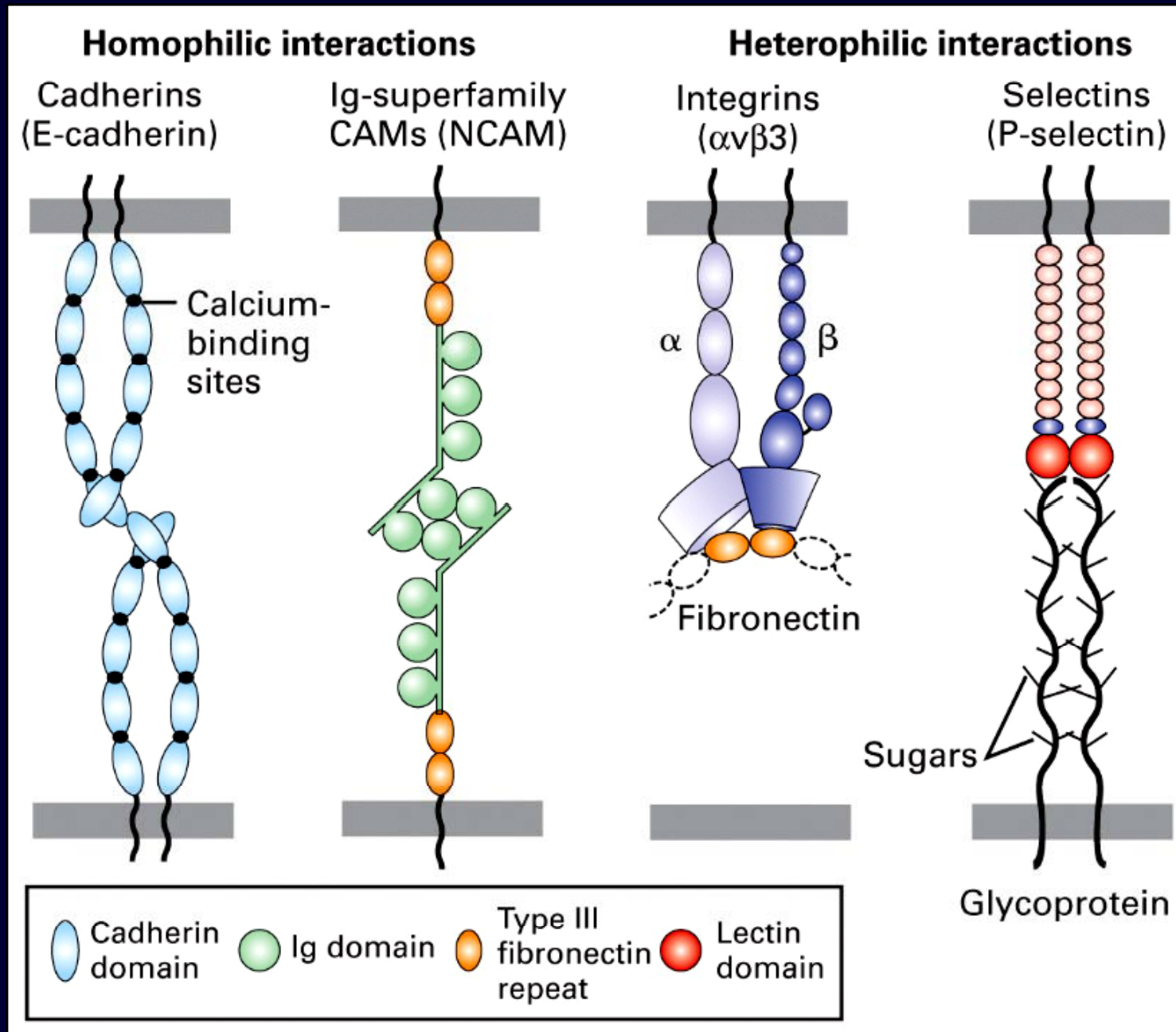
MEZIBUNĚČNÉ INTERAKCE A SPOJE:

medicínské aspekty - poruchy interakcí a spojů

MEZIBUNĚČNÉ INTERAKCE

- principem **selektivní exprese receptorů CAM** (cell **a**dhesion **m**olecules)
- **interakce CAM**: navzájem mezi buňkami (cell-cell) s ECM (cell-matrix)
- **vazba na cytoskelet** uvnitř buňky (stabilizace)
- **regulace změnou lokalizace** (membrána vs. vezikly)

4 rodiny CAM: **integriny**
 selektiny
 ICAMs (imunoglobulin-like CAMs)
 kadheriny





Integriny

- hlavní komponenta interakcí buněk s ECM
- dimery: α (18 typů) a β (8 typů) **podjednotka**

Funkce:

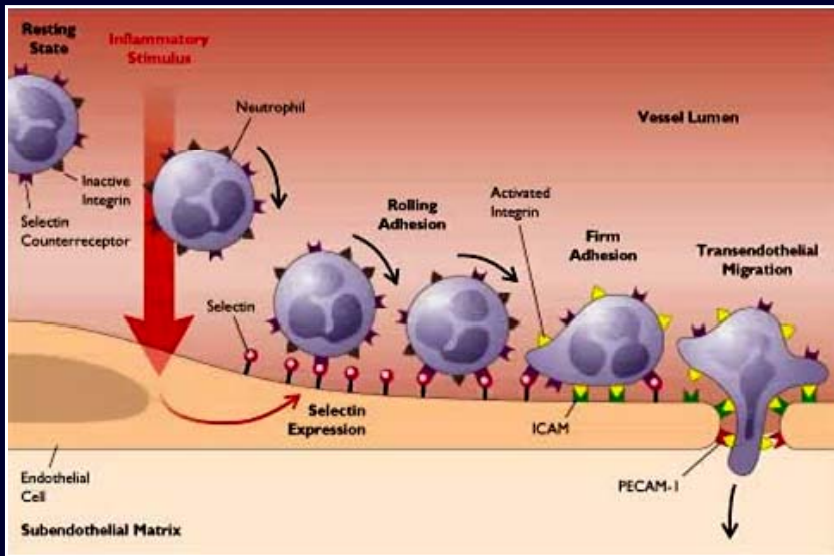
- **fokální adheze** (vazba na AF)
- **pohyb buněk v ECM** (fibroblasty, leukocyty)
- **interakce trombocytů, resp. gamet** při fertilizaci

Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD)

- dědičná (AR) porucha tvorby CD18 (podjednotka $\beta 2$ integrinu)
- nedostatečná adheze leukocytů k endotelu cév → imunodeficience, časté bakteriální infekce
- transplantace kostní dřeně



Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD)



Canine Leukocyte Adhesion Deficiency (CLAD)

- irský setr
- mutační analýza
- genetické testování



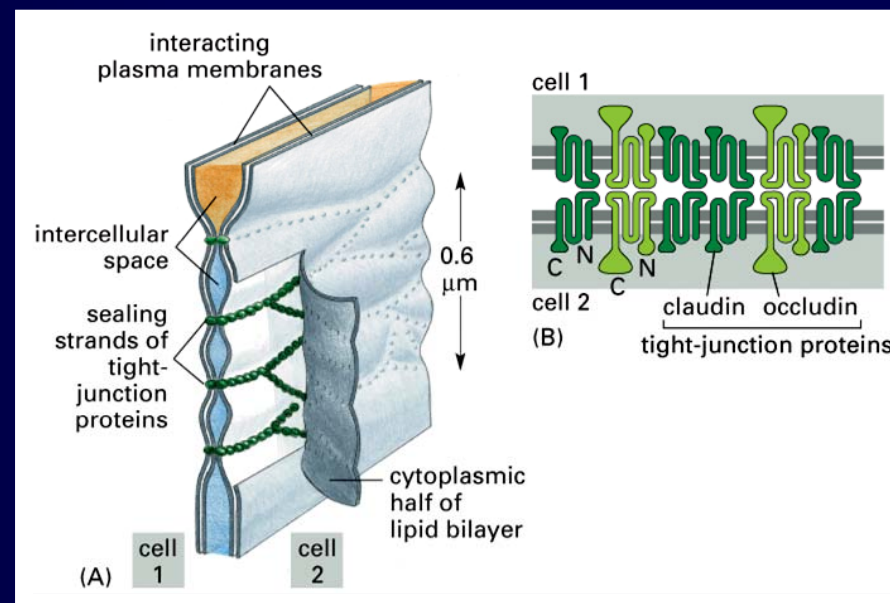
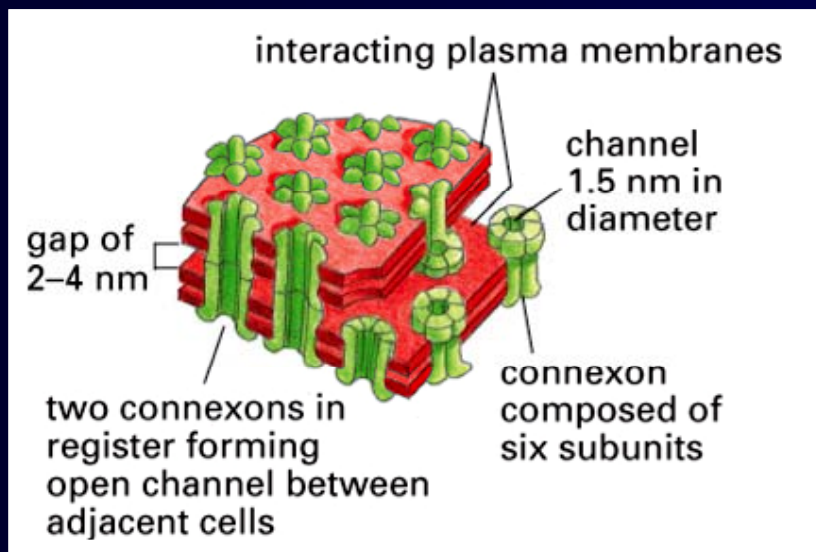
MEZIBUNĚČNÉ SPOJE A ADHEZE

Gap junctions = „kanálky“ umožňující průchod vody a malých rozpustných molekul = o průměru 1,5 nm:

konexin (6 molekul) → **konexon**

Tight junctions = těsné spojení sousedních buněk v epitelu, obvykle v blízkosti apikální strany

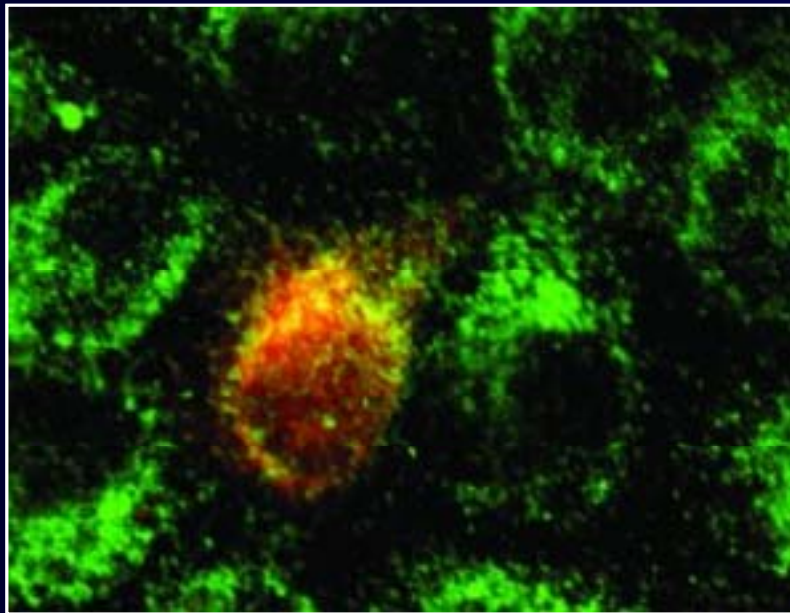
- **claudin, occludin, JAMs** (junction adhesion molecules)





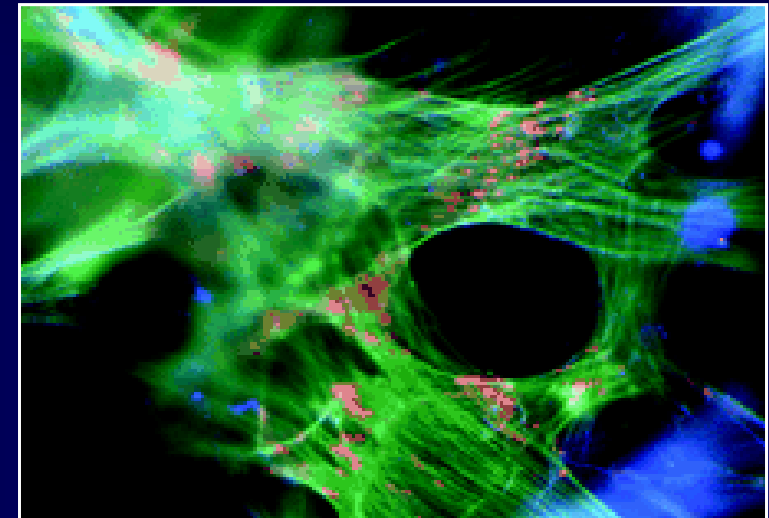
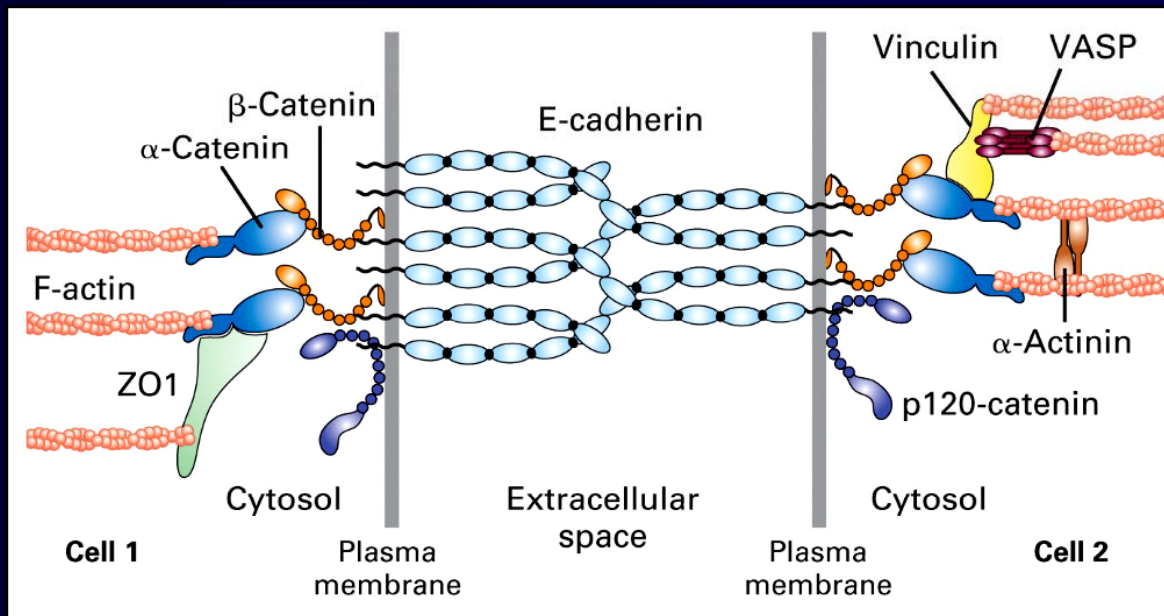
Hypomagnesemie (dědičná varianta)

- mutace v genu kódujícím claudin 16 (3q27)
- **porucha transportu hořčíku**
- hladina Mg^{2+} v séru regulována ledvinami (reabsorbce v proximálním tubulu)
- nízká hladina Mg^{2+} v krvi → křeče
- identifikováno 15 různých mutací *CLDN16*



Adherentní spoje

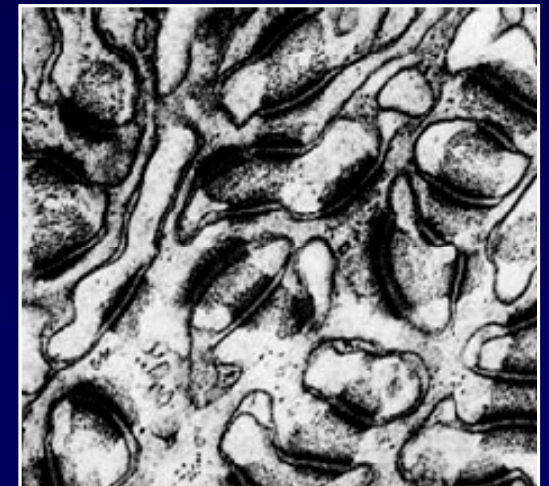
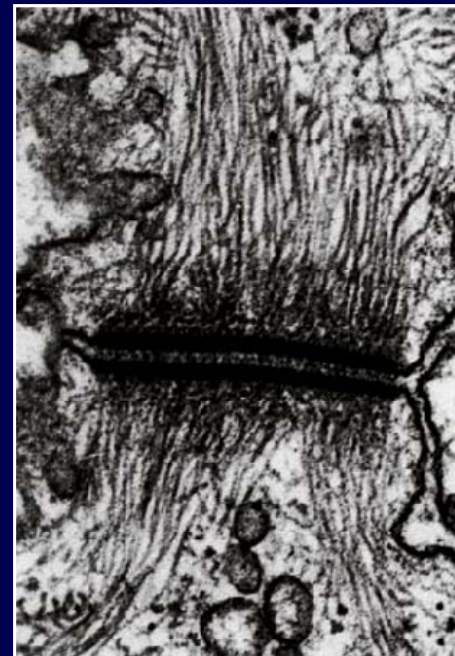
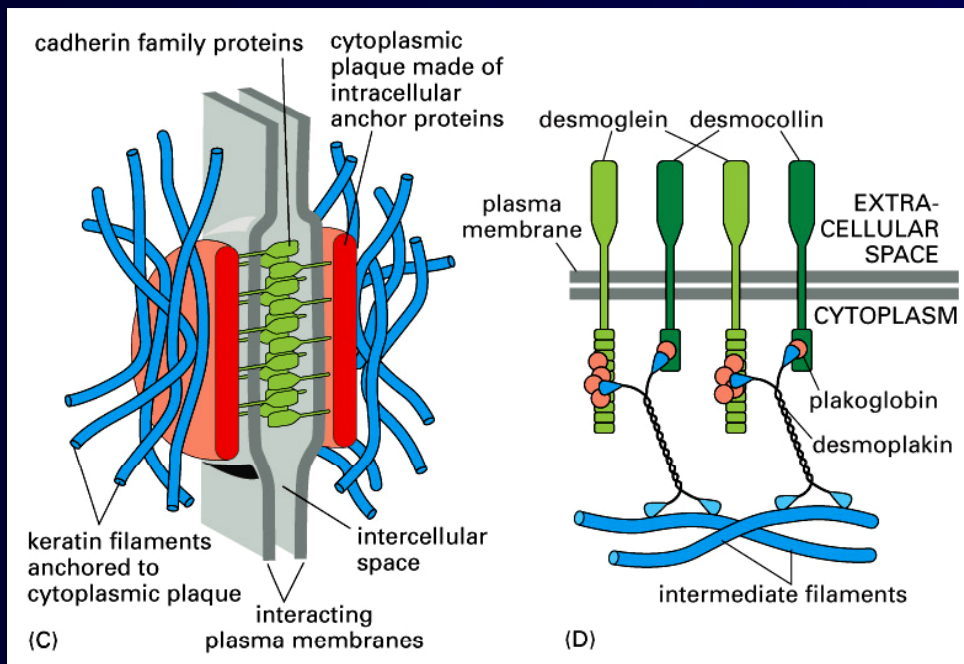
- vazba na aktinová filamenta (AF) → propojení AF v sousedních buňkách prostřednictvím CAMs
- **kadherin – α -katenin – β -katenin – AF**
- místa lokalizace: **cytoplazmatické plaky** (vnitřní strana plazmatické membrány)



aktin / β -katenin

Desmosomy

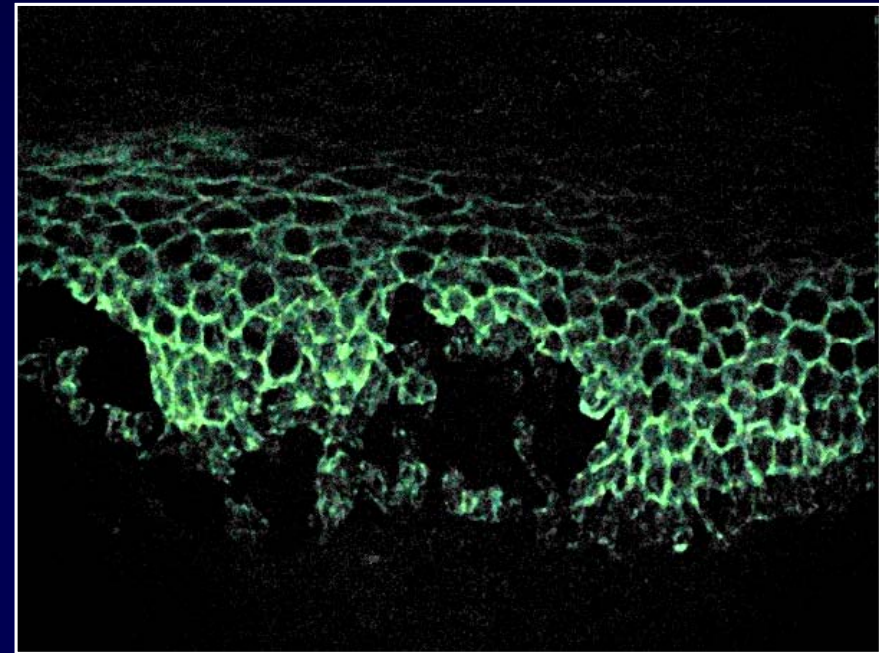
- vazba na intermediární filamenta (IF) → propojení IF v sousedních buňkách prostřednictvím CAMs
- **kadheriny (desmoglein, desmocollin) – plakoglobin, plakofilin – desmoplakin – IF**
- místa lokalizace: **cytoplazmatické plaky** (vnitřní strana plazmatické membrány)





Pemphigus vulgaris

- autoimunitní kožní choroba
- **syntéza protilátek proti desmogleinu 1 a 3**
- poruchy adhezivních vlastností epitelů → tvorba puchýřů
- léčba kortikoidy

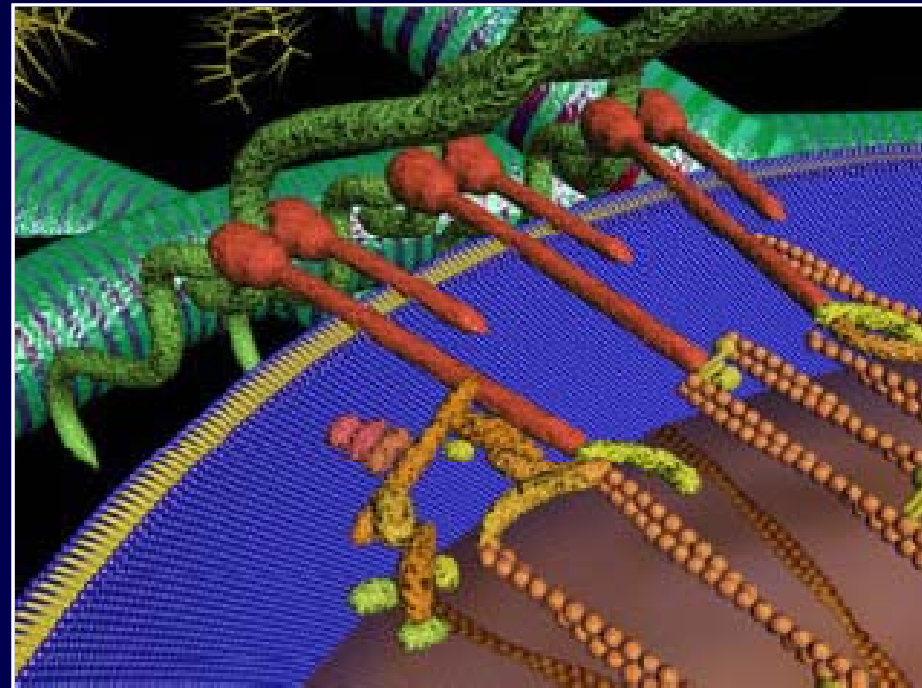
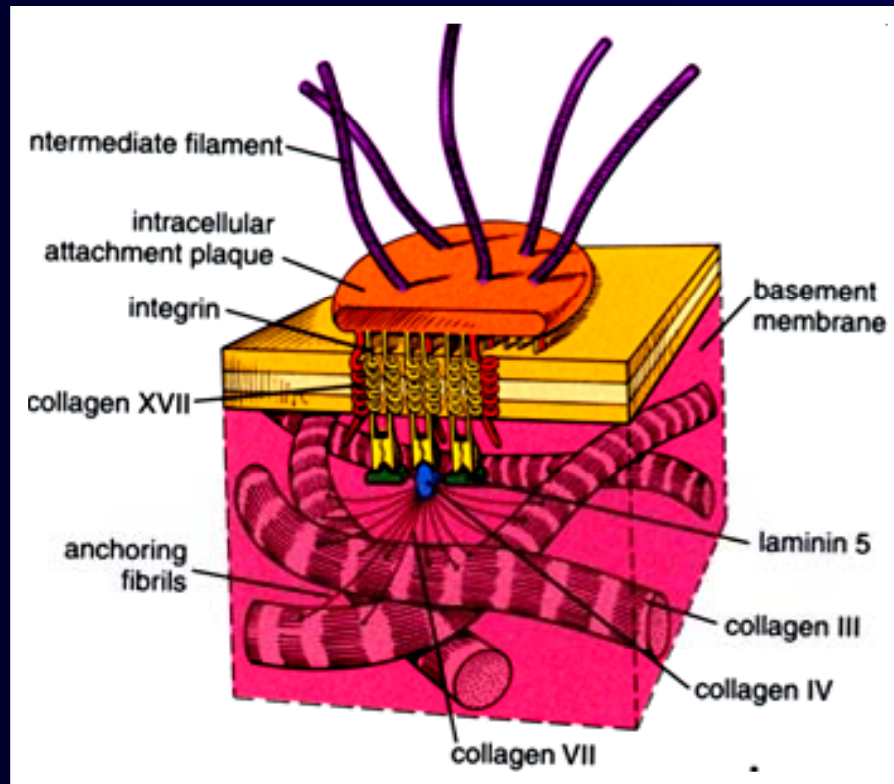


anti-IgG

INTERAKCE MEZI BUŇKAMI A SUBSTRÁTEM / ECM

Hemidesmosomy = připojení IF k ECM prostřednictvím CAMs

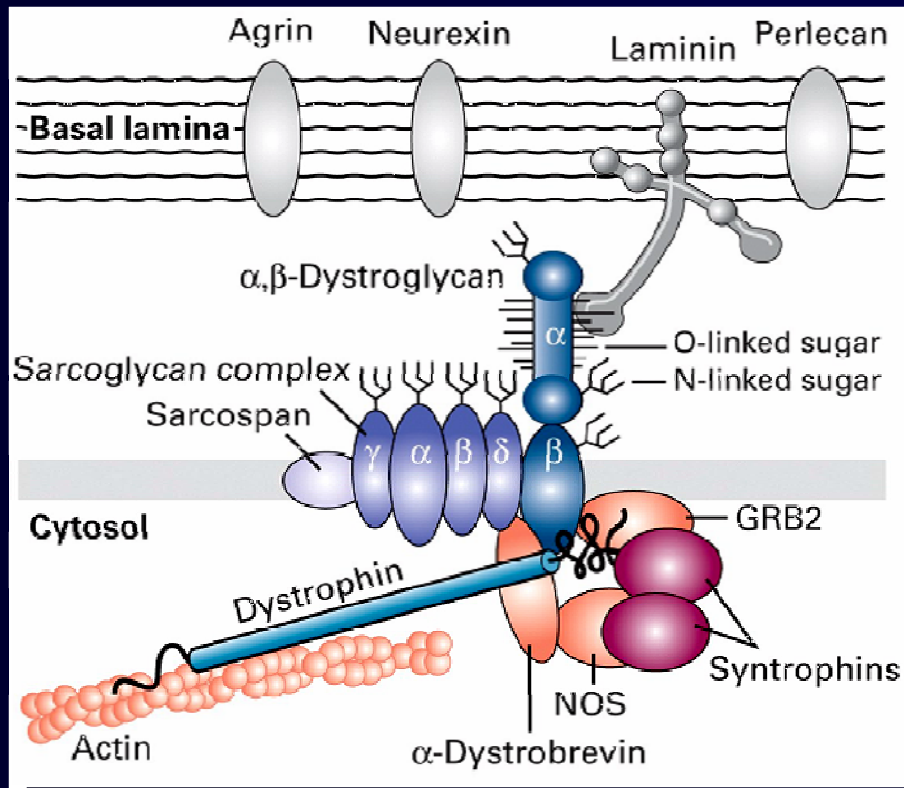
Fokální adheze = připojení AF k ECM prostřednictvím CAMs





Muskulární dystrofie

- genetické poruchy interakcí mezi aktinem a ECM
- Duchenova, Beckerova
- **mutace v genu pro dystrofin**
(interakce aktin – dystroglykan)



EXTRACELULÁRNÍ MATRIX (ECM):

medicínské aspekty - poruchy ECM

Extracelulární matrix (ECM)

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

Funkce ECM:

1. Mechanická opora
2. Specifické funkce tkání (vazba signálních molekul)
3. Regulace embryogeneze

Složení ECM

- buňky příslušné tkáni produkují složky ECM intracelulárně a vylučují je exocytózou:
 1. **kolagen** - základní strukturní komponenta (zajištění pevnosti v tahu)
 2. **elastin + fibrilin** - komponenty elastických vláken (zajištění pružnosti)
 3. **proteoglykany** - výplňová komponenta (zábrana stlačování)
 4. **hyaluronany**
 5. **adhezivní glykoproteiny**
- různé typy ECM v různých tkáních (izoformy, regulace genové exprese)

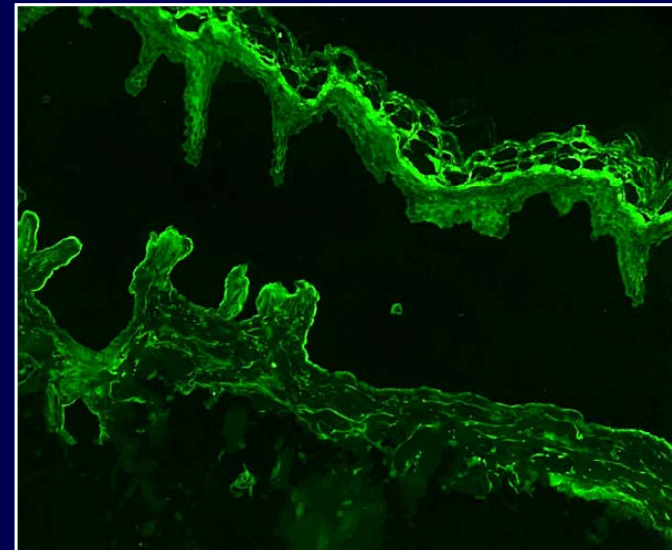


Poruchy syntézy kolagenu

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



OI



EB



MĚSÍČNÍ NÁKLADY PRO DĚTI S EB:

6 000–20 000 Kč ošetřovací materiál, 2 500 Kč speciální výživa, které nehradí pojišťovny.



Odešlete dárcovskou DMS ve tvaru **DMS DEBRA**
na telefonní číslo **87 777**

Cena DMS je 30 Kč, DebRA ČR obdrží 27 Kč.

www.debra.cz

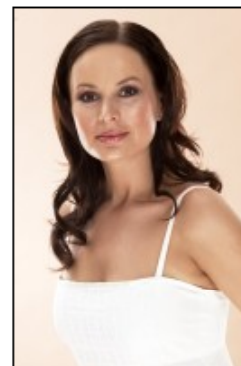


Vítejte na stránkách DebRA ČR,

občanské sdružení, které zapojuje lidi s vzácnou vrozenou vadou kůže [epidermolysis bullosa](#) do aktivního a plnohodnotného života.

Patronka DebRA ČR Jitka Čvančarová

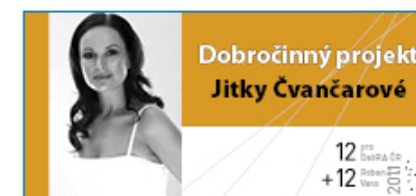
"Před lety jsem se poprvé dozvěděla o vzácném, nevyléčitelném onemocnění kůže EB a seznámila se s pacienty, kterými jsou převážně děti, trpícími touto nemocí. Vyvolalo to v mém nitru řadu emocí. Lítost, soucit, potřebu něco změnit, obdiv nad tím, s jakou nezlomnou bojovností přistupují tito lidé k životu, úctu k těm, kteří jim neúnavně a nezištně pomáhají. Mé okamžité odhodlání a potřeba jakkoli pomoci vyústilo zcela přirozeně v pevné pouto mezi mnou a DEBROU, která je obrovskou podporou a nadějí pro nemocné a jejich rodiny. Nejen, že si hned získali mé srdce, ale jsou pro mne v mnohém velmi inspirativní."



Novinky

- Nemoc motýlích křídel na TV NOVA
- Společnost HARTMANN darovala 100 000 Kč
- DebRA International Congress 2010
- Kampaň pomáhá lidem křehčím než motýl
- Přednáška o genetice při onemocnění EB

Projekt 12 plus 12



Media o projektu

- tyden.cz
- bleskove.cz
- revue.idnes.cz
- ceskydomov.cz
- blesk.cz
- super.cz
- super.cz



Poruchy elastických vláken

- **Marfanův syndrom**

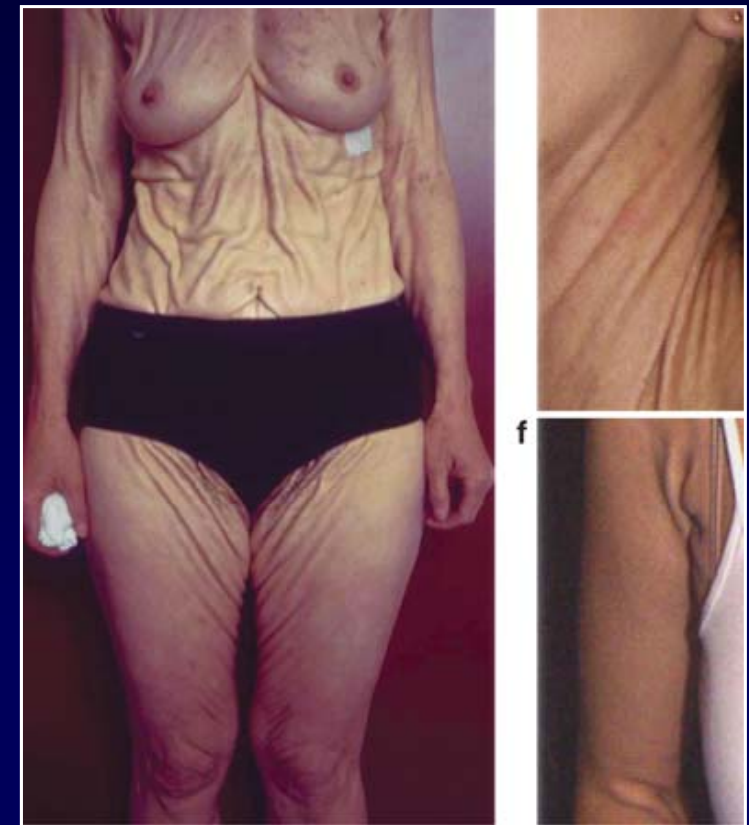
AD mutace v genu pro fibrillin 1
postižení kostry, CVS, kůže, očí

- **cutis laxa**

AD mutace v genu pro elastin
nedostatečná pružnost tkání



MS



CL



