

# BUNĚČNÉ SPOJE A ADHEZE

Většina buněk v mnohobuněčném organismu je organizována do kooperativních spojení - tkání a ty jsou sloučeny v různých kombinacích do větších funkčních jednotek - orgánů.

Buňky v tkáních jsou obvykle v kontaktu s komplexní sítí sekretovaných mimobuněčných makromolekul - mimobuněčnou matrix (ECM). Ta pomáhá držet buňky v tkáních pohromadě a vytváří prostor, kde mohou buňky migrovat a interagovat. V mnoha případech jsou buňky v tkáních udržovány na místě přímými buněčnými adhezemi.

U obratlovců jsou hlavními typy tkání nervová, svalová, krevní, lymfatická, epiteliální a spojovací.

V spojovacích tkáních je mnoho ECM a buňky jsou v ní volně rozptýleny. Matrix je bohatá na vláknité polymery, zejména kolagen a je to matrix (spíše než buňky) která nese většinu mechanického stresu. Buňky jsou napojeny na komponenty matrix a jejich vzájemné spojení není příliš důležité.

Naopak v epiteliálních tkáních jsou buňky spojeny těsně mezi sebou do vrstev (epitelů) a EM tvoří hlavně tenkou basální laminu, na které leží epiteliální vrstva. Zde jsou to zejména buňky, které nesou většinu mechanického stresu prostřednictvím silných vnitrobuněčných proteinových vláken (složek cytoskeletonu), které křížují cytoplasmu každou epiteliální buňku.

Pro přenos mechanického stresu z jedné buňky na druhou jsou vlákna přímo nebo nepřímo napojena na transmembránové proteiny v plasmatické membráně, kde se tvoří specializované spoje mezi povrchy sousedních buněk a se spodní bazální laminou.

Epiteliální vrstvy vyplňují dutiny a volné povrchy v těle a specializované spoje mezi buňkami umožňují těmto vrstvám tvořit bariéry pro pohyb vody, roztoků a buněk mezi jednotlivými tělními kompartmenty.

# Obnova střevní výstelky

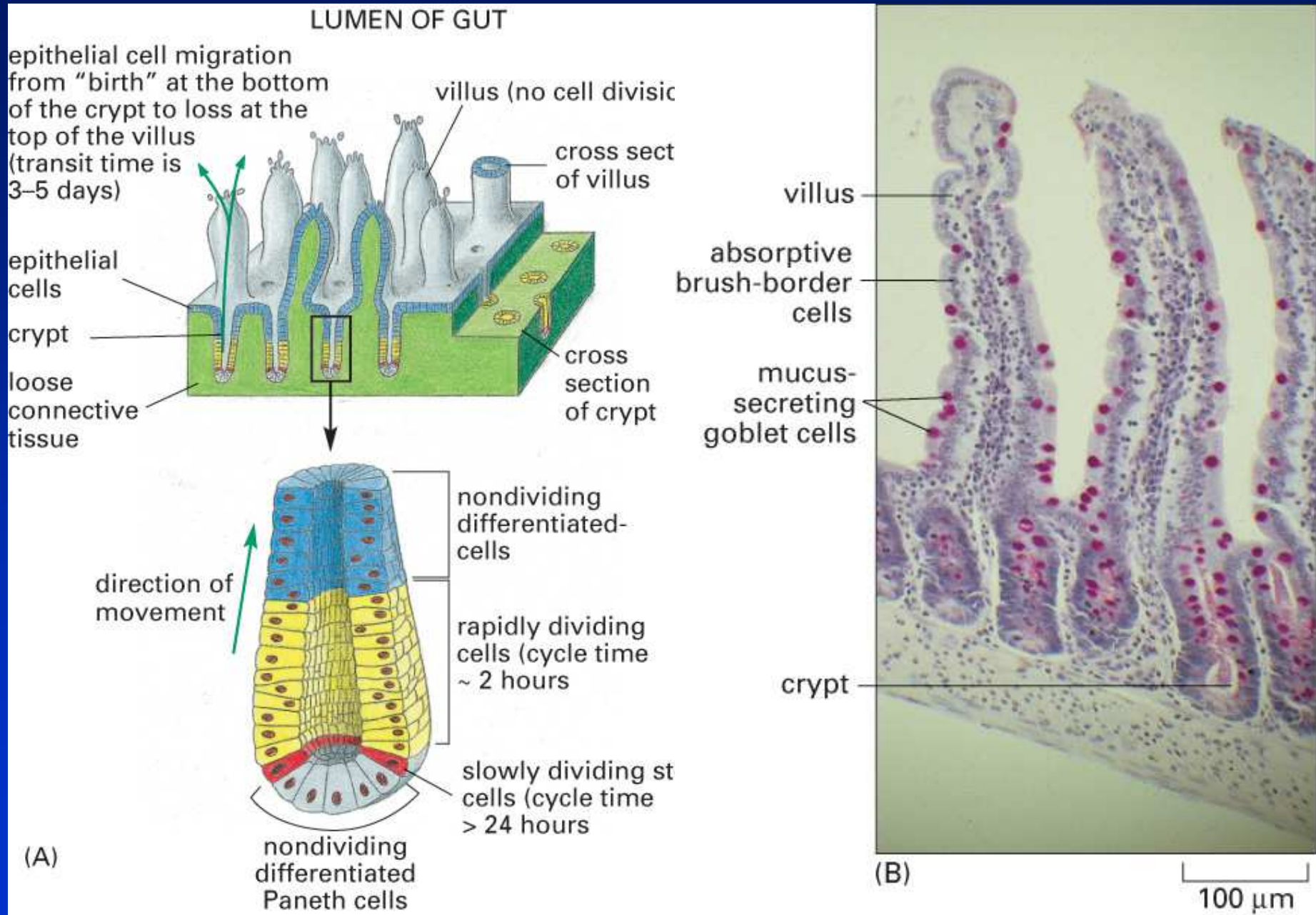


Figure 22–19 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Příčný řez částí stěny střeva

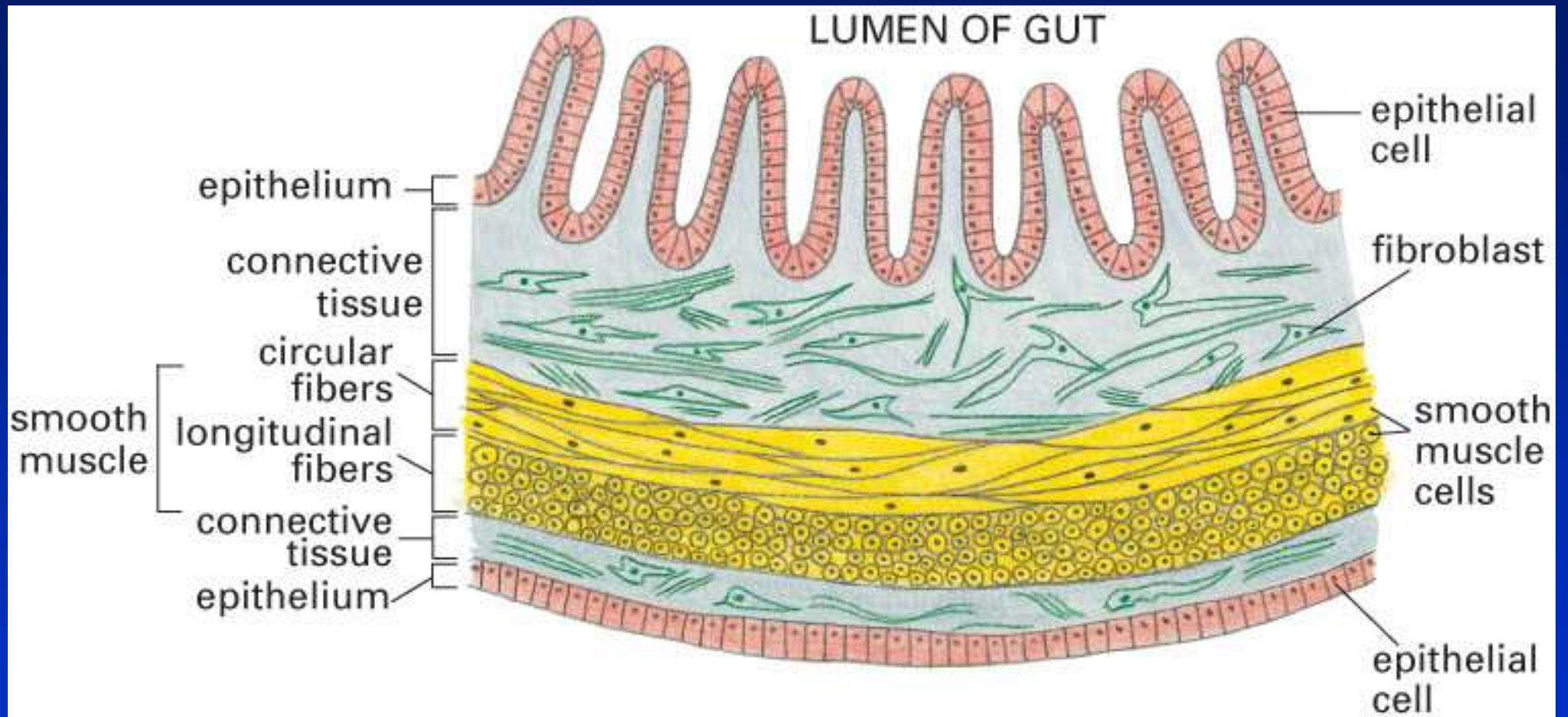


Figure 19-1. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Každá tkáň je organizovaným seskupením buněk držných pohromadě buněčnými adhezemi, ECM nebo oběma. Tkáně jsou spojeny dohromady v různých kombinacích a tvoří funkční jednotky - orgány

**Mezi buňkami navzájem a buňkami a ECM se tvoří speciální spoje (junctions) zprostředkované specifickými adhezními molekulami na buněčném povrchu.**

**ADHEZNÍ INTERAKCE** – interakce zprostředkované membránovými molekulami. Na základě strukturních vlastností rozlišujeme rodinu:

- ▶ kadherinů (asi 80 typů)
- ▶ imunoglobulinů (přes 700 typů)
- ▶ integrinů
- ▶ selektinů

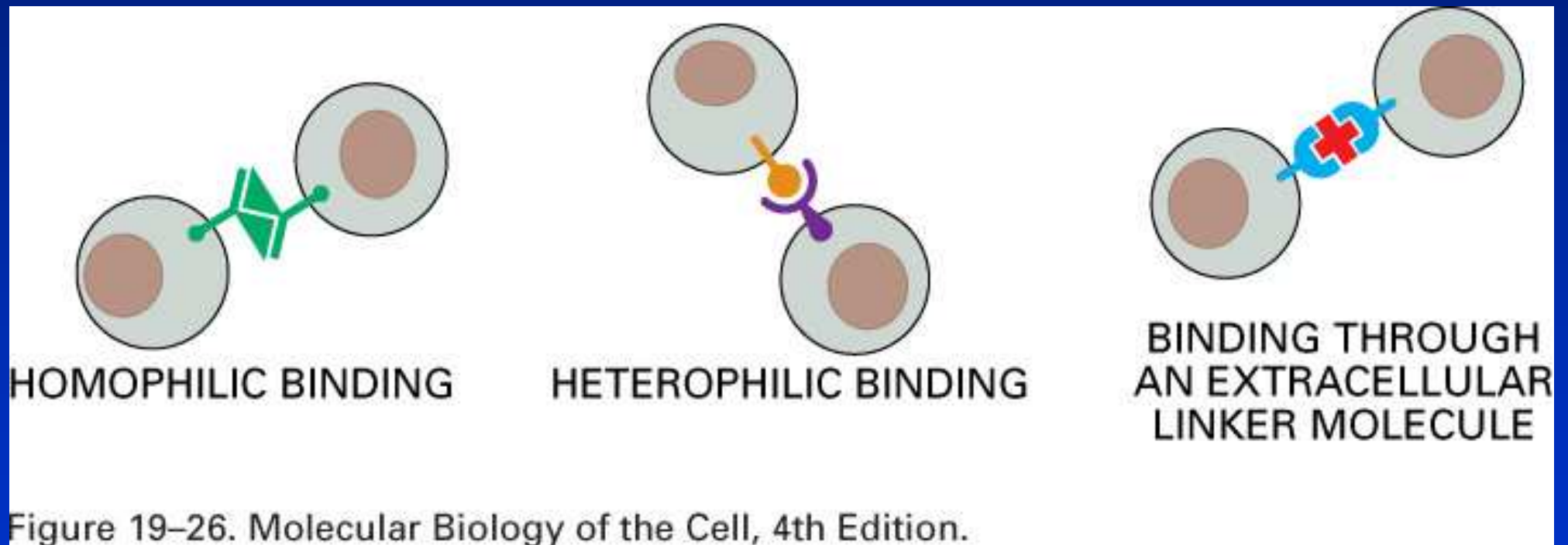
Slouží nejen ke spojení buněk navzájem a k jejich zakotvení v daném kompartmentu, ale jsou spojeny s aktivací buněk, s přenosem signálu do nitra buněk a s komplexní buněčnou odpovědí (regulace buněčného cyklu, indukce diferenciací, apoptózy, atd.).

Adhezní interakce jsou klíčové pro zajištění aktivity imunitního systému.

## Typy vazeb

- 1) homofilní (homotypická) vazba - váží se stejné molekuly sousedních b.
- 2) heterofilní (heterotypická) vazba - váží se různé molekuly
- 3) receptory na povrchu buněk jsou spojeny navzájem sekretovanou spojovací molekulou.

## Mechanizmy, jimiž mohou povrchové molekuly zprostředkovat buněčné adheze



# Úloha těsných spojení v buněčném transportu

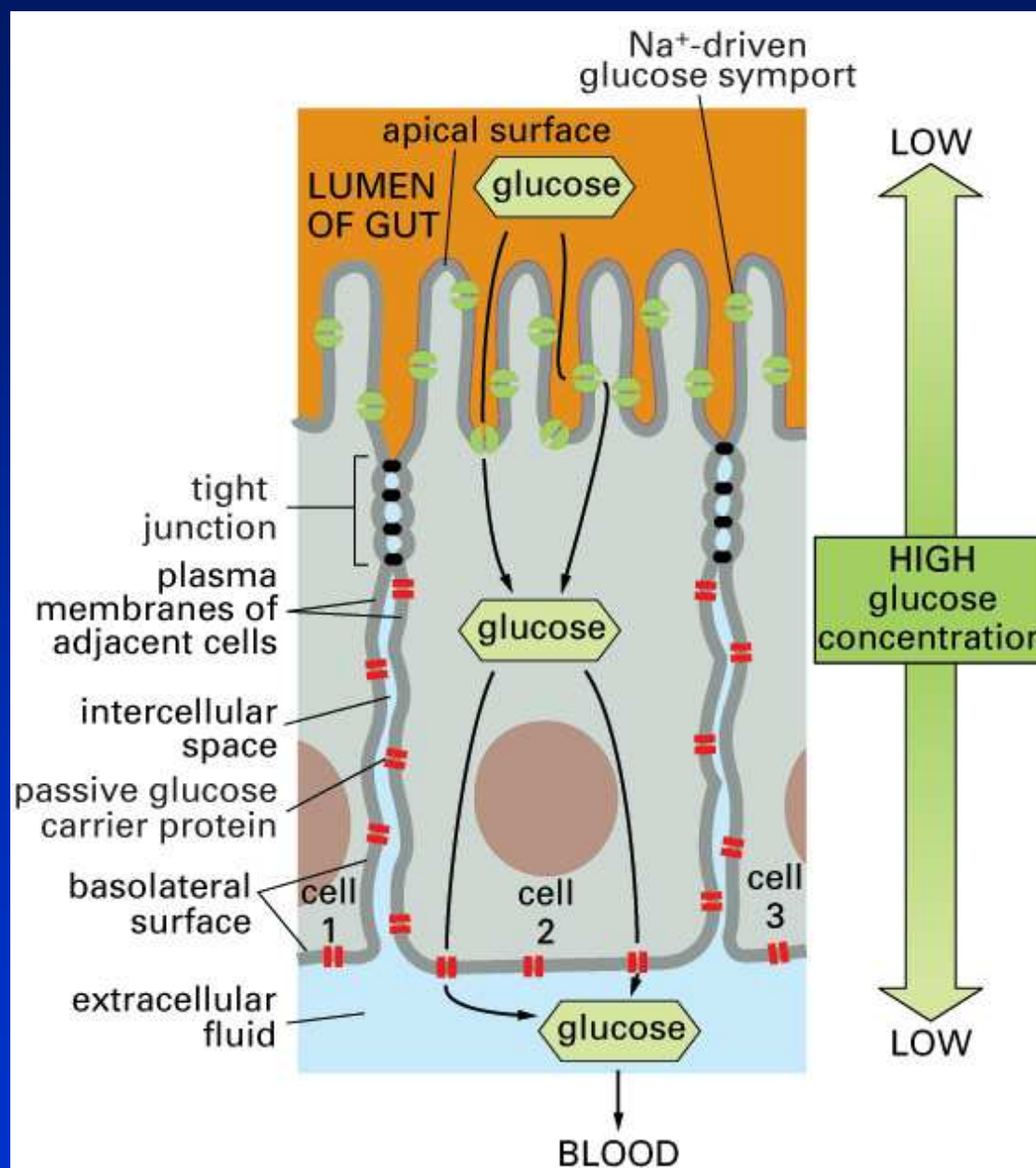


Figure 19-2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Těsná spojení slouží v epitelech jako bariéra difúze rozpuštěných látek

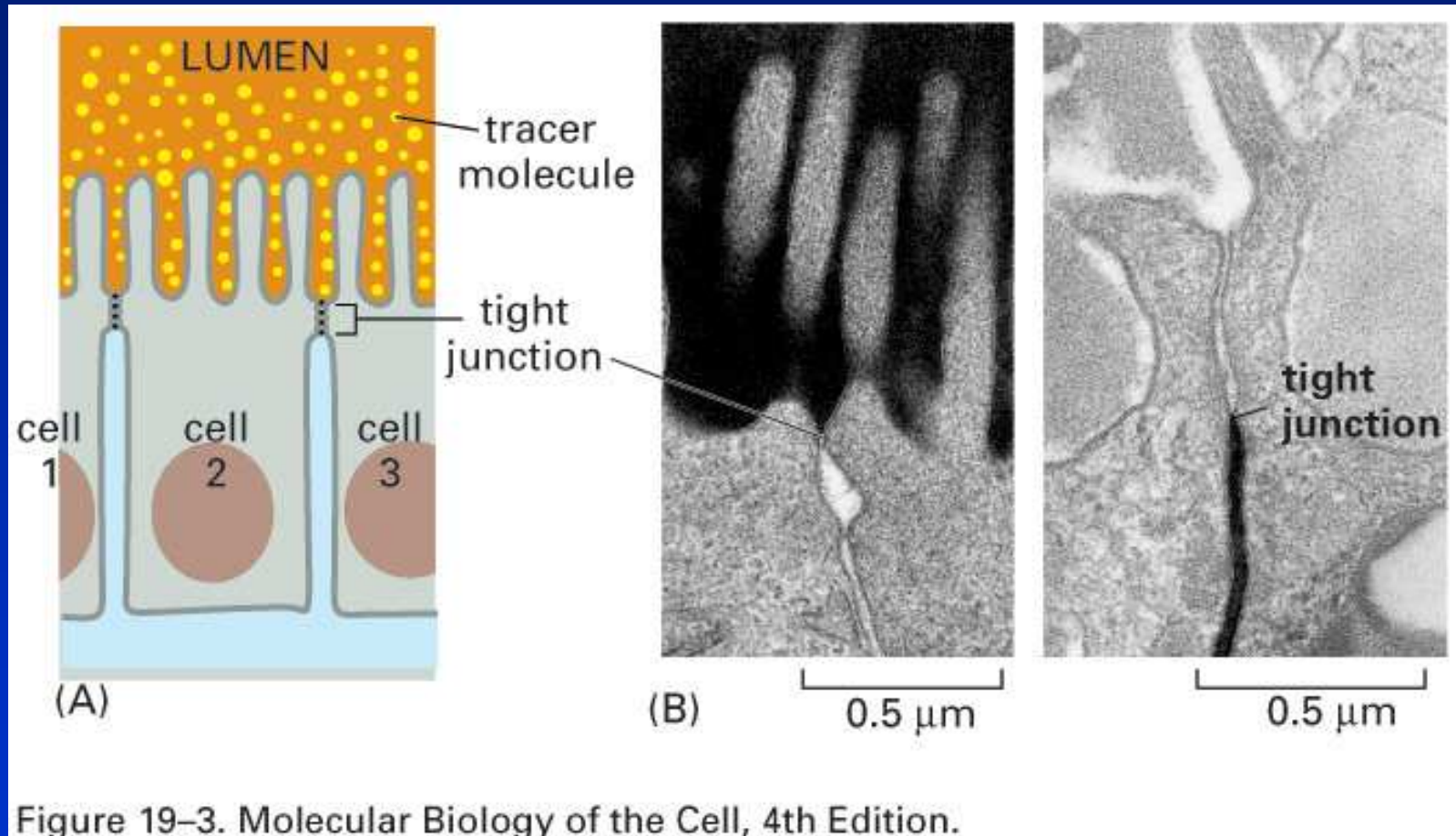


Figure 19-3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



## Ukotvující (anchoring) vazby (spoje)

VAZBA	TRANSMEMBRÁNOVÝ ADHEZNÍ PROTEIN	EXTRACELULÁRNÍ LIGAND	INTRACELULÁRNÍ CYTOSKELETÁRNÍ UPEVNĚNÍ	INTRACELULÁRNÍ KOTEVNÍ PROTEINY
<i>Buňka-Buňka</i>				
Adherentní vazba	kadherin (E-kadherin)	kadherin v sousední buňce	aktinová vlákna	$\alpha$ - a $\beta$ -kateniny, vinculin, $\alpha$ -aktinin, plakoglobin ( $\gamma$ -katenin)
Desmozóm	kadherin (desmoglein, desmocollin)	desmogleiny a desmocolliny v sousední buňce	intermediální vlákna	desmoplakiny, plakoglobin ( $\gamma$ -katenin)
<i>Buňka-Matrix</i>				
Fokální adheze	integrin	proteiny extracelulární matrix	aktinová vlákna	talin, vinculin, $\alpha$ -aktinin, filamin
Hemidesmozóm	integrin $\alpha_6\beta_4$ , BP180	proteiny extracelulární matrix	intermediální vlákna	plektin, BP230

# BUNĚČNÉ SPOJE, ADHEZE a MIMOBUNĚČNÁ MATRIX (ECM)

Buněčné spoje (junctions) - tři funkční skupiny:

- ▶ “occluding (tight) junctions” - těsné spoje (epitel střeva)  
selektivně propustná bariéra - udržují lokální koncentraci tekutin
- ▶ “anchoring junctions” - ukotvující spoje - mechanicky spojují buňky a jejich cytoskelet se sousedními buňkami nebo ECM - časté u tkání vystavených mechanickému stresu (pokožka)

místa připojení filament aktinu:

spoje buňka-buňka (např. adhezivní pásy u epitelů)

spoje buňka-matrix (fokální kontakty nebo adhezivní plaky )

místa připojení intermediárních filament:

spoje buňka-buňka (desmosomy)

spoje buňka-matrix (hemidesmosomy)

- ▶ “communicating junctions”- komunikační spoje - zprostředkovávají přenos chem. nebo el. signálů mezi interagujícími buňkami.

“gap junctions” - mezerovitá spojení

chemické synapse

Buňky uvolněné z různých tkání embrya obratlovců (jsou-li smíchány dohromady) znovu přednostně spojují s buňkami téže tkáně.

Tento tkáňově specifický rozeznávací proces u obratlovců je zprostředkován zejména rodinou na vápníkových iontech závislých adhezivních proteinů - kadherinů, které drží buňky pohromadě homofilními interakcemi mezi transmembránovými kadheriny přiléhajících buněk. Aby buňky držely pohromadě, musí být kadheriny připojeny k cytoskeletonu.

Většina živočišných buněk má také na vápníku nezávislý adhezivní systém buňka-buňka, který zahrnuje zejména členy imunoglobulinové nadrodiny, jako jsou neurální adhezivní molekuly (N-CAM, ICAM apod.)

Jednotlivé buněčné typy používají mnohonásobné molekulární mechanismy pro adhezi k jiným buněčným typům nebo EM, avšak specifita vzájemné buněčné adheze pozorovaná v embryonálním vývoji musí vyústit v integraci řady různých adhezivních systémů, z nichž některé jsou spojeny se specializovanými buněčnými spojeními a jiné ne.

## Adherentní spoje buňka-buňka - Cell Adhesion Molecules (CAM)

### ▶ závislé na Ca<sup>2+</sup>

U epitelů často tvoří souvislý adhezivní pás (zonula adherens) kolem každé interagující buňky, lokalizovaný hned pod těsnými spojeními.

Homotypické mezibuněčné interakce jsou zprostředkovány transmembránovými vazebnými glykoproteiny - kadheriny (E-k. - epitelia, N-k. - nervové buňky, P-k. - placenta a epidermis). Na cytoplazm. straně membrány se tvoří komplexy CAC (Cadherine Associated Complex) spojující přes vazebné proteiny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ - katenin, vinkulin,  $\alpha$ -aktinin) kadherinové molekuly se svazky vláken aktinu.

Desmosomy fungují jako nýty epitelia a spojovacích tkání. Uvnitř buněk fungují jako ukotvení pro intermediární filamenta - keratinová filamenta (epitely), desminová filamenta (srdeční sval)

Selektiny (P-, E-, L-) – menší rodina transmembránových glykoproteinů vážících se na cukerné zbytky na bílkovinách - přechodné vazby buněk v krevním řečišti - umožňují např. bílým krvinkám vazbu k endoteliálním b. a tak migrovat z krve do tkání v místech zánětu.

### ▶ nezávislé na Ca<sup>2+</sup>

zprostředkované členy imunoglobulinové superrodiny - zejména na leukocytech, ale i na endotelových, epiteliálních a dalších buňkách. ICAM (InterCellular Cell Adhesion Molecules)

Heterotypické mezibuněčné vazby – aktivované u endoteliálních buněk, kde se váží s integriny bílých krvinek

## Schéma ukotvujícího spoje ze dvou tříd proteinů

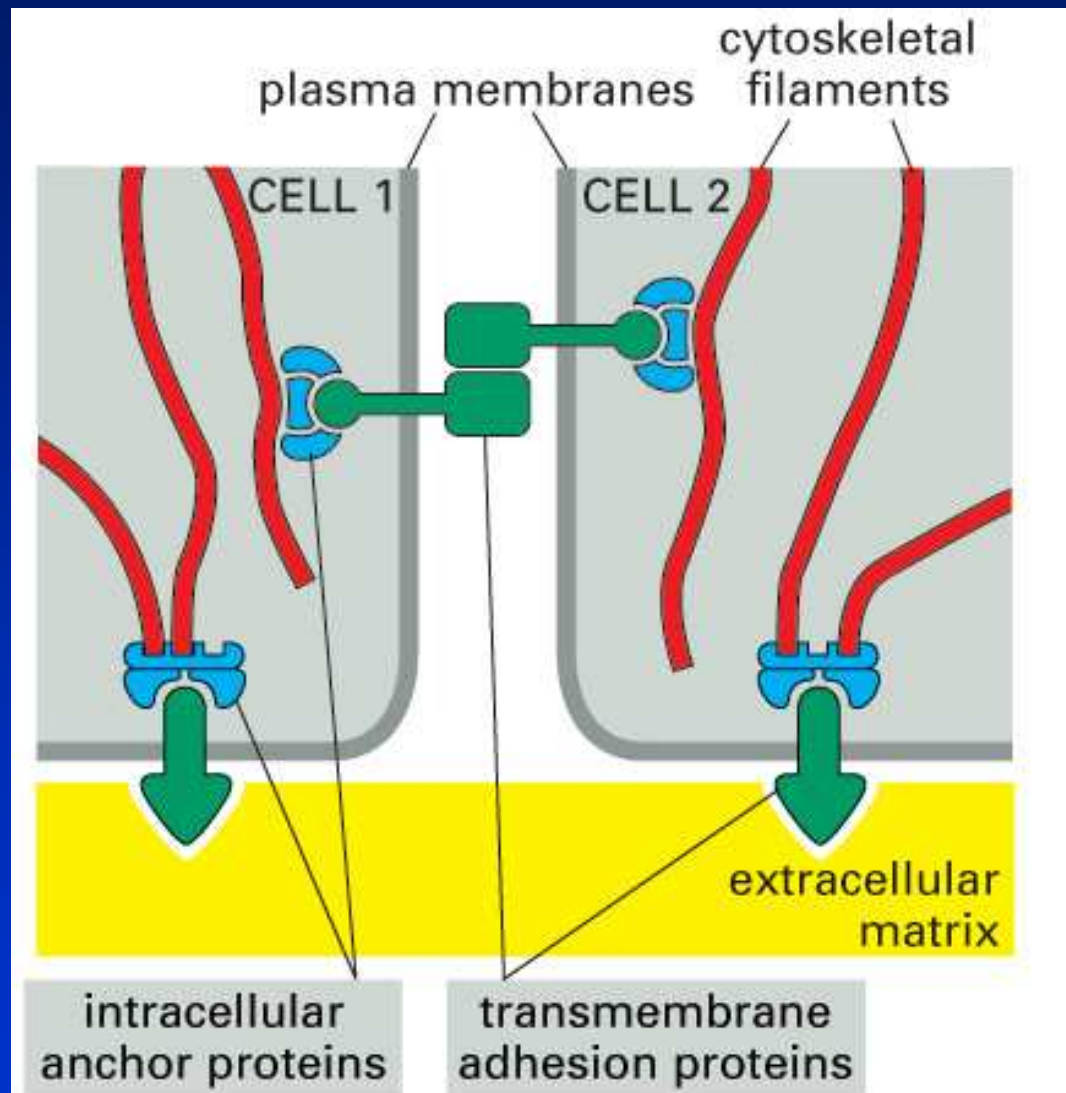


Figure 19-8. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Napojení klasických kadherinů k aktinovým filamentům

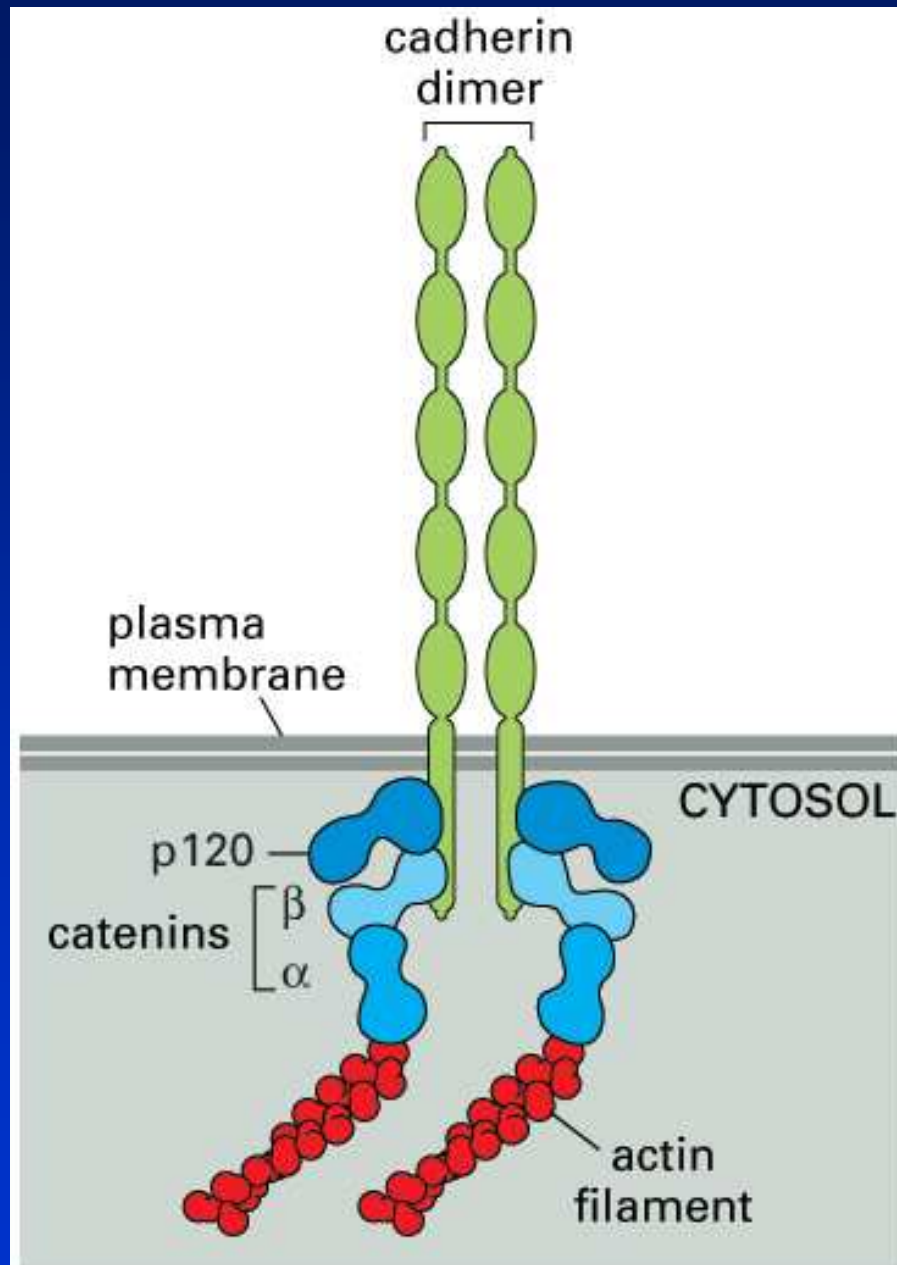


Figure 19-29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Struktura a funkce selektinů

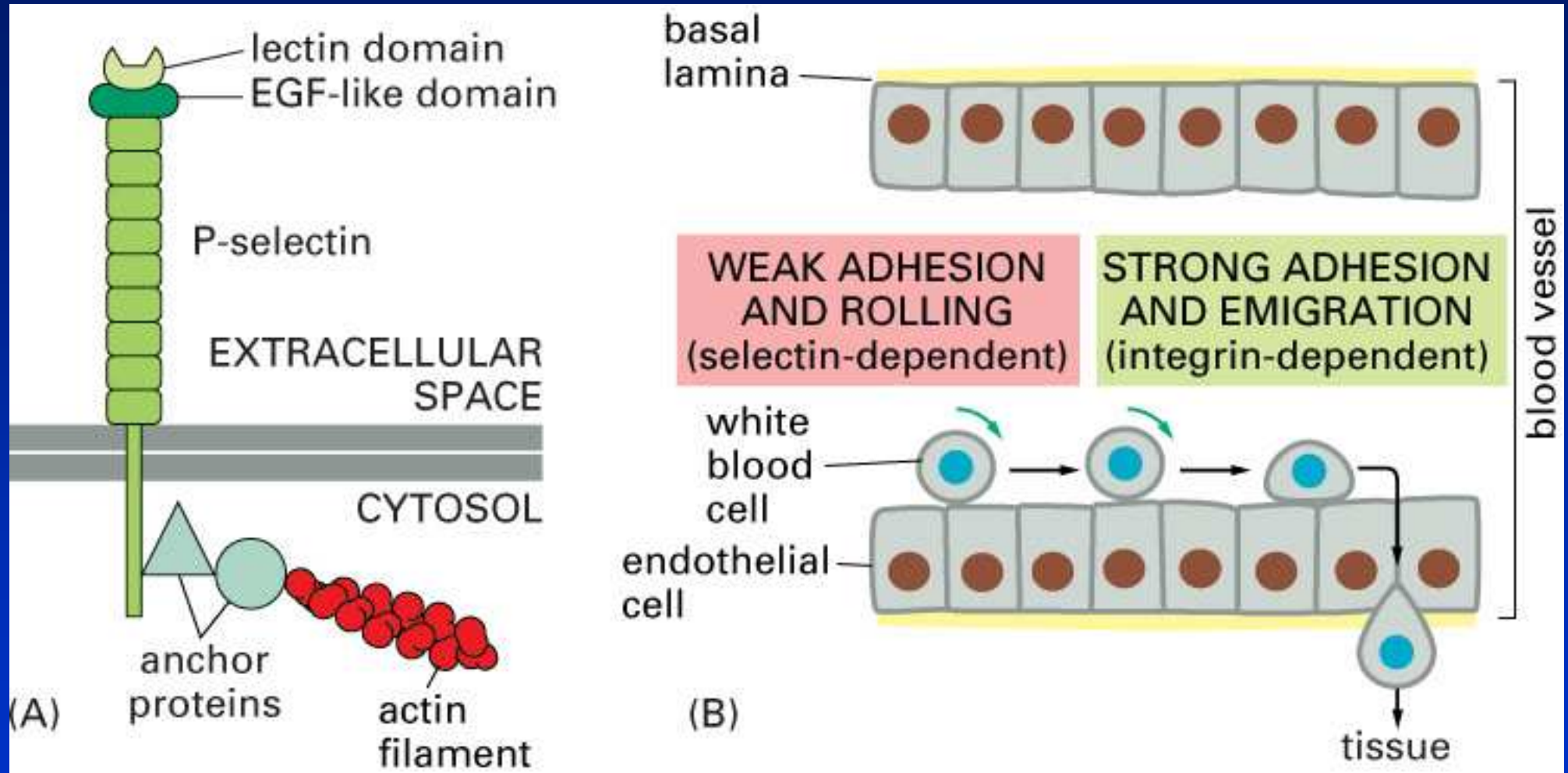


Figure 19-30. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Adherentní spoje buňka - mimobuněčná matrix

Specializované oblasti membrány - fokální kontakty nebo adhezivní plaký, kde končí svazky aktinových vláken.

▶ Integriny - transmembránové vazebné proteiny - členové velké rodiny povrchových buněčných receptorů pro matrix zprostředkovávají adhezi a slouží jako spoj mezi matrix a svazky aktinu v placích. Tvoří heterodimery (řetězce alfa a beta)

▶ Hemidesmosomy - podobné morfologicky desmosomům, ale funkčně a chemicky odlišné - spojují bazální povrch epiteliálních buněk s bazální laminou.



## INTEGRINY

Základní receptory pro vazbu k ECM se slabou afinitou k ligandu

Alfa a beta podjednotky jsou spojeny nekovalentními vazbami

Fungují také jako přenašeče signálů – po aktivaci vazbou na matrix aktivují různé vnitrobuněčné signální dráhy, mohou kooperovat s jinými receptory a regulovat buněčnou proliferaci, přežívání i diferenciaci.

S cytoskeletem, kinázami a s receptory pro růstové faktory jsou integriny propojeny adaptérovými proteiny. Nahloučené integriny tvoří tzv. imunologické rafty. Vznikají multimolekulové agregáty – místa fokální adheze

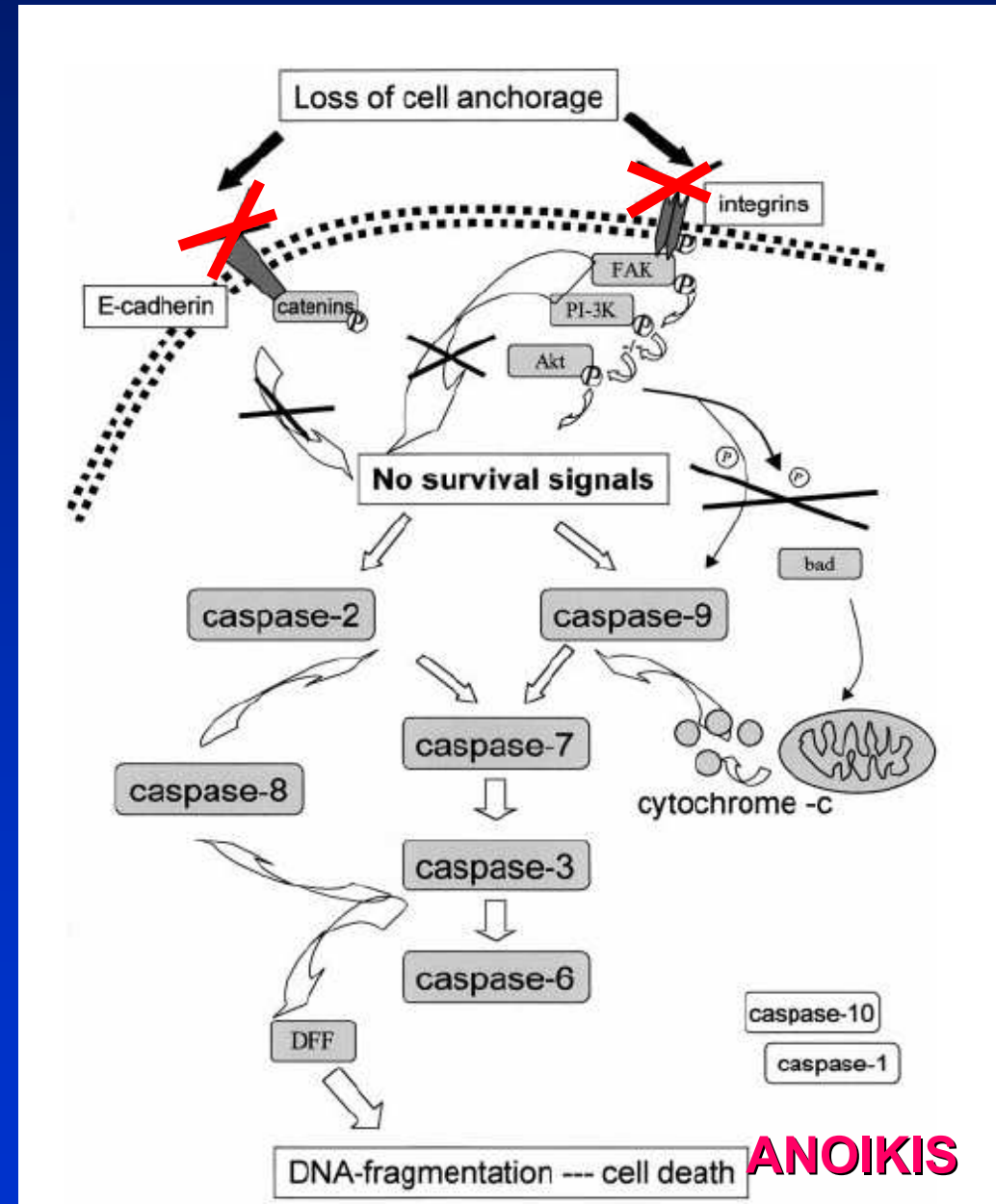
Bez zakotvení přes integriny buňky nemohou přežít. Integriny aktivují tyrosin kinázy, např. fokální adhezivní kináza (FAK -Focal Adhesion Kinase) a kinázy rodiny Src. FAK je spojena s proteiny talinem a paxilinem. Fosforylací dochází k aktivaci systému.

Po ztrátě kontaktu s ECM dochází k tzv. anoikis (detachment induced apoptosis) – apoptóze indukované uvolněním buněk s fyziologických vazeb.

# Indukce buněčné smrti-anoikis a změny adhezivních vlastností epiteliálních buněk kolonu

- **ANOIKIS** představuje typ buněčné smrti, kterou umírají epiteliální buňky pokud dojde k narušení jejich kontaktu s extracelulární matrix.
- Vznik rezistence buněk k anoikis představuje jeden z kritických momentů v karcinogenezi tlustého střeva –podpora invazivity

Pro indukci anoikis v podmínkách *in vitro* je používán model neadherentní kultivace buněk



# Struktura subjednotek integrinového receptoru (buněčný povrch-matrix)

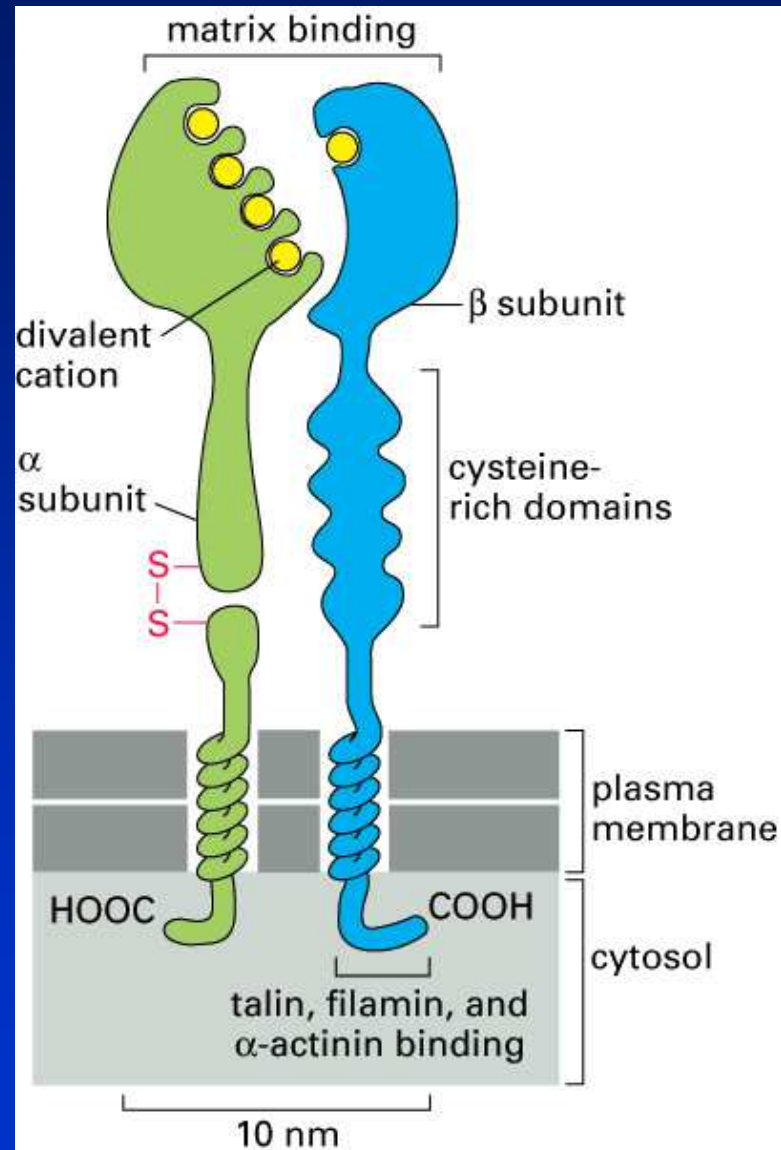
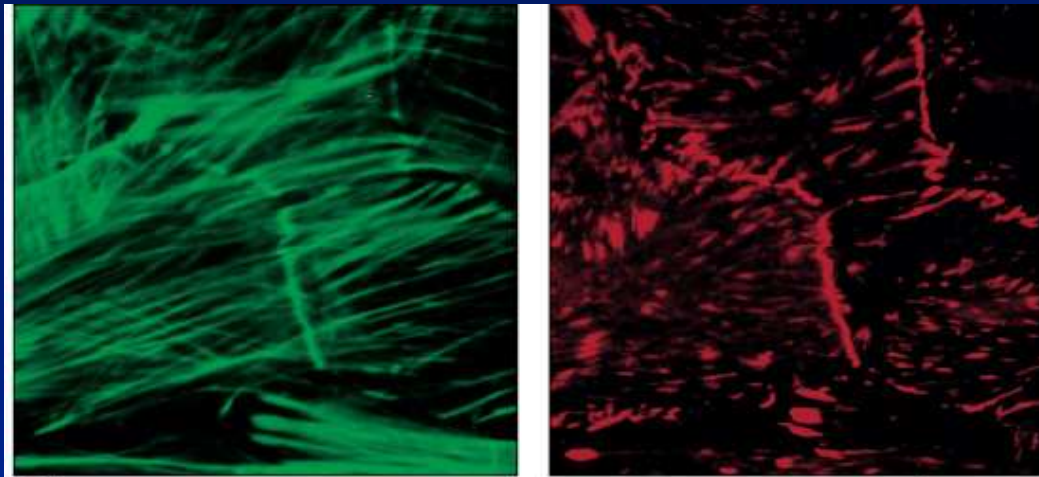


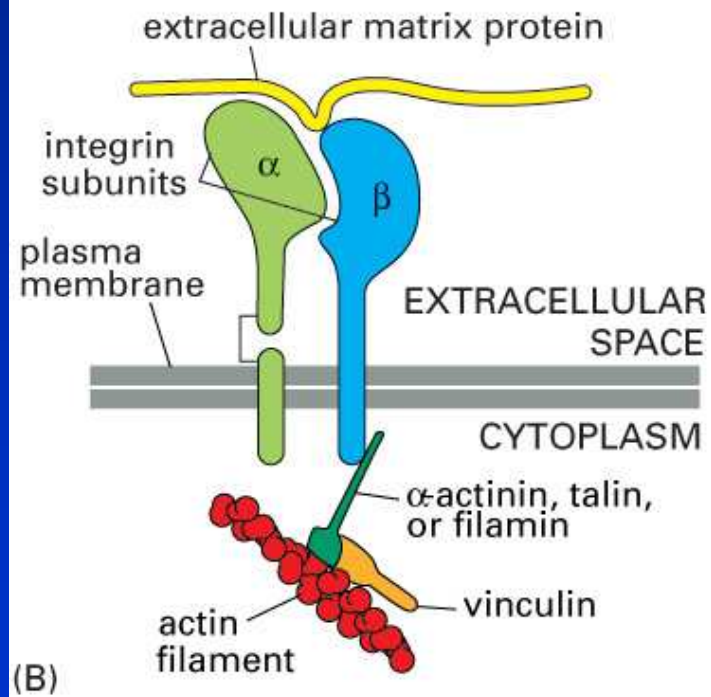
Figure 19-64. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Fokální adheze



(A)

10 μm



(B)

Figure 19–12. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Regulace mimobuněčné vazebné aktivity integrinu zevnitř buňky

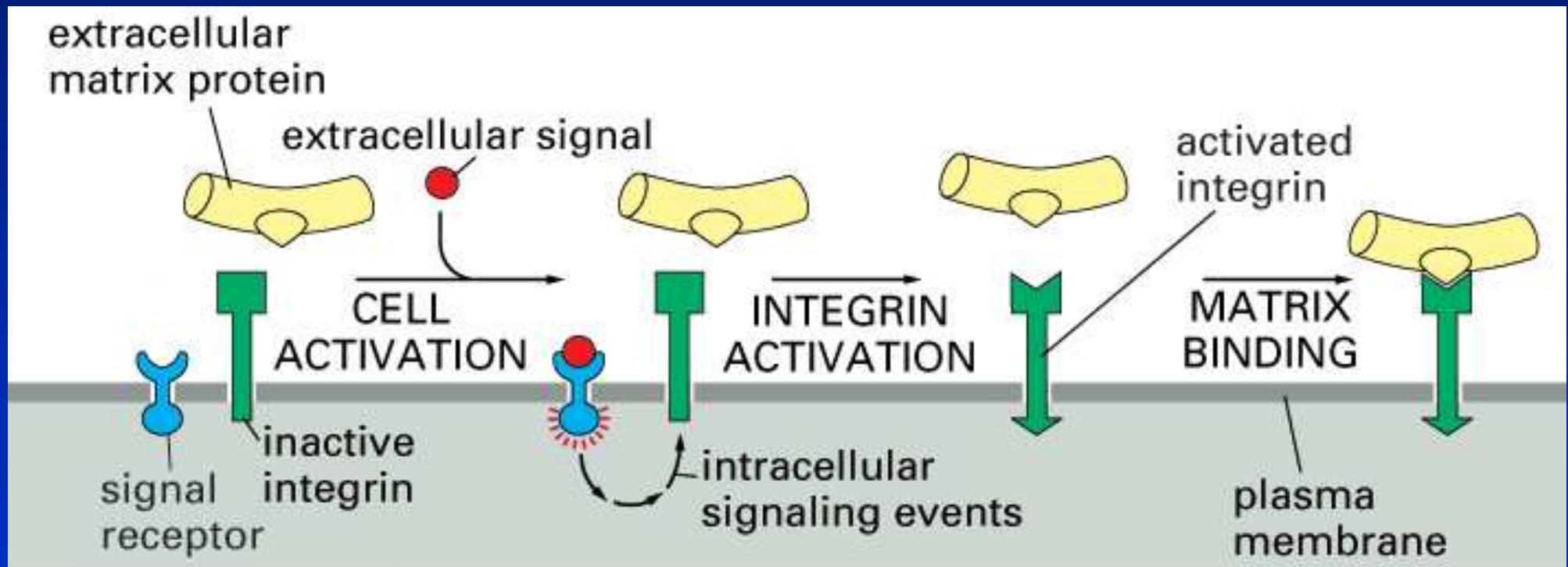


Figure 19-65. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Desmosomy a hemidesmosomy

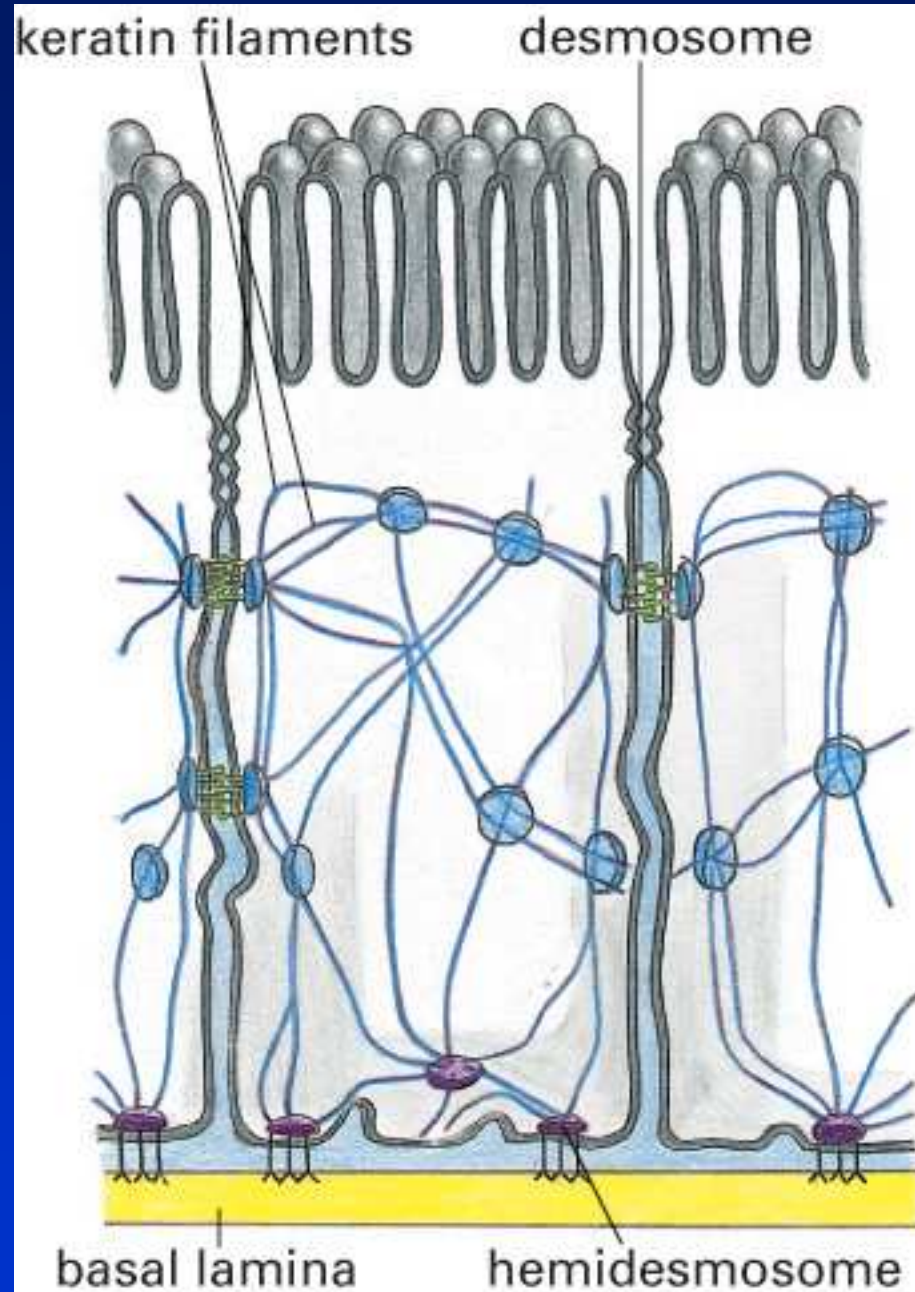
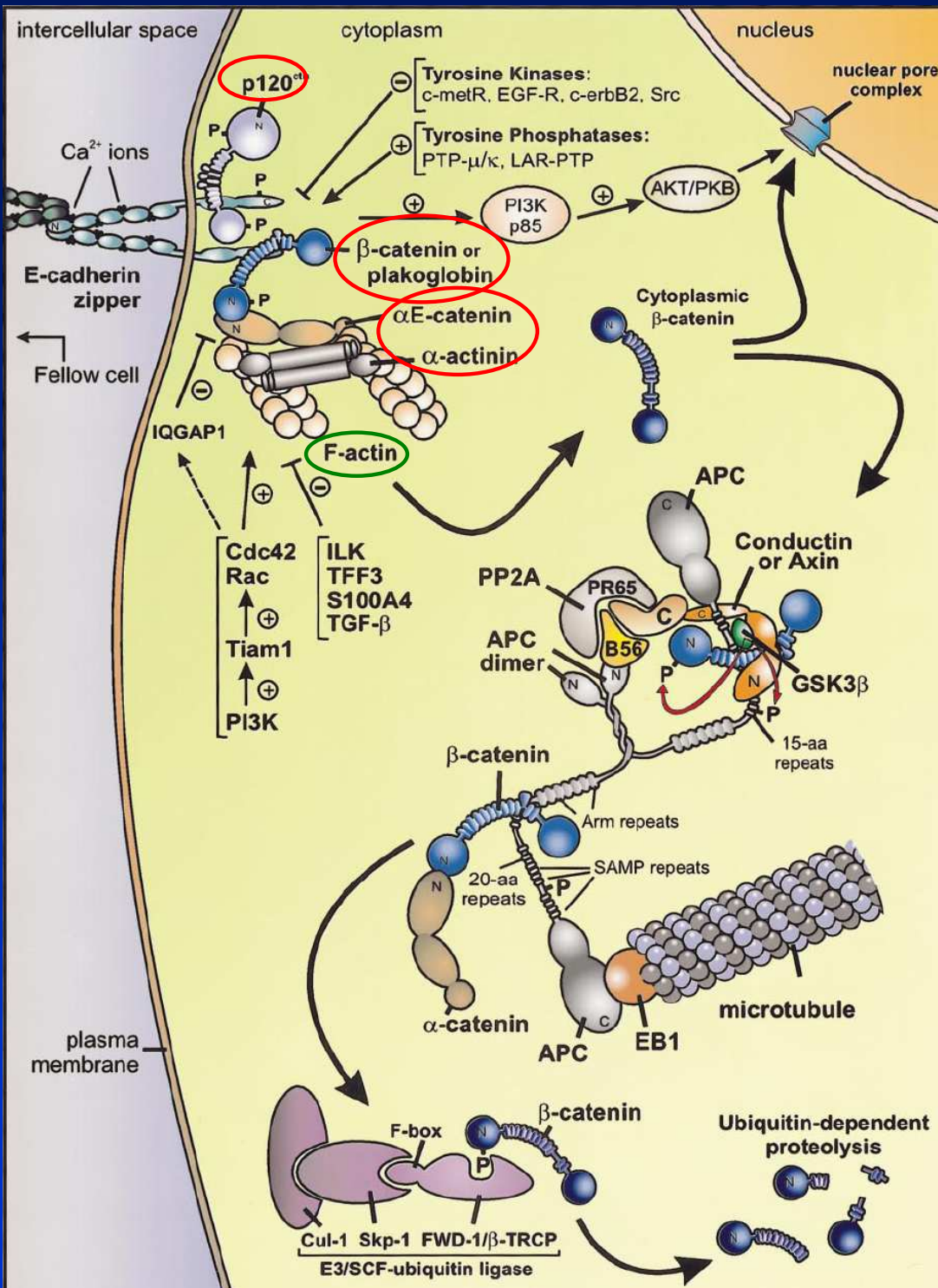


Figure 19-13. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



## Regulace komplexu E-kadherin/katenin a mechanismy degradace beta-kateninu u epiteliálních buněk

Ca<sup>2+</sup> stabilizuje dimery E-kadherinu, ten se váže cytopl. doménou na další proteiny. Beta-katenin je normálně degradován nebo se může akumulovat při dysregulaci tohoto procesu nebo defektivním E-kadherinu. Pak je translokován do jádra, kde se váže na LEF/TCF transkripční faktor aktivující transkripci řady genů. Katenin se rovněž může vázat na APC protein, který spolu s dalšími proteiny v makromolekulárním komplexu zajišťuje na proteasomu závislou degradaci.

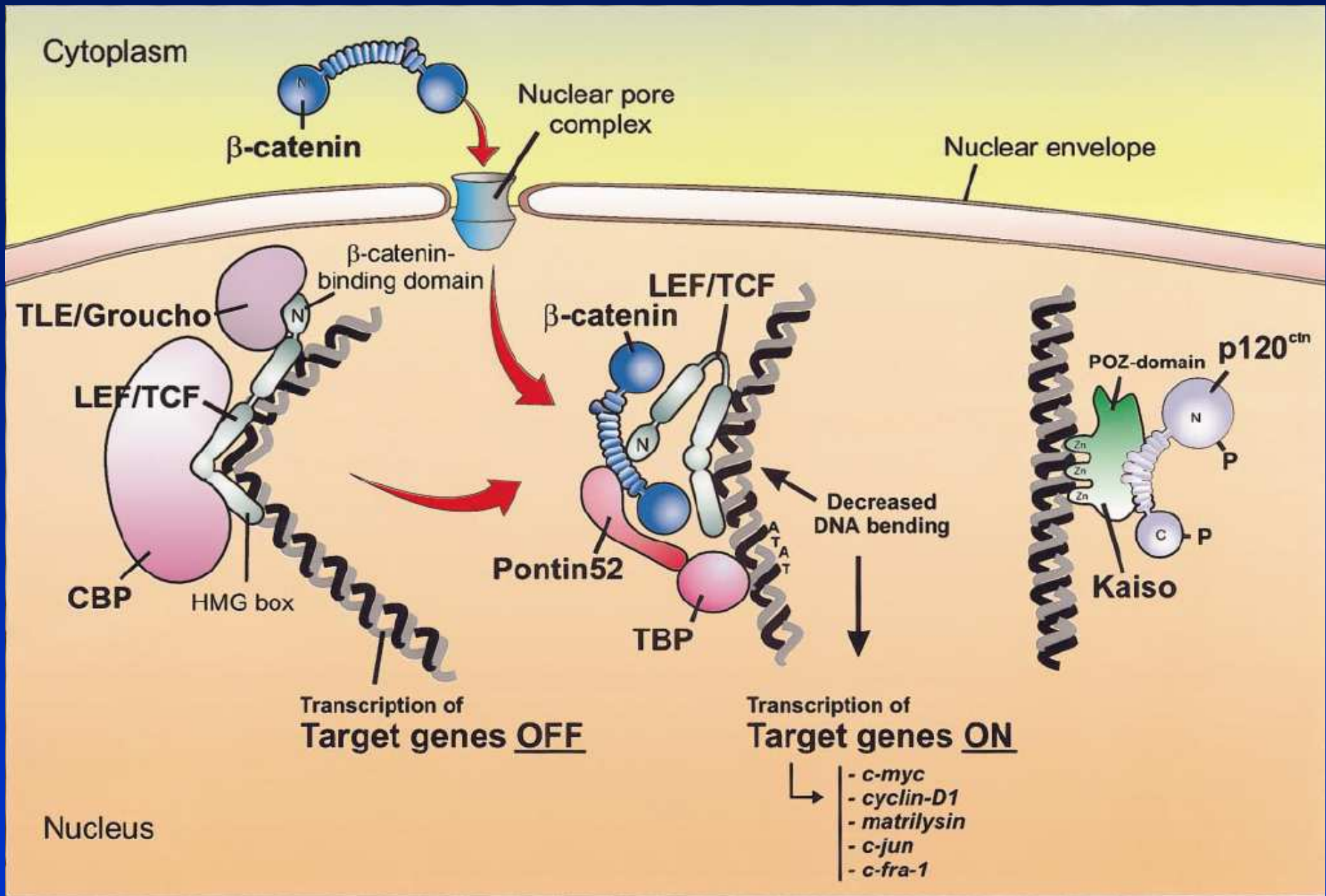




FIG. 2. Schematic overview of the nuclear protein complexes containing  $\beta$ -catenin or p120<sup>cas</sup>. The  $\beta$ -catenin protein lacks a nuclear localization signal, but may be translocated into the nucleus through binding of its *Armadillo* repeats with the nuclear pore complex [103]. The transcription of particular target genes is activated when nuclear  $\beta$ -catenin interacts with the amino-terminal domain of LEF/TCF transcription factors. The high mobility group (HMG) domain of LEF/Tcf proteins binds specific responsive sequences, resulting in changed DNA-bending [52]. Pontin52 may act as a molecular bridge between  $\beta$ -catenin, by itself in complex with LEF/TCF, and the TATA box binding protein TBP [104]. Several target genes were already described: *siamois*, *Xnr3* and *Twin* in *Xenopus*, *Ubx* in *Drosophila*, and *c-myc*, *cyclin-D1*, *matrilysin*, *c-jun* and *c-fra-1* in mammals. Transcription of these target genes is blocked upon interaction of the transcriptional repressors TLE/Groucho and CREB-binding protein (CBP) with the LEF/TCF transcription factors [105–107]. In *Drosophila*, dCBP was reported to downregulate the Armadillo–dTCF complex by acetylation of a conserved lysine residue in the amino-terminal  $\beta$ -catenin-binding region of dTCF [105]. The interaction of p120<sup>cas</sup> with the Zinc finger transcription factor Kaiso was recently described [16]. Transcriptional regulation of particular target genes by the latter protein complex is unreported to date.

FIG. 1. Schematic overview of the regulation of the E-cadherin/catenin complex and the mechanism of degradation of  $\beta$ -catenin protein in epithelial cells. In the intercellular space, Ca<sup>2+</sup>-stabilized E-cadherin dimers (light green) interact via their first extracellular domain with the E-cadherin dimers of a neighboring cell (dark green). Beta-catenin (Armadillo in *Drosophila*), plakoglobin and p120<sup>cas</sup> are cytoplasmic proteins with *armadillo* repeats, which bind to the carboxy-terminal cytoplasmic domain of E-cadherin. The amino-terminal domain of  $\beta$ -catenin interacts with  $\alpha$ -catenin, linking the E-cadherin/catenin complex to the actin cytoskeleton, either directly through interaction of  $\alpha$ E-catenin with F-actin microfilaments, or indirectly through binding of  $\alpha$ E-catenin with  $\alpha$ -actinin. Free cytoplasmic  $\beta$ -catenin is normally degraded but can accumulate provided that this degradation process is disregulated and that the cytoplasmic E-cadherin tails are saturated or defective. In the latter case,  $\beta$ -catenin may translocate to the nucleus where it forms a transcriptional complex with the LEF/TCF transcription factors (see Fig. 2). Cytoplasmic but not E-cadherin-associated  $\beta$ -catenin can also bind to the adenomatous polyposis coli (APC) protein, both to 20-aa and 15-aa repeats. APC can homodimerize via its amino-terminal domain whereas its carboxy-terminal domain can bind to microtubules, probably via the EB1 protein [101]. In addition, APC contains SAMP repeats to which the sophisticated adaptor protein conductin binds [66]. Axin is a homologue of conductin. This macromolecular complex contains also the serine/threonine kinase GSK-3 $\beta$  and the protein phosphatase PP2A. GSK-3 $\beta$  phosphorylates both  $\beta$ -catenin and APC, triggering in this way  $\beta$ -catenin interaction with the F-box protein FWD-1 or  $\beta$ -TRCP [102]. The latter is a component of an E3/SCF ubiquitin ligase complex, which comprises also Cul-1 and Skp-1 subunits. This interaction eventually results in proteasome-dependent degradation of the  $\beta$ -catenin protein. Various other proteins with either enhancing or downregulating effects on the E-cadherin/catenin complex are also depicted and further discussed in the text. C, carboxy-terminal domain; N, amino-terminal domain; P, phosphorylation on serine, threonine or tyrosine residues. Modified after [57].

# GAP JUNCTIONS –MEZEROVITÁ SPOJENÍ

## gap junctional intercellular communication (GJIC)

mezibuněčné spoje z transmembránových proteinů - konexinů (asi 30 typů)

Krátký poločas života (několik hodin), rychlá biosyntéza a degradace, reakce na změny fyziologických podmínek

6 molekul konexinů tvoří konexon.

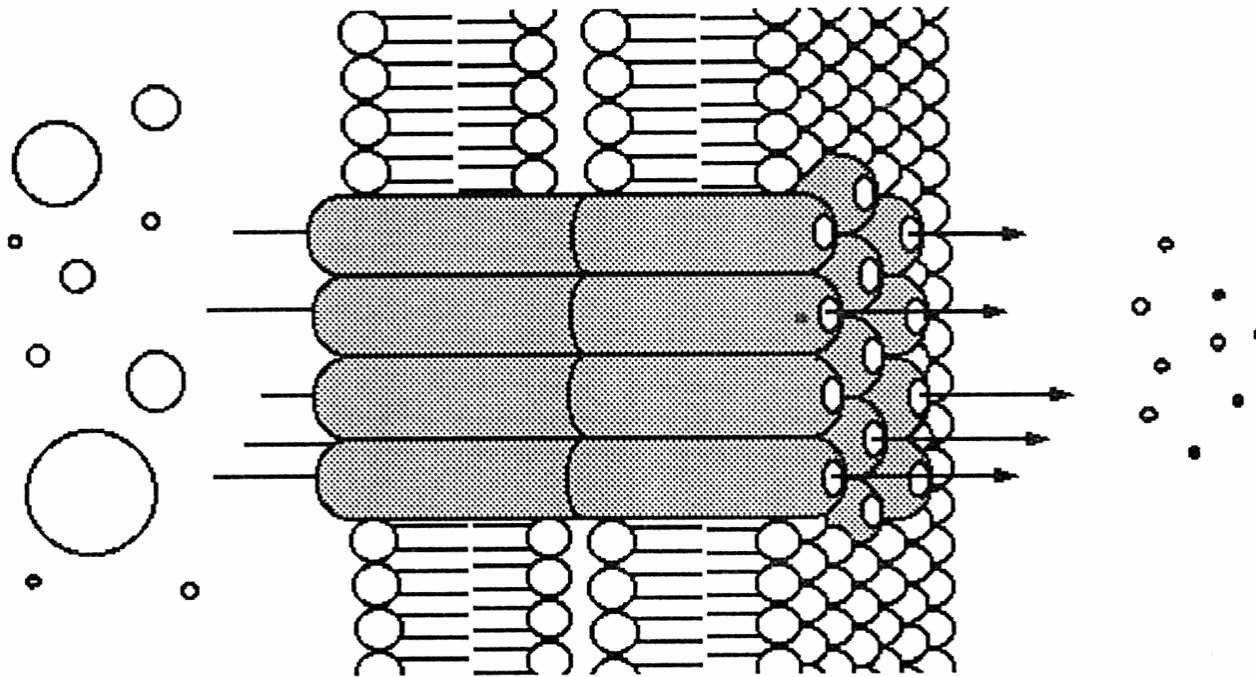
Konexony sousedních buněk se spojují v kanálek překlenující mezeru (gap)

2-4nm propustnou jen pro malé molekuly. Permeabilita je regulována.

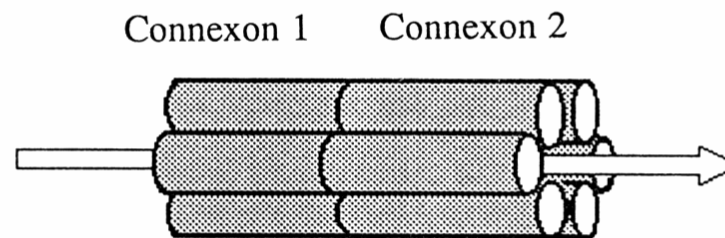
Otevírání a zavírání závislé např. na pH, konc. divalentních iontů.

Aby se tvořily GJ musí buňky adherovat k podkladu a být spojeny kadheriny.

## Model gap junctions

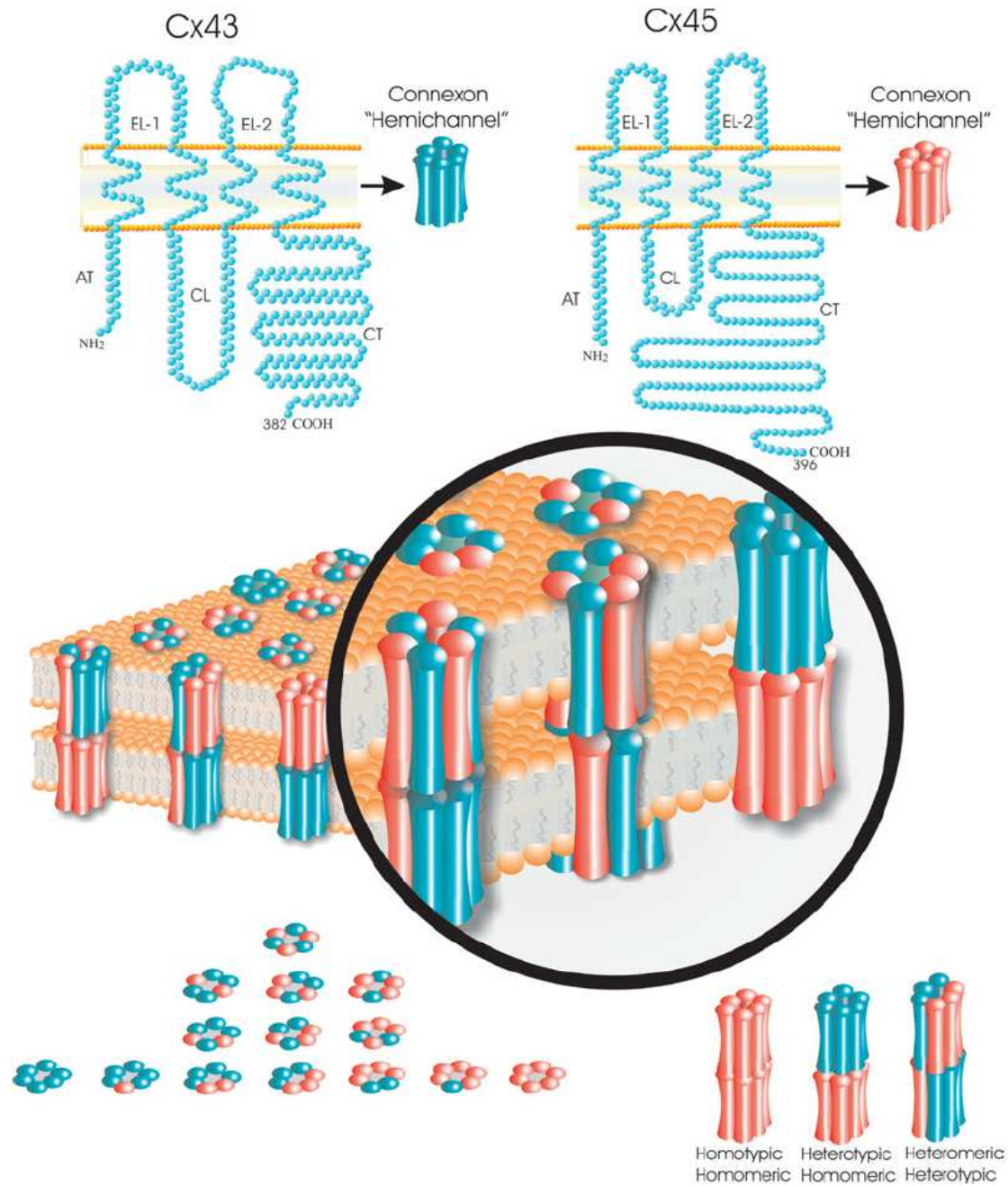


Small ions and molecules pass through gap junction channels, but macromolecules cannot.



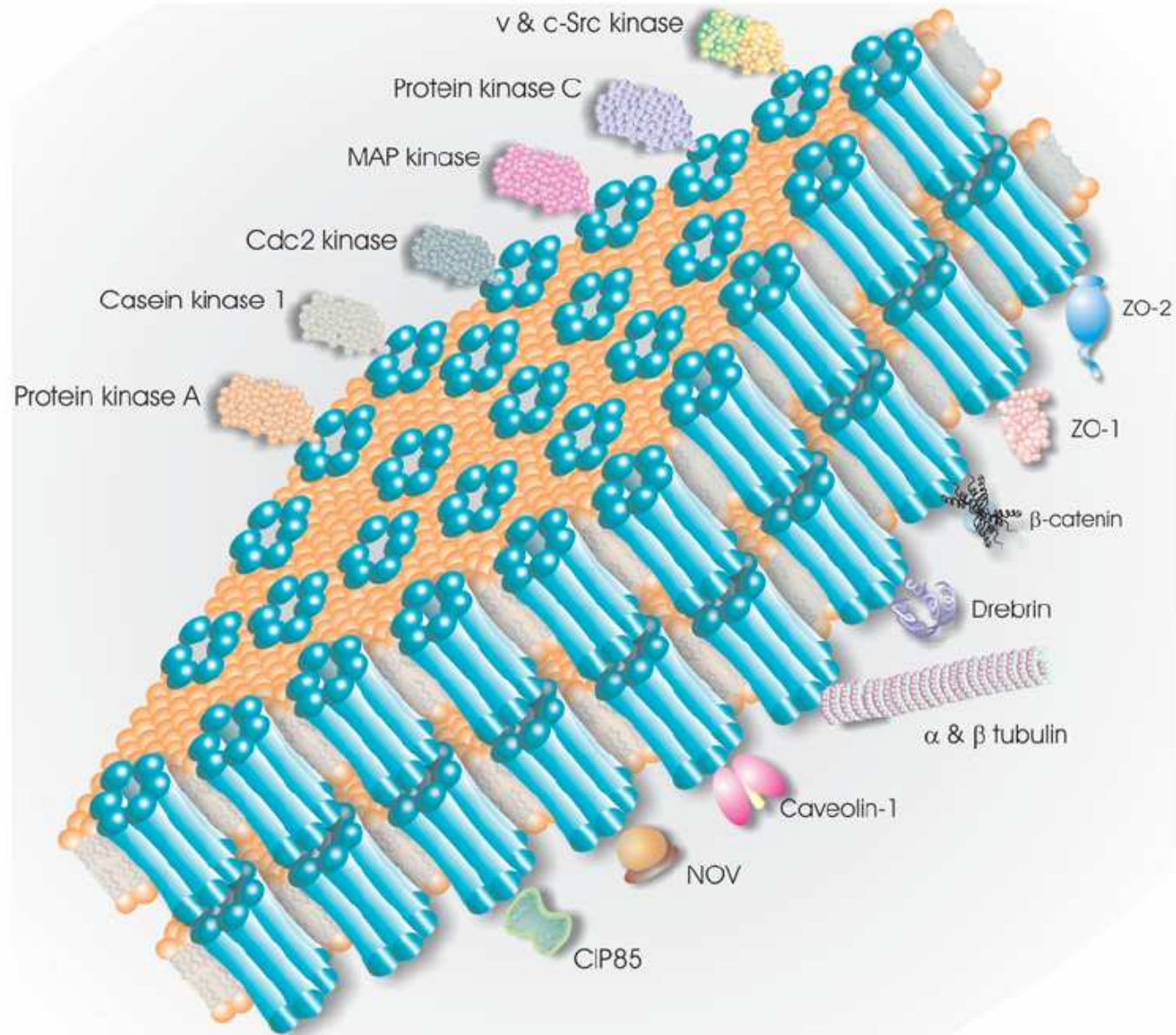
Gap junctional channels are comprised of two connexons.  
Each connexon contains six connexin subunits.

FIGURE 1. Model of gap junction particles embedded in the plasma membranes of two adjacent cells.



**Figure 2 Assembly of connexins into gap junctions**

Cx43 and Cx45, as examples of connexin family members, typically thread through the membrane four times, with the AT, CT and CL exposed to the cytoplasm. Connexin arrangement in the membrane also yields two extracellular loops designated EL-1 and EL-2. Six connexins oligomerize into a connexon or hemichannel that docks in homotypic, heterotypic and combined heterotypic/heteromeric arrangements. In total, as many as 14 different connexon arrangements can form when two members of the connexin family intermix.



**Figure 4 Cx43-binding proteins**

Protein kinases known to phosphorylate Cx43 are shown along the top of a diagrammatically represented gap-junction plaque. A number of scaffolding proteins and proteins of unknown function that have been shown to bind directly or indirectly to Cx43 are shown along the bottom of the gap-junction plaque. It is important to note that it is not necessarily expected that all proteins shown here bind to Cx43 while it is a resident of the gap-junction plaque. MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; CIP85, Cx43-interacting protein of 85 kDa.

# Gap junctions

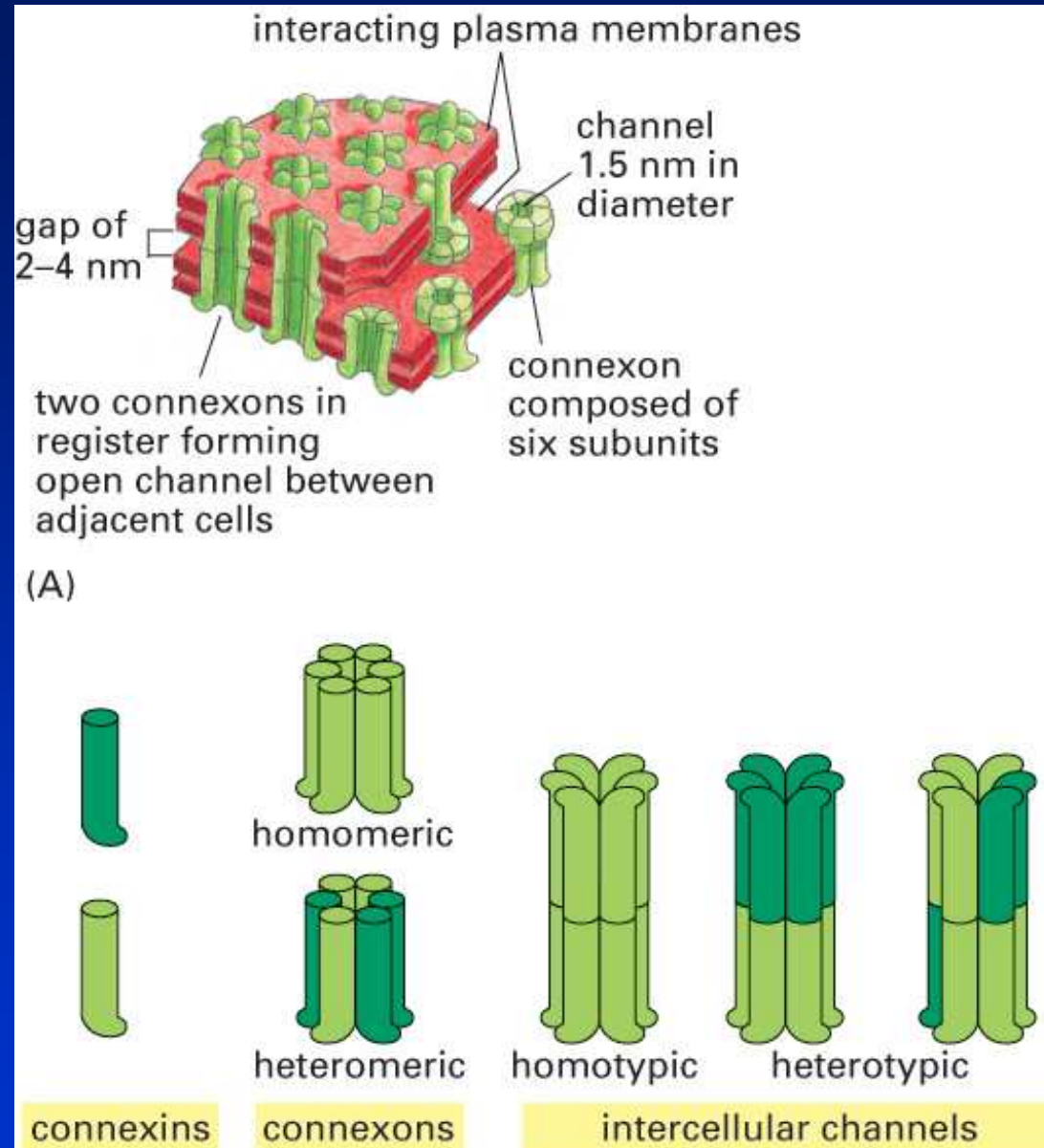


Figure 19–15. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# FYZIOLOGICKÁ ÚLOHA GJIC

## ▶ HOMEOSTÁZA

rychlá rovnováha živin, iontů a tekutin

## ▶ ELEKTRICKÁ SPOJENÍ

slouží jako el. synapse u neuronů, buněk hladkého svalstva, srdečních myocytů

## ▶ TKÁŇOVÁ ODPOVĚĎ NA HORMONY

second messengers (Ca<sup>2+</sup>, cAMP, ceramid, IP3) procházejí ze stimulovaných buněk dále - šíření signálů v bun. populacích

## ▶ REGULACE EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE

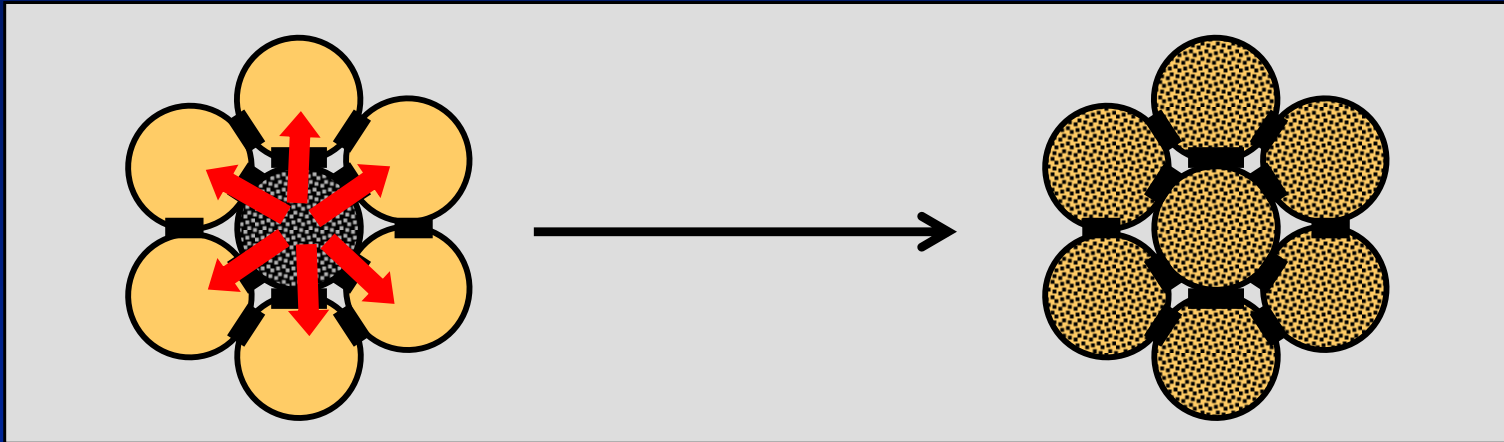
cesta pro chemické a elektrické vývojové signály

Homologní a heterologní komunikace - mezi stejnými nebo různými buněčnými typy

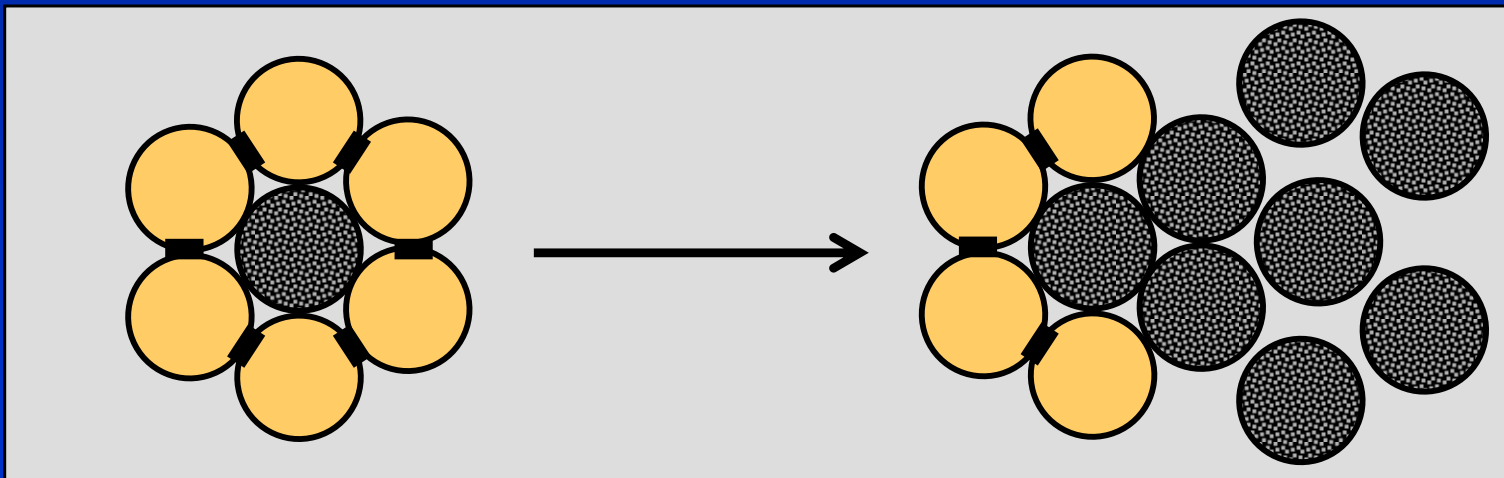
Změny v GJIC spojeny s kontrolou růstu, vývoje, diferenciace, apoptózy a adaptivní odpovědi

# Model růstové kontroly prostřednictvím gap junctions (GJ)

## Růstově stimulační signál



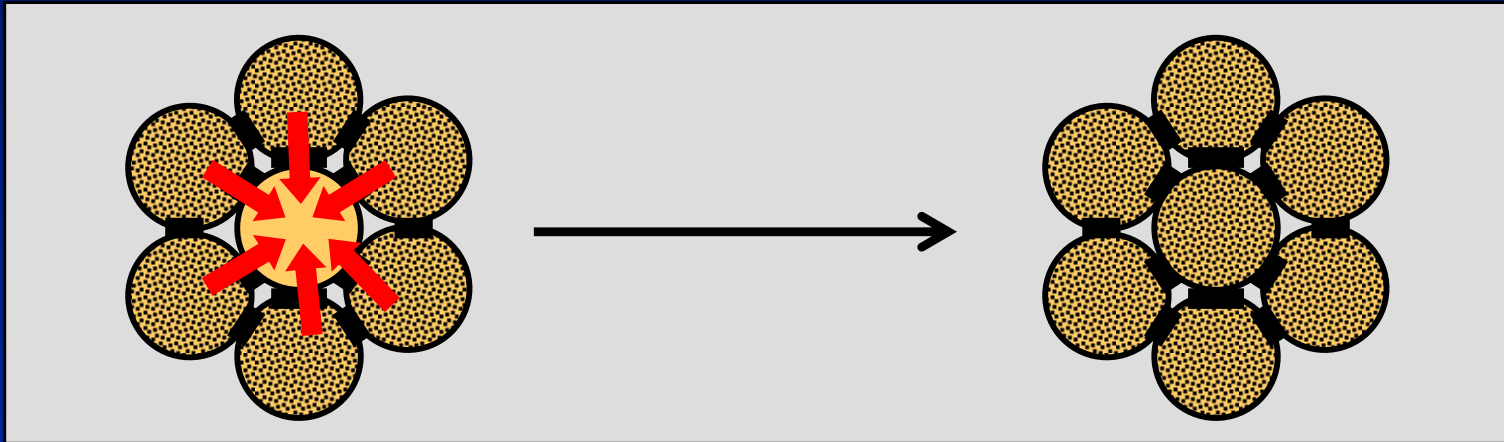
Růstově stimulační signál difunduje do sousedních buněk přes GJ a dosahuje substimulační úrovně



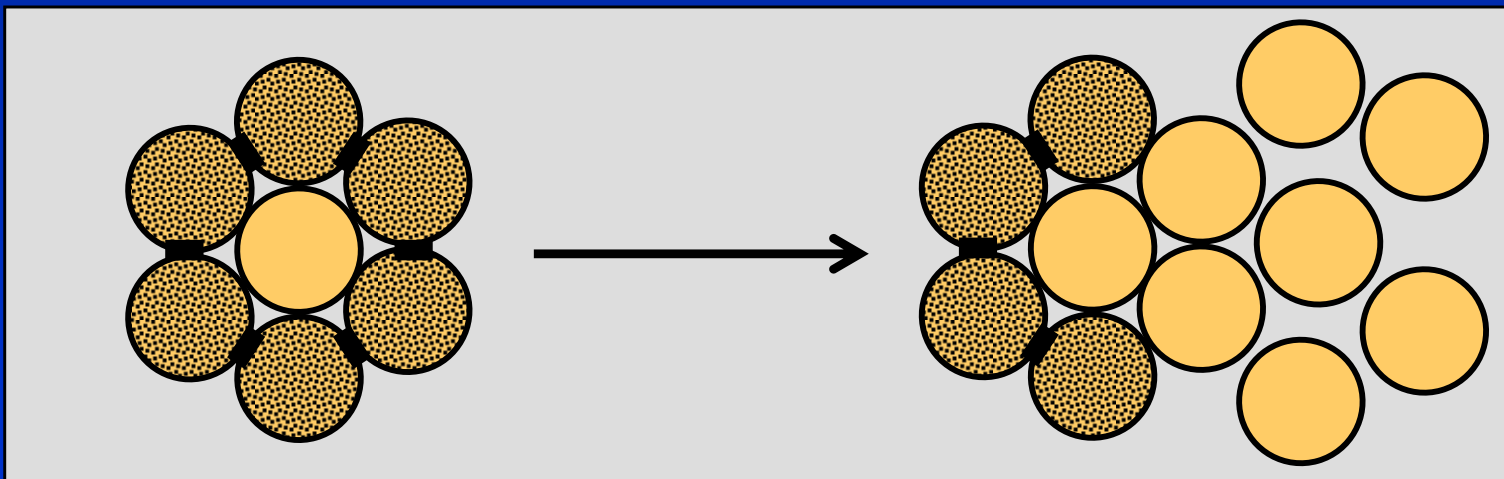
K difúzi signálu nedochází u buněk postrádajících GJ a je zahájeno buněčné dělení



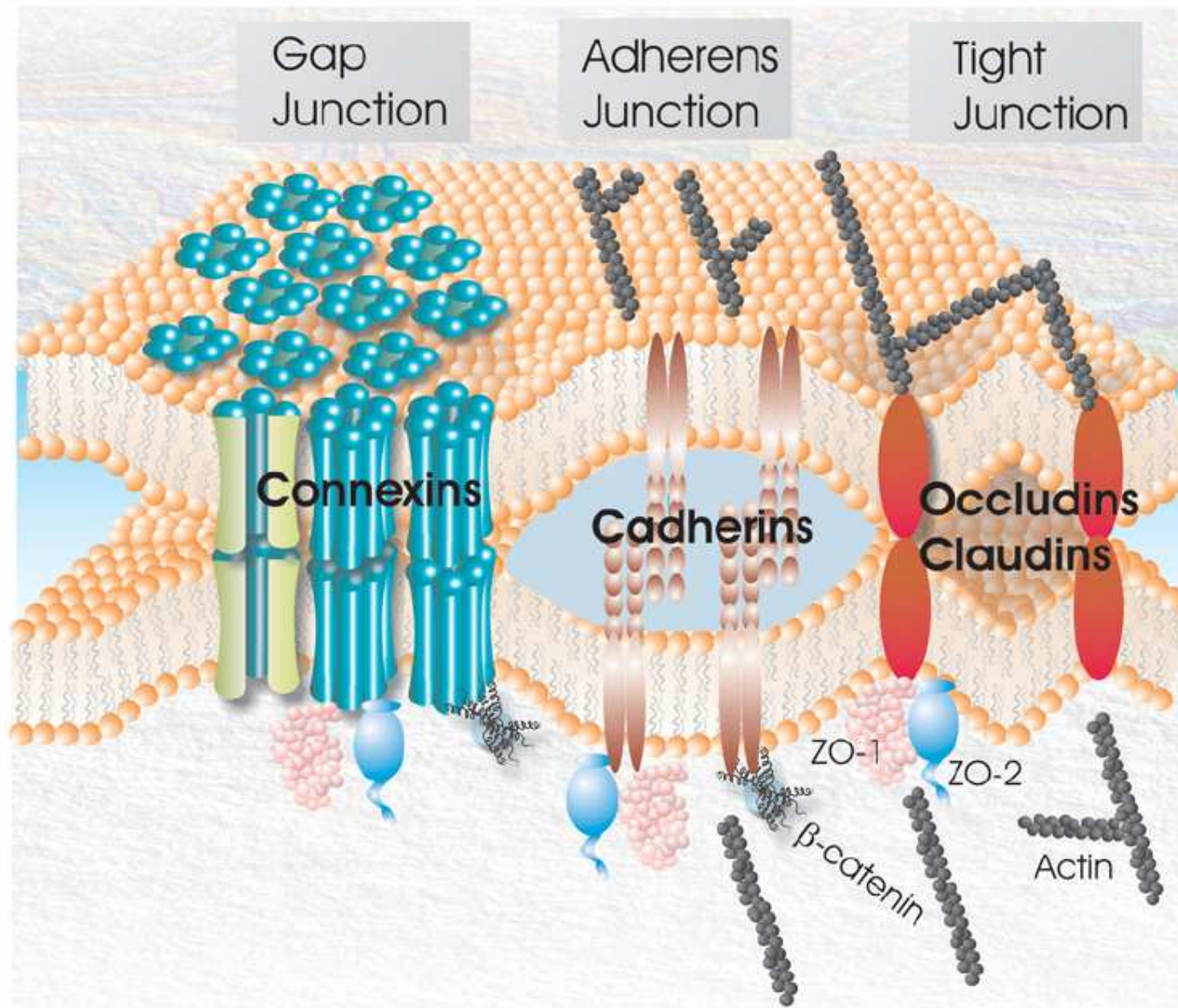
## Model růstové kontroly prostřednictvím gap junctions (GJ) Růstově inhibiční signál



Růstově stimulační signál difunduje do sousedních buněk přes GJ a zabraňuje buněčnému dělení



Signál se nešíří do buněk postrádajících GJ a dochází k buněčnému dělení



**Figure 5** Junctional complexes arranged in a nexus

Gap junctions composed of connexins, adherens junctions consisting of cadherins and tight junctions made up of occludins and claudins are often closely arranged in epithelial cells and share common binding proteins that scaffold to actin and microfilaments. Binding-protein-mediated cross-talk allows these three junctional complexes to act as a nexus and be governed by some common regulatory events.

# EXTRACELULÁRNÍ (mimobuněčná) MATRIX (ECM)

ECM může ovlivňovat tvar, přežití a proliferaci buněk. Reciproční interakce mezi ECM a cytoskeletem. Většina buněk musí být připojena k ECM, aby mohly růst, proliferovat a přežívat – závislost na substrátu (anchorage dependence) – zprostředkována integriny a jimi vybuzenými vnitrobuněčnými signály.

Makromolekuly tvořící ECM jsou produkovány lokálně buňkami v matrix, které také pomáhají její organizaci.

Ve většině spojovacích tkání jsou makromolekuly matrix sekretovány fibroblasty (chondroblasty ve chrupavce, osteoblasty v kostech apod.)

Dvě hlavní třídy molekul tvořících matrix:

1) Glykosamylglykany (GAG) – polysacharidové řetězce z opakujících se disacharidových jednotek

většinou kovalentně vázány s proteiny – proteoglykany

4 hlavní skupiny - podle typu cukru, vazby mezi cukry a počtu a lokalizace sulfátových skupin:

Hyaluronan, chondroitin sulfát a dermatan sulfát, heparan sulfát a keratan sulfát

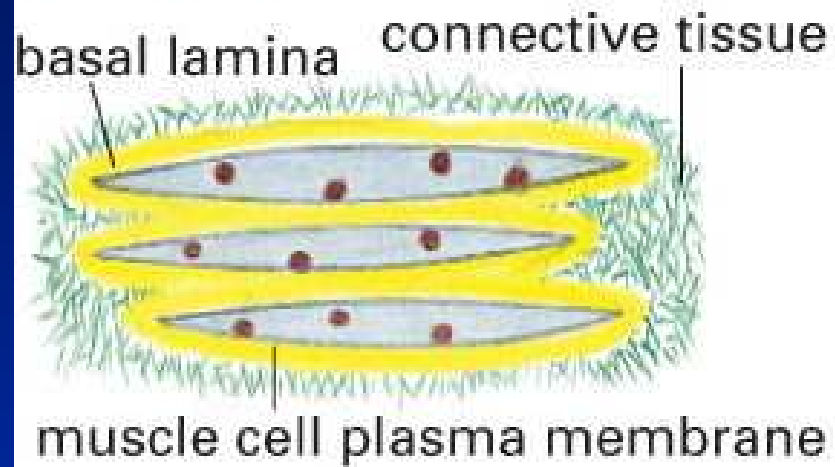
2) Vlákňité proteiny – kolagen, elastin, fibronectin, laminin –strukturální a adhezivní funkce

Degradace komponent ECM – matrix metaloproteázy a serin proteázy

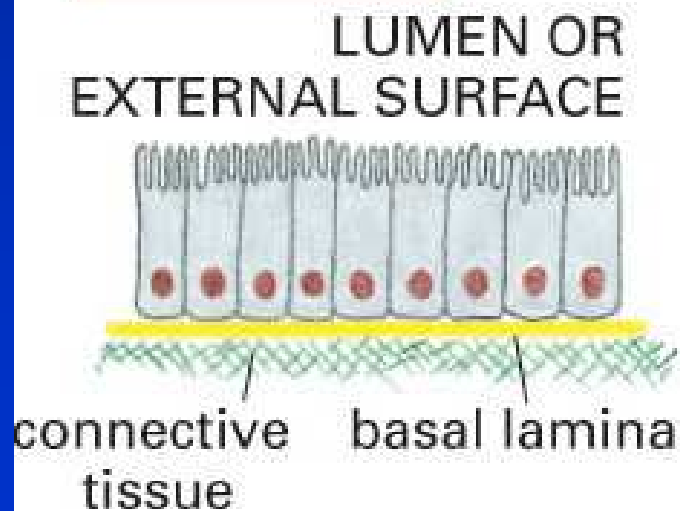
Inhibitory metaloproteáz

# Tři způsoby organizace bazální laminy

## MUSCLE



## EPITHELIUM



## KIDNEY GLOMERULUS

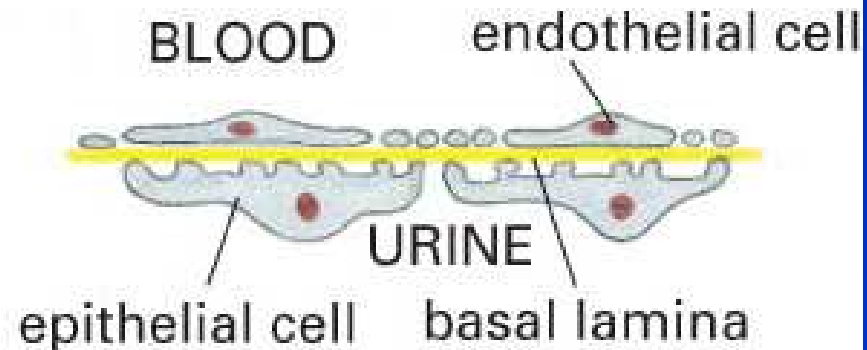


Figure 19-55. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Souhrn spojovacích a nespojovacích adhezívnych mechanizmov väzby savčích buněk navzájem a s ECM

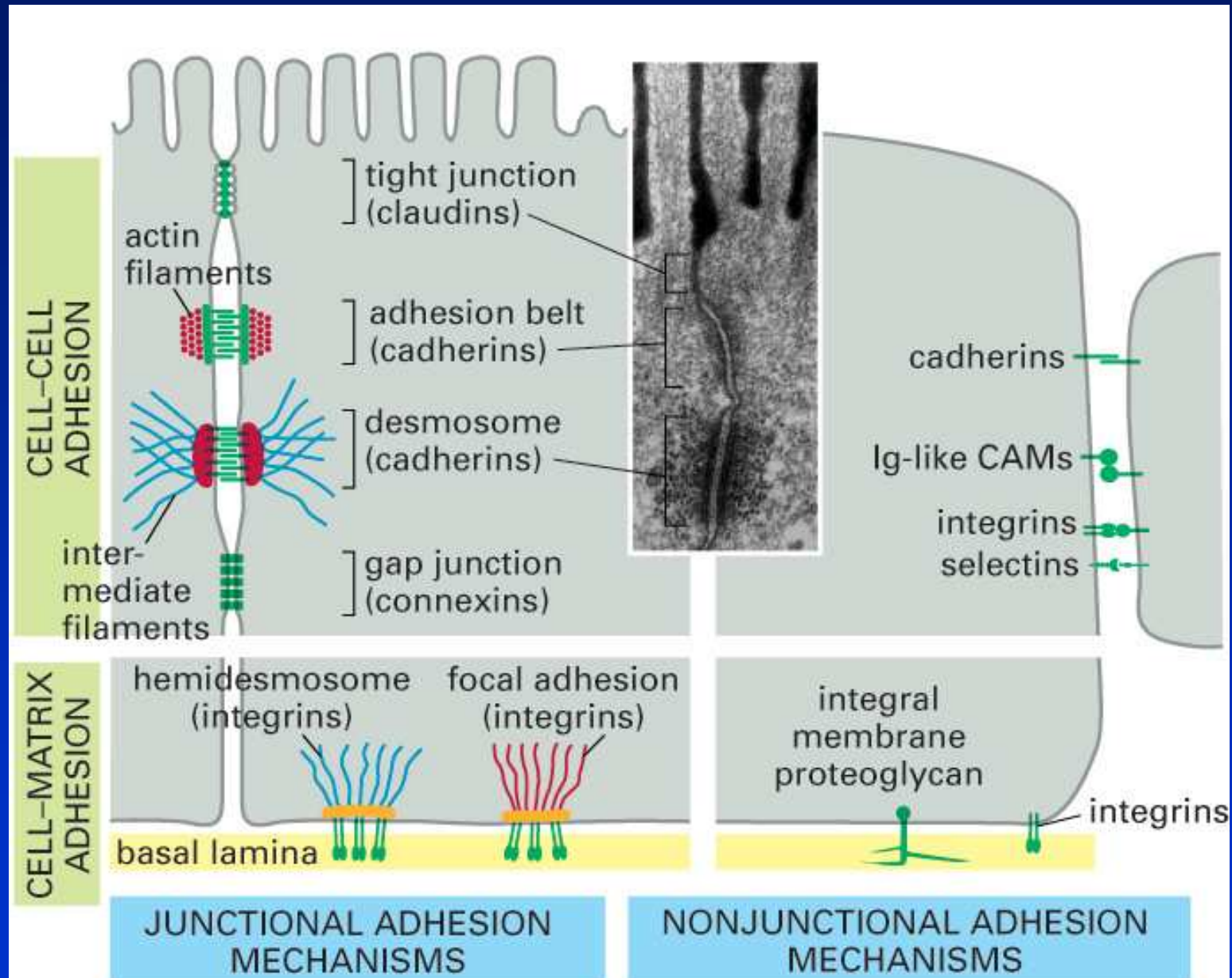


Figure 19-32. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Souhrn různých buněčných spojení nalezených u epitelálních buněk obratlovců

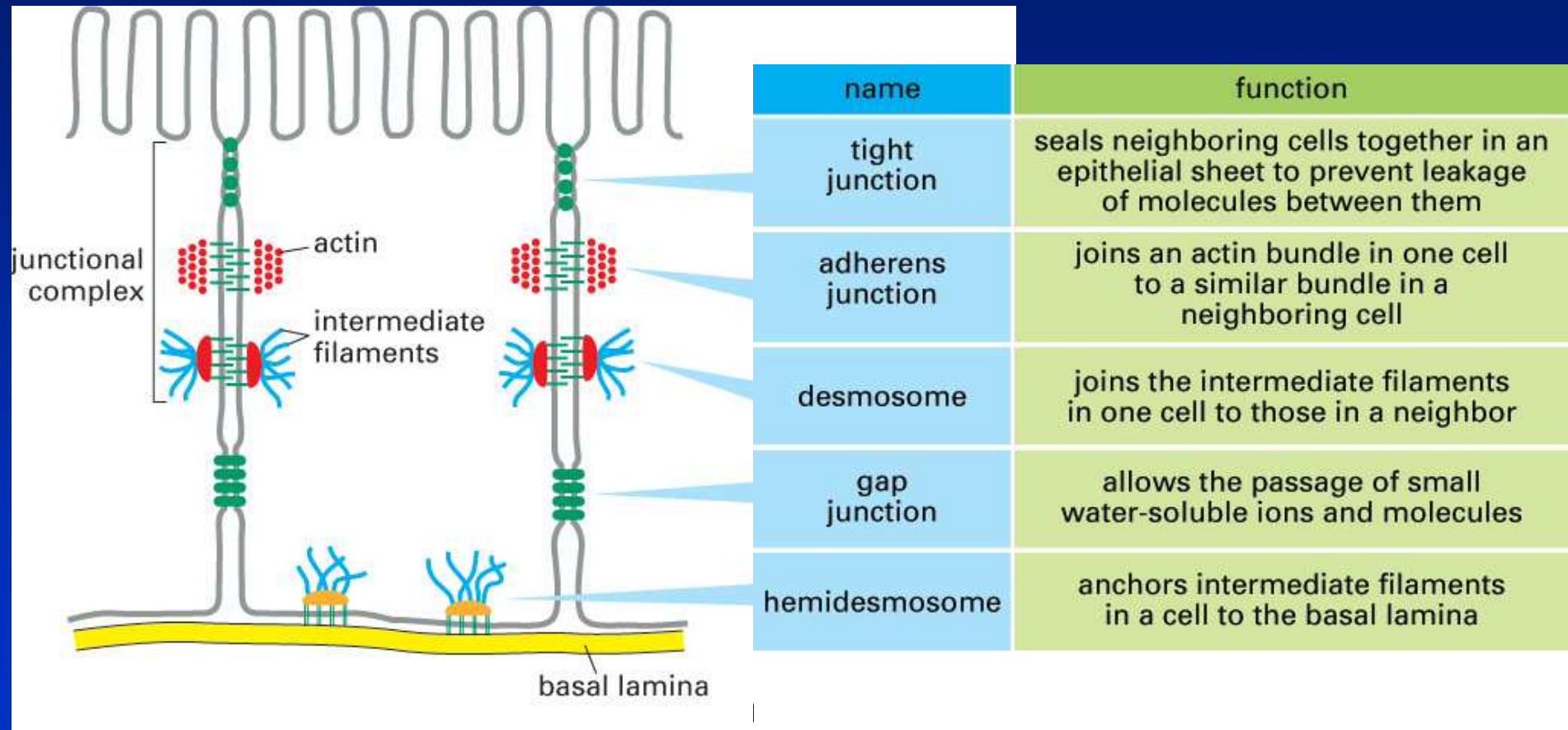


Figure 19-19 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.