



# Buněčné adheze

# 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**.

Ve **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.

# Příčný řez částí stěny střeva

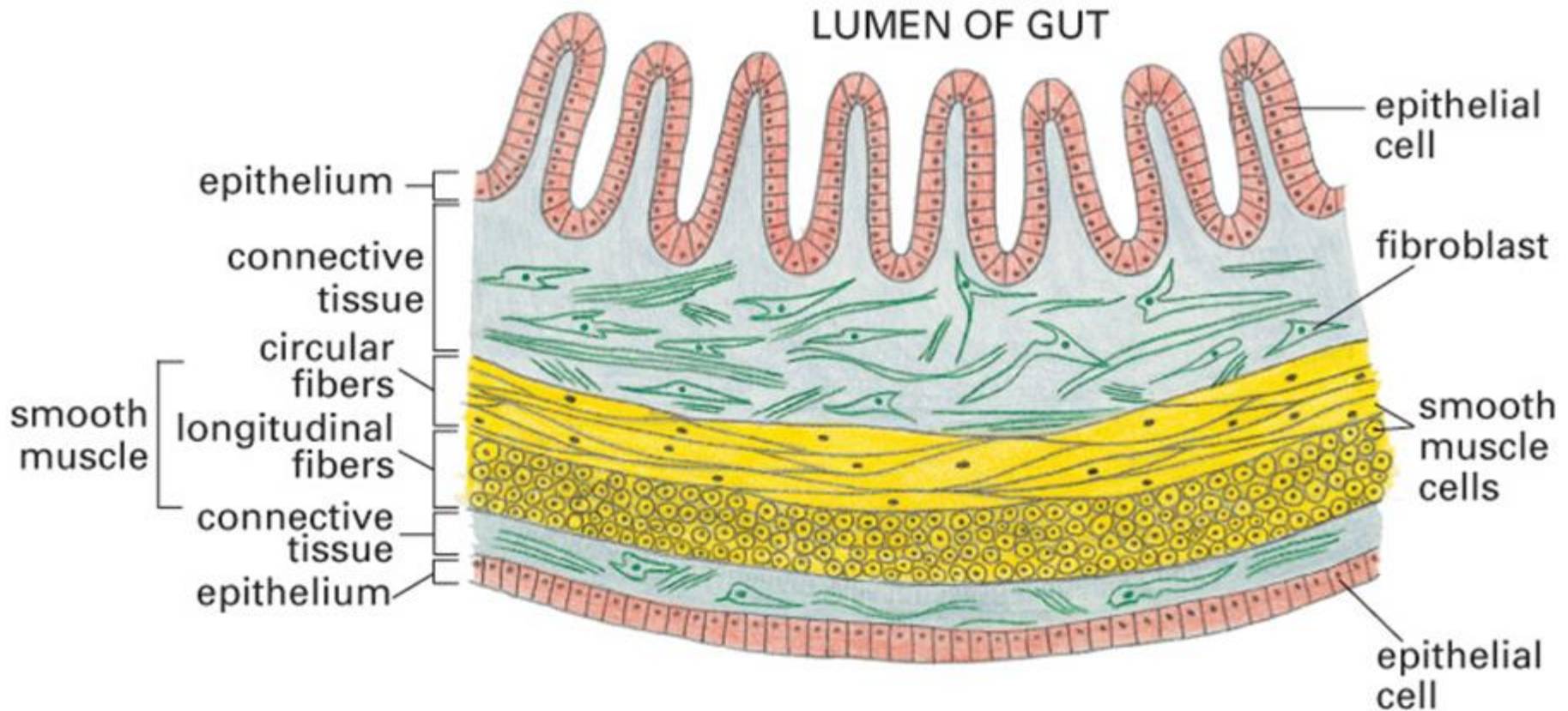


Figure 19–1. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

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**

# Epiteliální tkáň

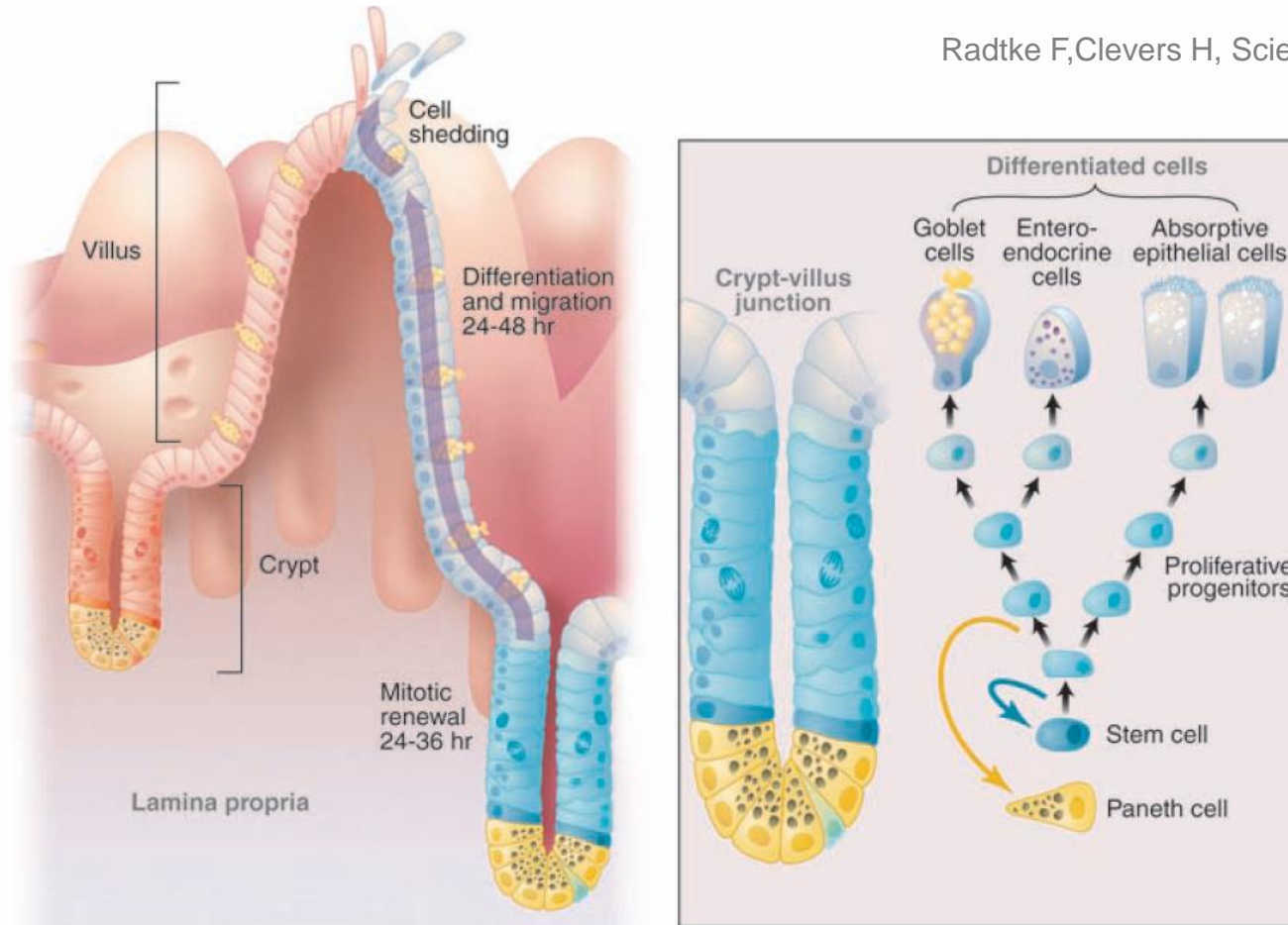
V epiteliálních tkáních jsou buňky spojeny těsně mezi sebou do vrstev (epitelů) a ECM tvoří hlavně tenkou **basální laminu**, na které leží epiteliální vrstva. Zde jsou to zejména buňky, které nesou většinu **mechanického stresu** prostřednictvím silných **vnitrobuněčných proteinových vláken** (složek 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.

# Epitel tenkého střeva

Radtke F, Clevers H, Science 2005



**Fig. 1.** The anatomy of the small intestinal epithelium. The epithelium is shaped into crypts and villi (left). The lineage scheme (right) depicts the stem cell, the transit-amplifying cells, and the two differentiated branches. The right branch constitutes the enterocyte lineage; the left is the secretory lineage. Relative positions along the crypt-villus axis correspond to the schematic graph of the crypt in the center.

Krypty a villi. Kmenové buňky (Panethovy buňky – ochranná funkce), přechodně se dělící buňky, diferencující se linie (Gobletovy, entero-endokrinní a absorptivní epiteliální buňky).



# Obnova střevní výstelky

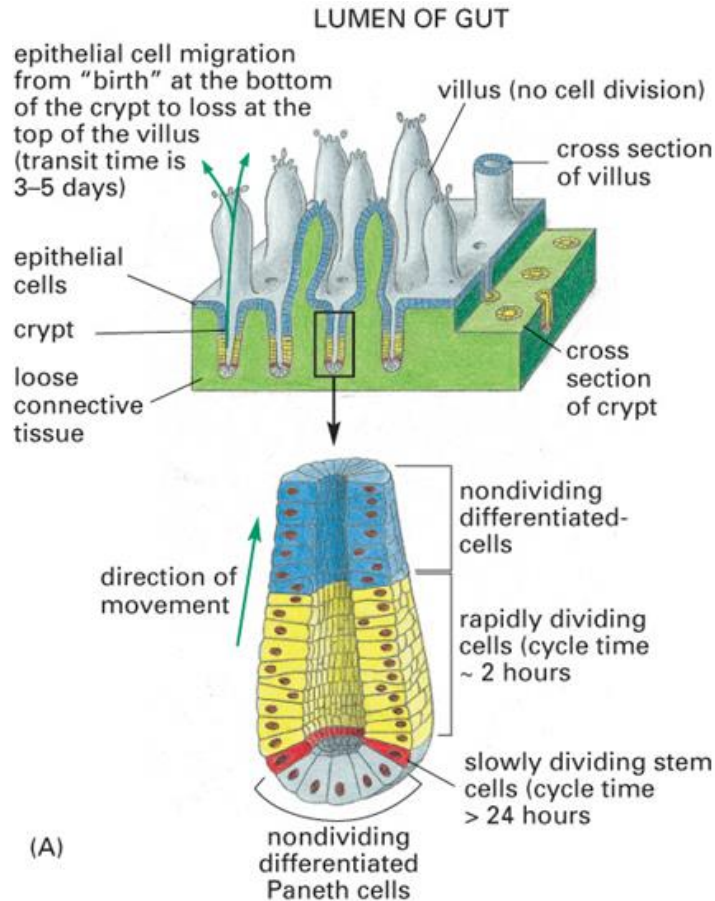


Figure 22-19 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

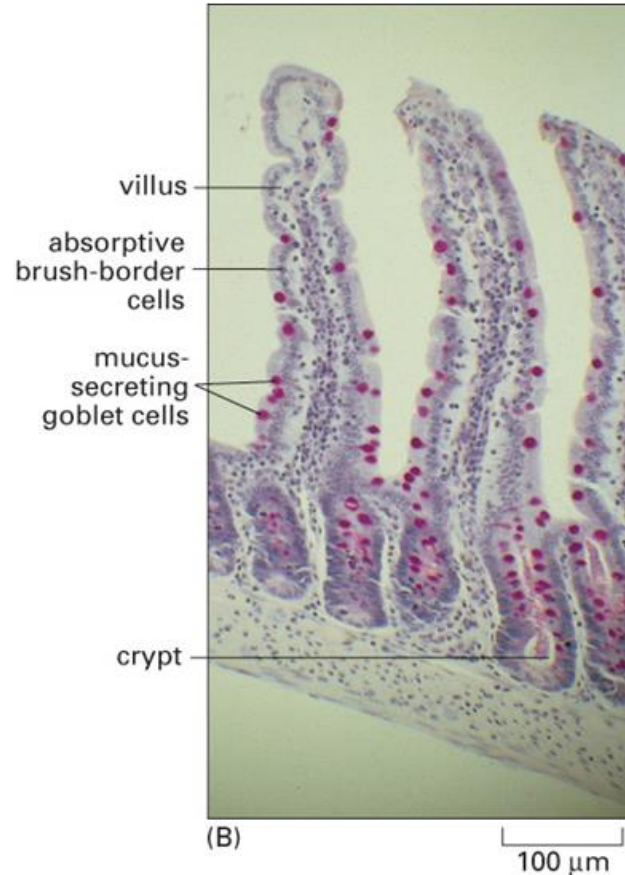


Figure 22-19 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

**Tlusté střevo obsahuje pouze krypty a nejsou zde Panethovy buňky**

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.**

# Mechanismy, jimiž mohou povrchové molekuly zprostředkovat buněčné adheze

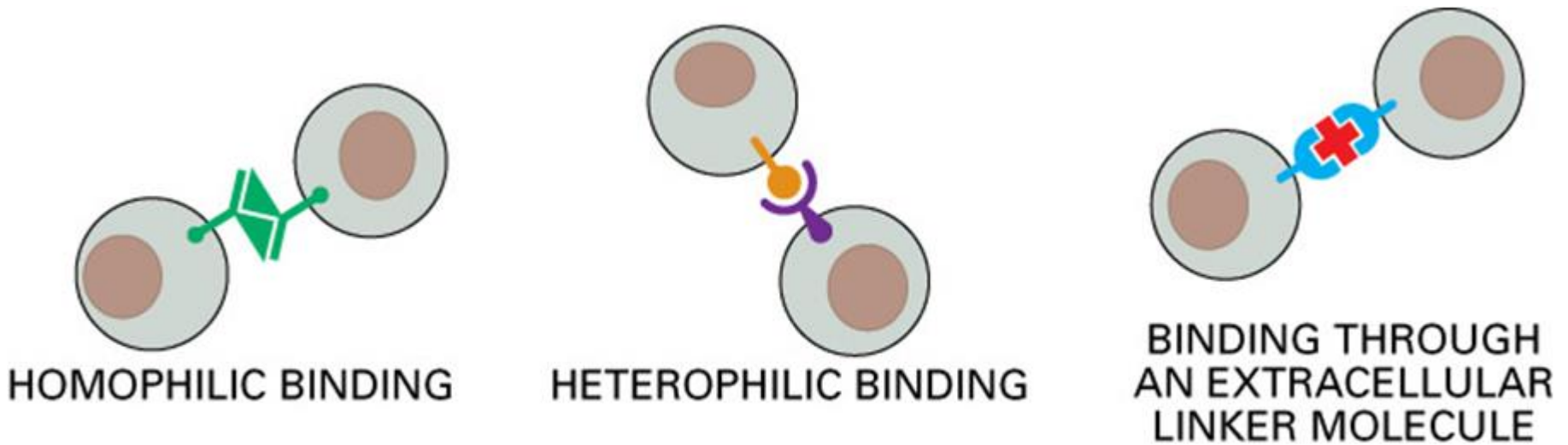


Figure 19–26. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## 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.



# Buněčné spoje, adheze a mimobuněčná matrix (ECM)

Buněčné spoje (junctions) – **funkční skupiny:**

- „tight junctions” (TJ) – 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

# Těsná spojení (tight junctions - TJ) slouží v epitелеch jako bariéra difúze rozpuštěných látek

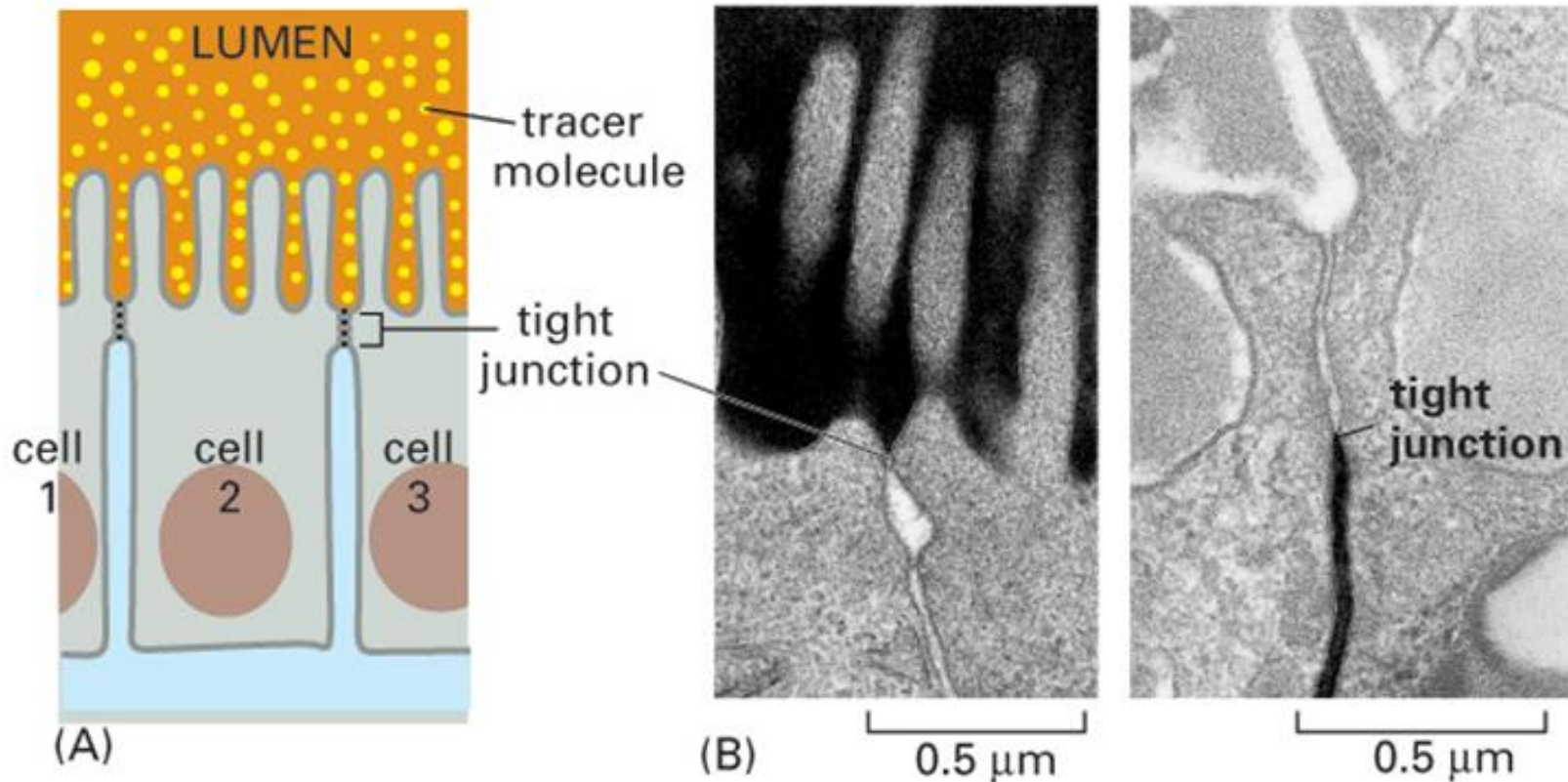


Figure 19–3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

TJ jsou vysoce dynamické struktury regulující přechod iontů a molekul v epiteliálních a endoteliálních buňkách. Tvořeny specifickými proteiny – okludiny, kladiny

# Úloha těsných spojení v buněčném transportu

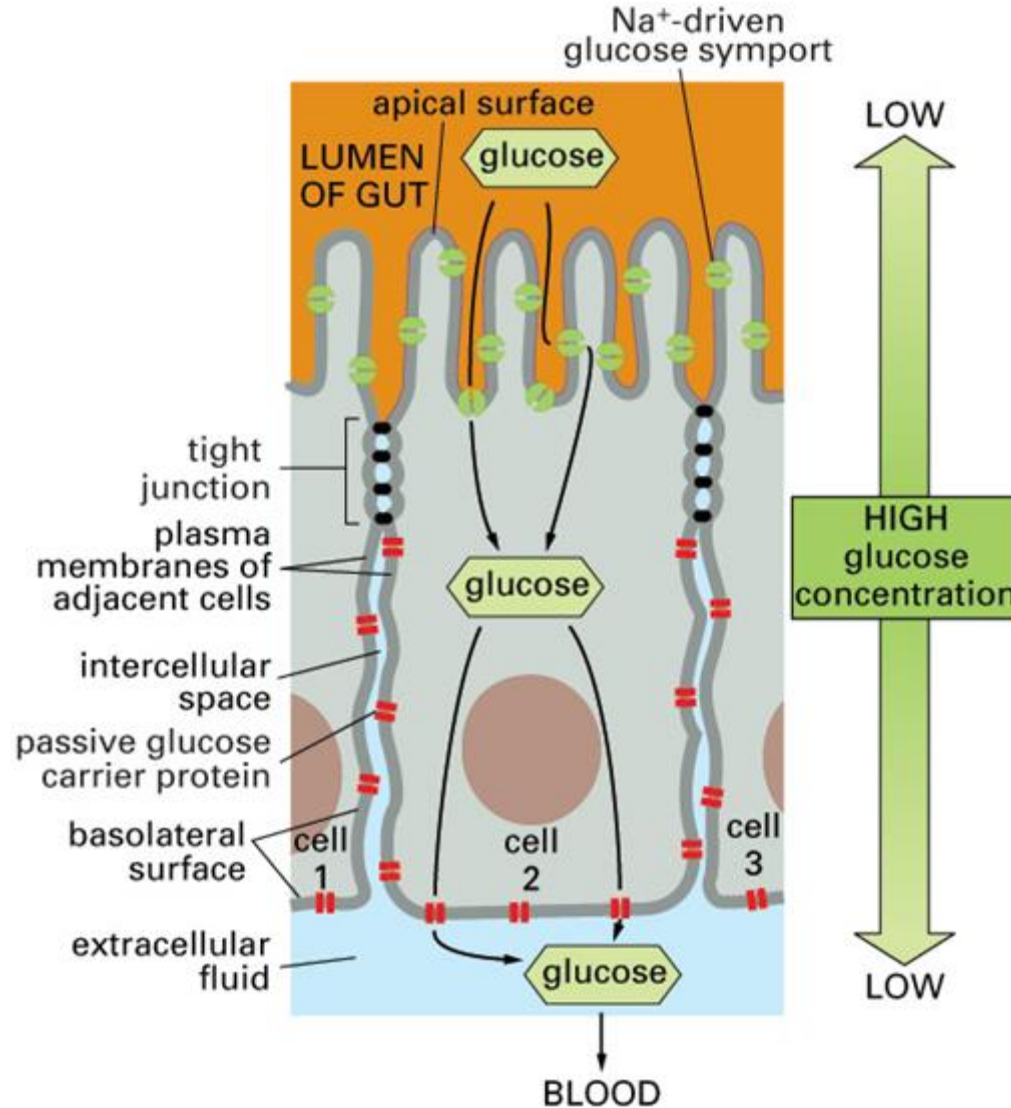


Figure 19-2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Aktivace signálních drah regulujících tvorbu a funkci těsných spojení

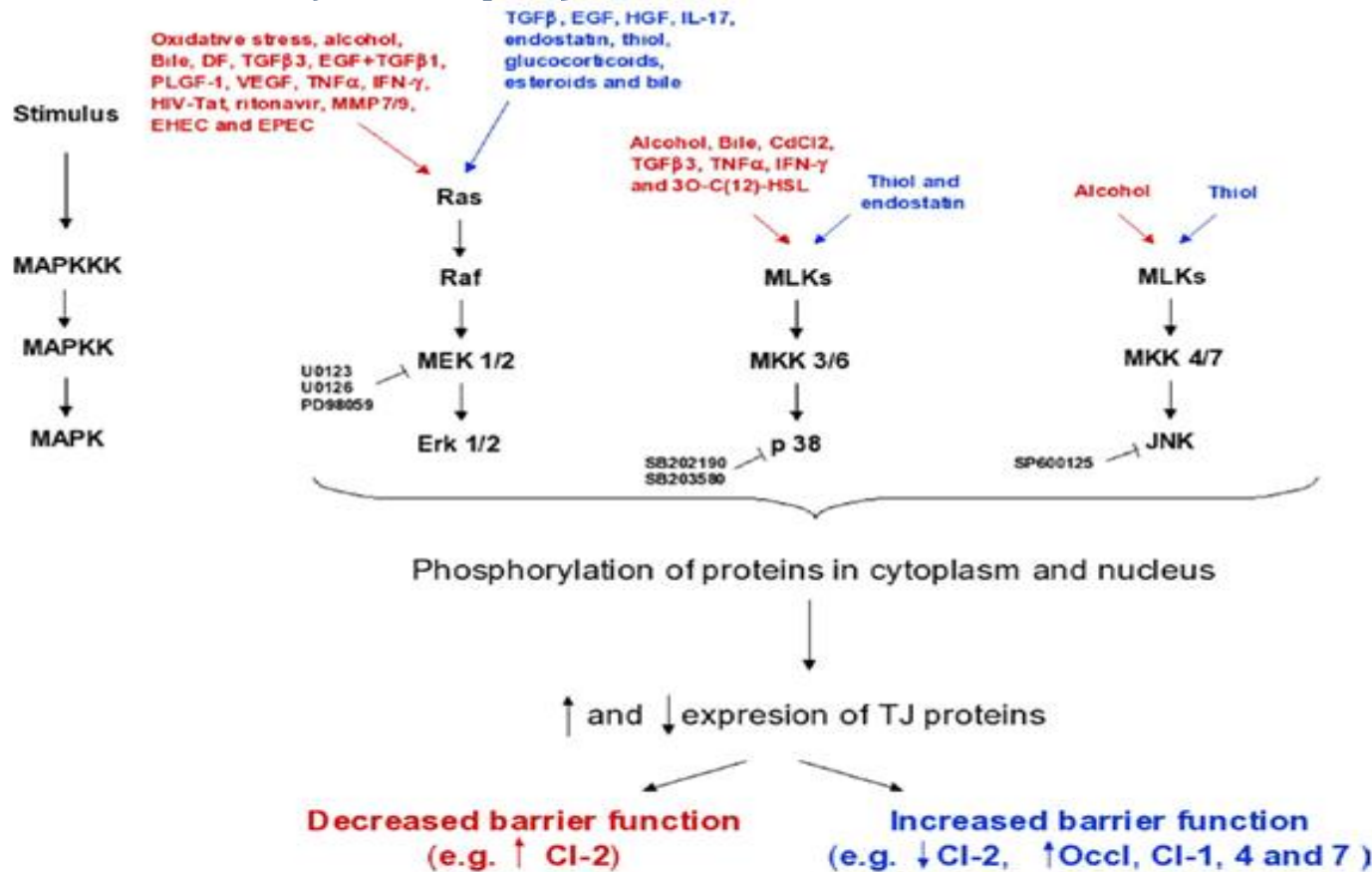


Fig. 5. Activation of the MAPK pathway can lead to TJ opening or assembly depending on the agent that activates the cascade. The uppermost portion of the figure indicates the activators of the MAPK pathway that lead to TJ disassembly (red) or that favor TJ tightening (blue). The hierarchically organization of MAP signaling cascades into three-tiered modules of MAPK4/2, MAPK3/1 and MAPK6/5 is shown.

Please cite this article as: L. González-Mariscal, et al., Crosstalk of tight junction components with signaling pathways, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbame.2007.08.018

Aktivátory MAP kináz, které vedou ke **zrušení TJ a snížení bariérové funkce** nebo **k upevnění TJ a zvýšené bariérové funkce**

# 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	talín, vinculin, $\alpha$ -aktinin, filamin
Hemidesmozóm	integrin $\alpha_6\beta_4$ , BP180	proteiny extracelulární matrix	intermediální vlákna	plektin, BP230



# Cell Adhesion Molecules (CAM)

Buňky uvolněné z různých tkání embrya obratlovců (jsou-li smíchány dohromady) se 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 ECM**, 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

## ► závislé na $\text{Ca}^{2+}$

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 cytoplazmatické straně membrány se tvoří komplexy CAC (**C**adherine **A**ssociated **C**omplex) 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 i migraci z krve do tkání v místech zánětu.

## ► nezávislé na $\text{Ca}^{2+}$

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

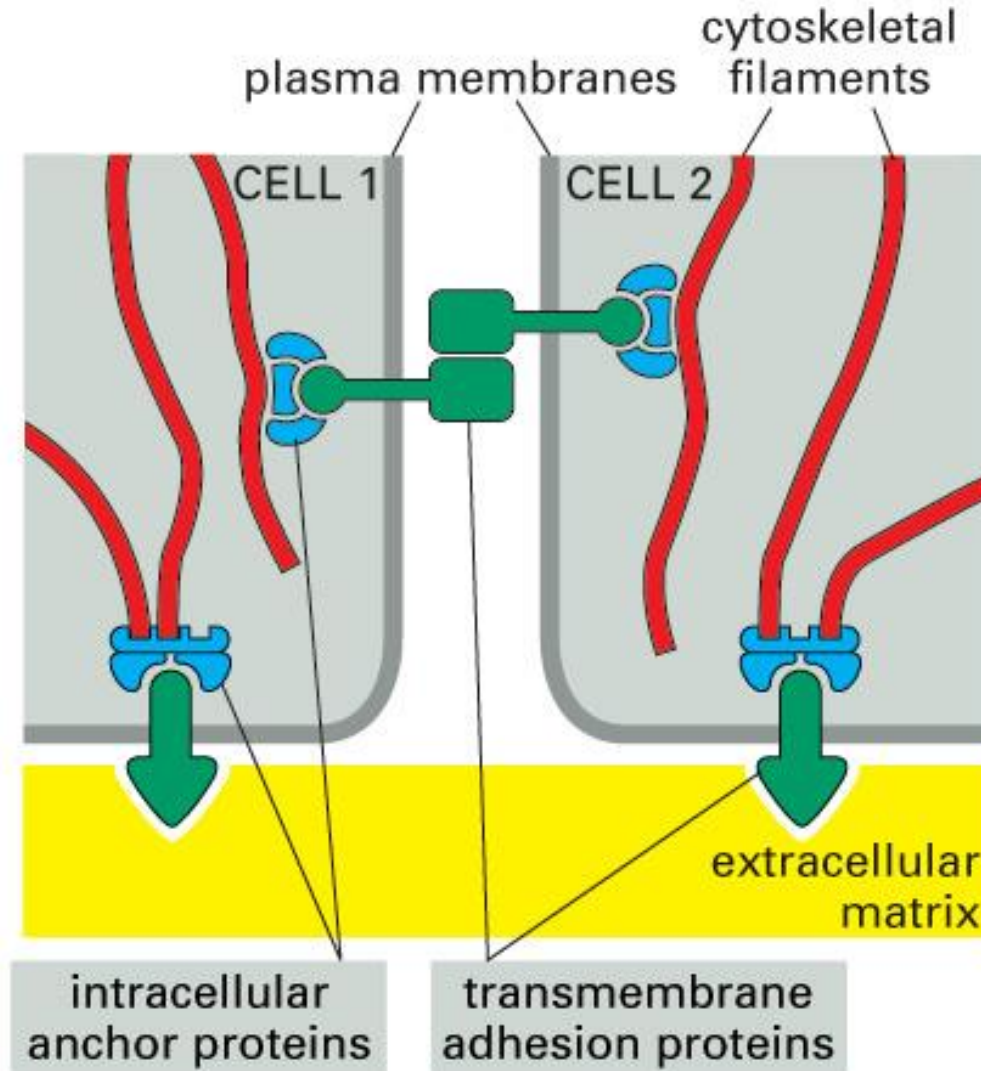


Figure 19–8. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Napojení klasických kadherinů k aktinovým filamentům

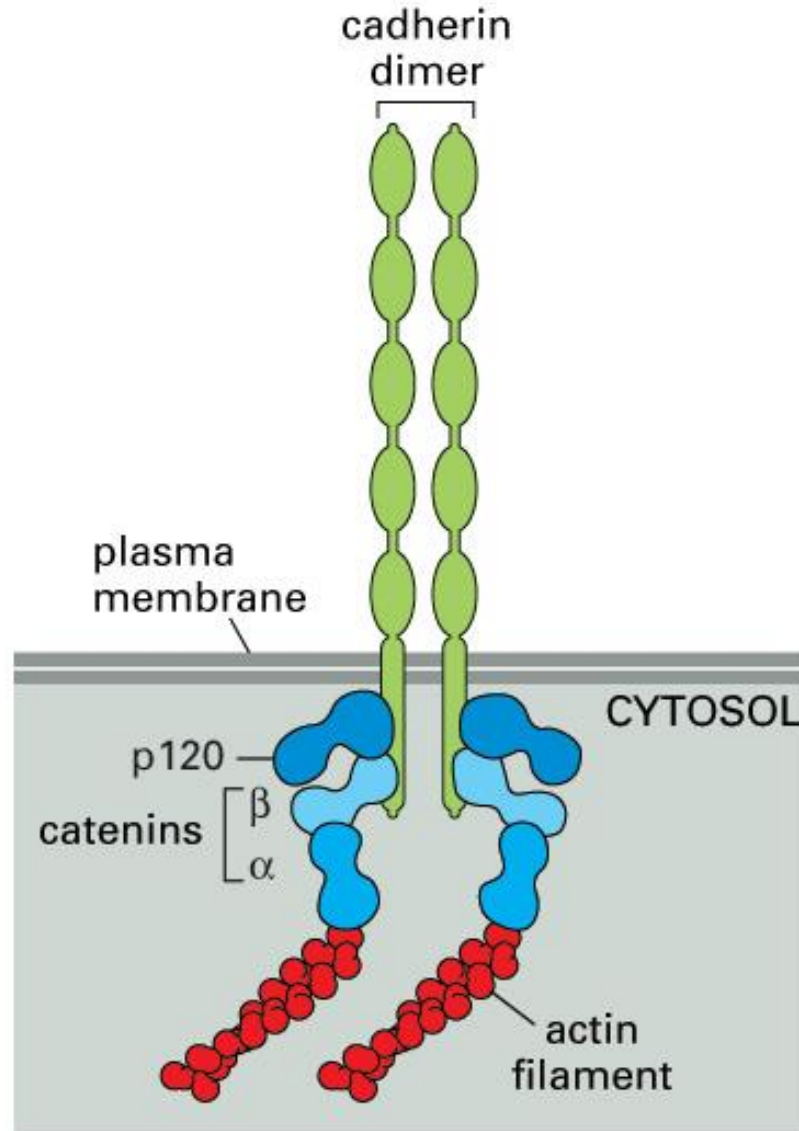
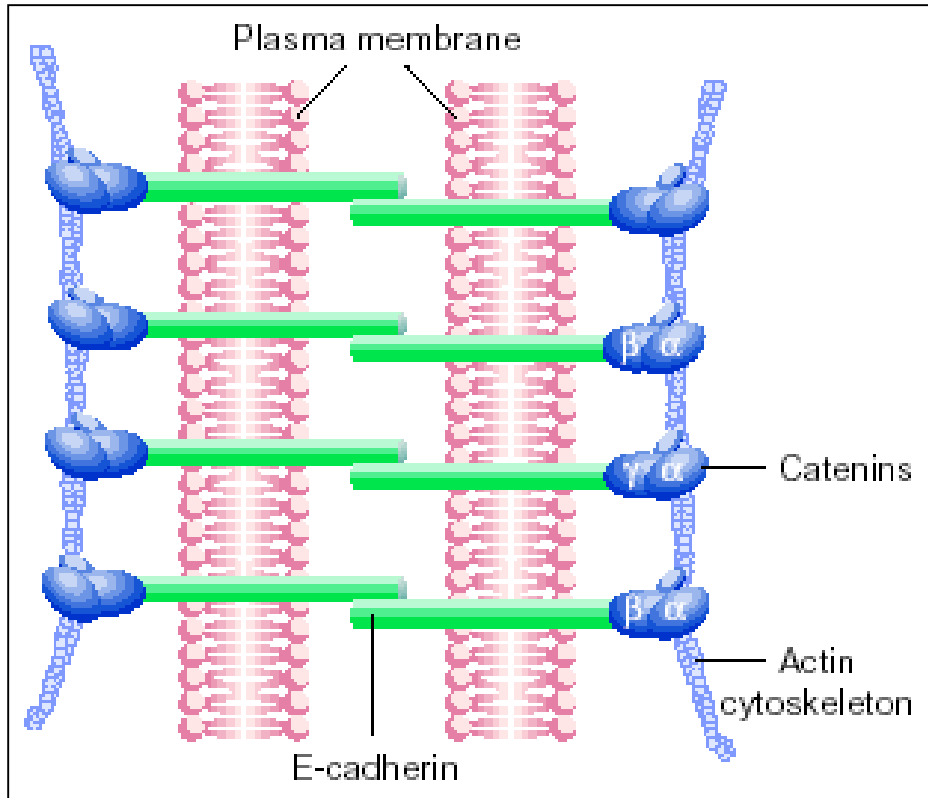
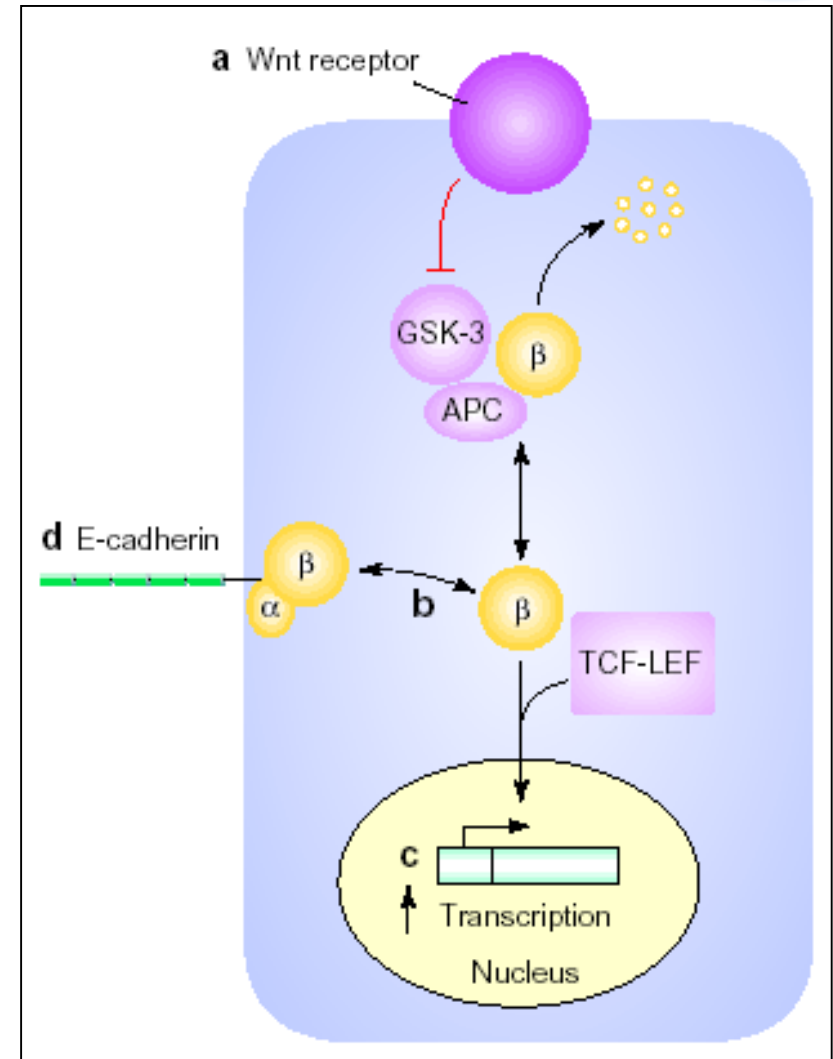


Figure 19–29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

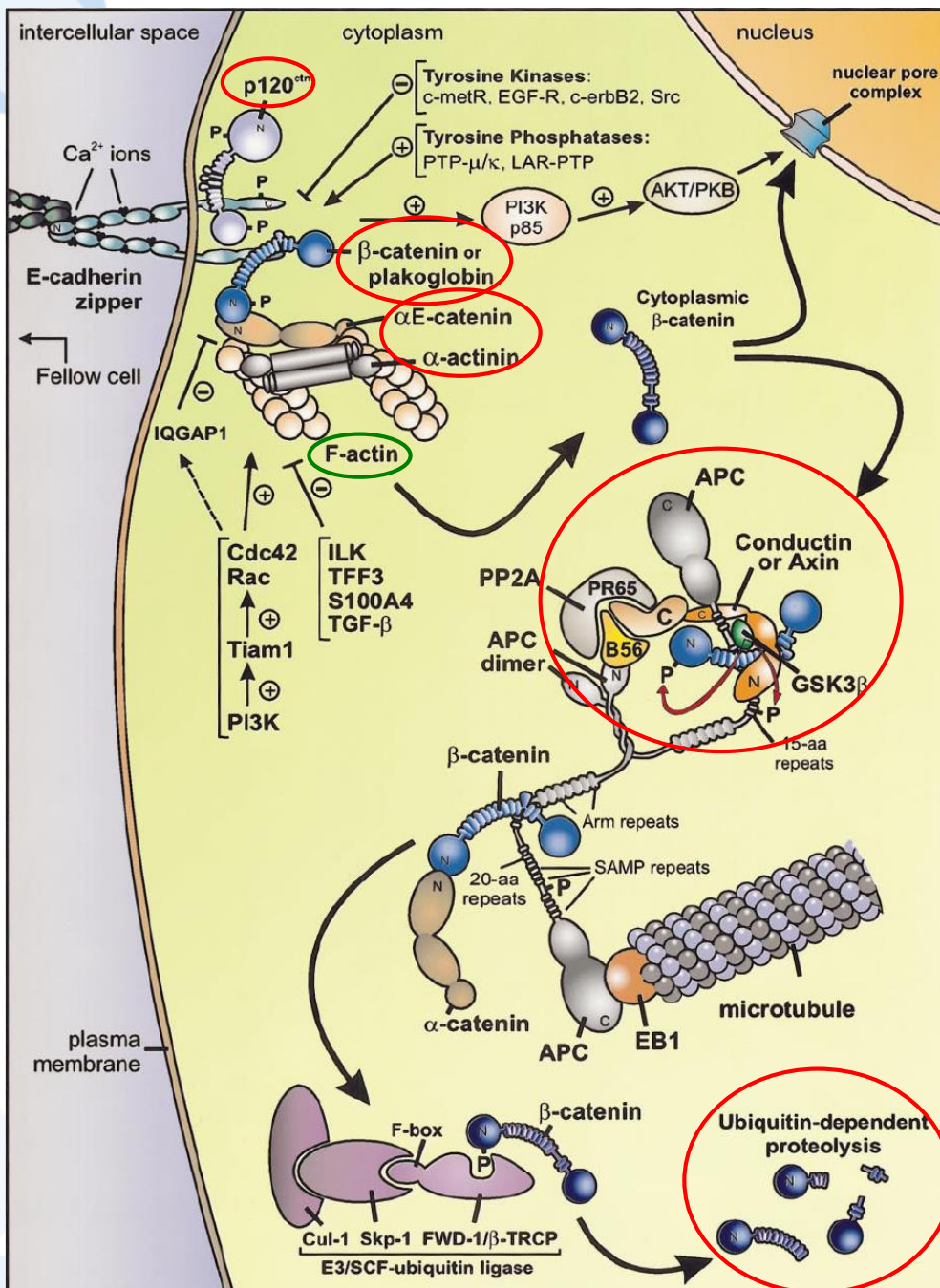
# Napojení klasických kadherinů k aktinovým filamentům



## Wnt signální dráha







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

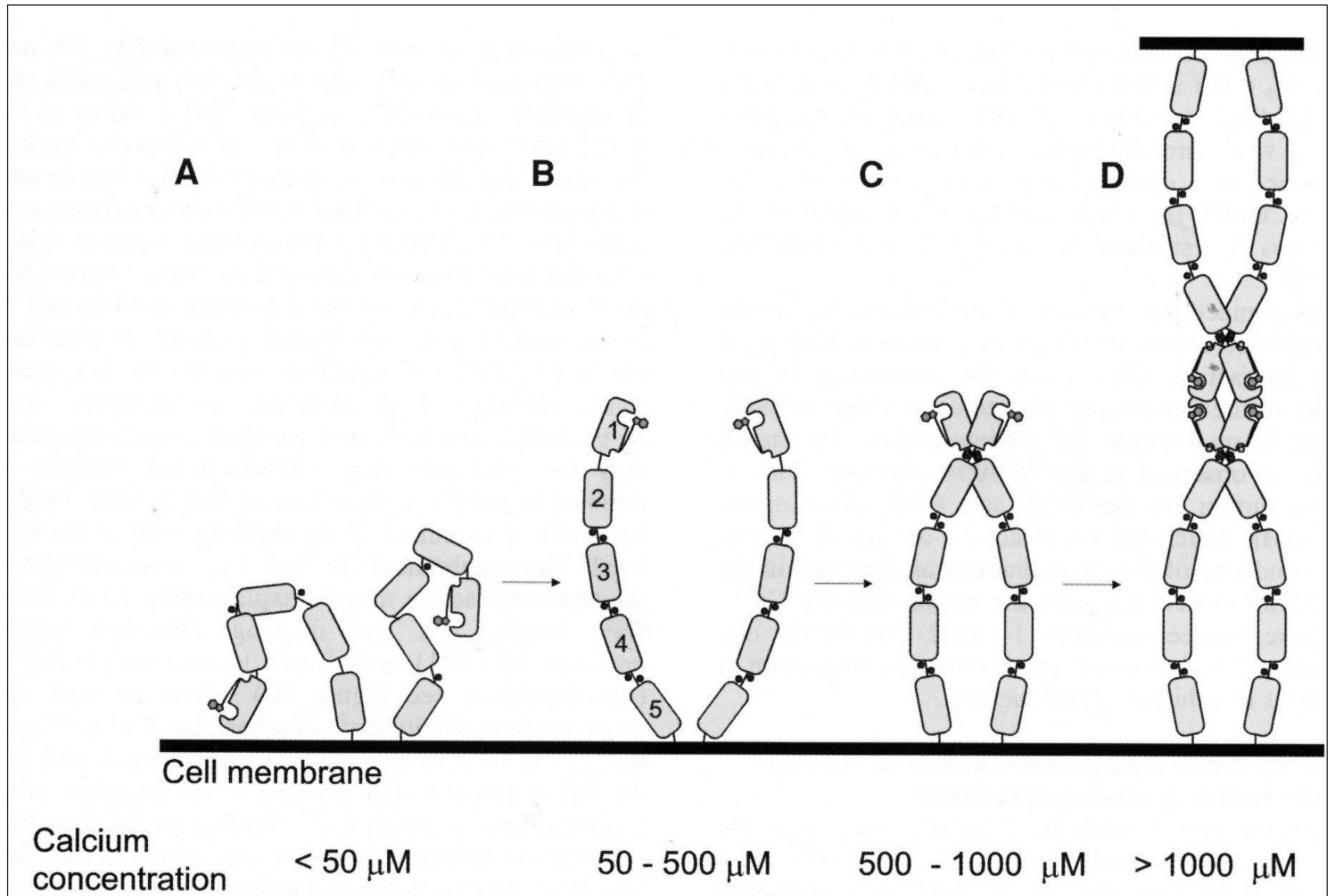
Ca<sup>2+</sup> stabilizuje dimery E-kadherinu, ten se váže cytoplasmatickou doménou na další proteiny.

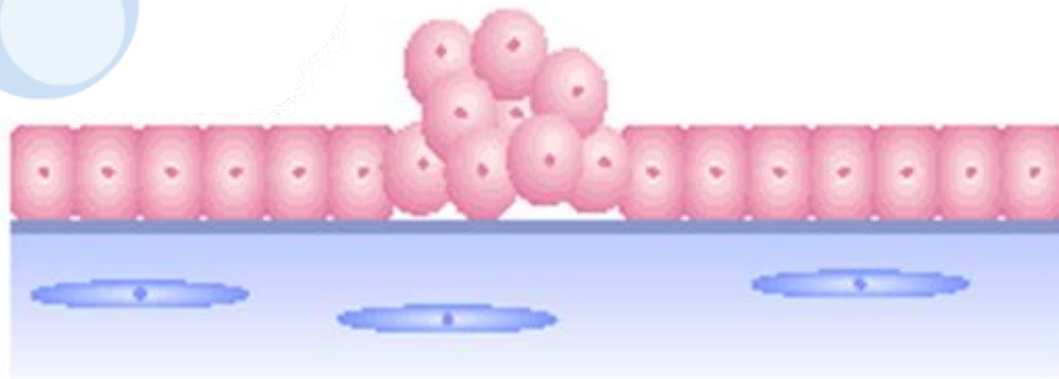
Beta-katenin je normálně degradován nebo se může akumulovat při deregulaci tohoto procesu nebo defektivním E-kadherinu.

Pak je translokován do jádra, kde se váže na transkripční faktor LEF/TCF aktivující transkripci řady genů.

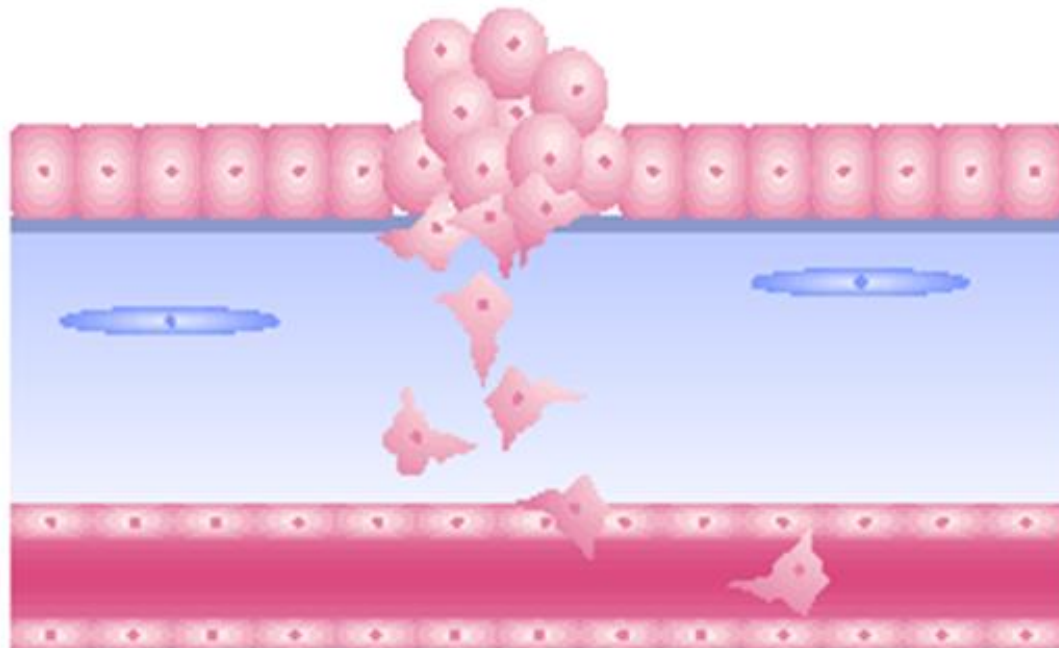
Katenin se rovněž může vázat na APC protein, který spolu s dalšími proteiny v makromolekulárním komplexu zajišťuje na proteasomu závislou degradaci.

# Dimerizace molekul E-cadherinu je závislá na $\text{Ca}^{2+}$





Disruption of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion



## Poruchy adheze zprostředkované E-kadherinem

mohou vést k uvolnění buněk z tkáně.

Význam pro vznik nádorových metastáz.



# Struktura a funkce selektinů

## význam pro funkci buněk imunitního systému

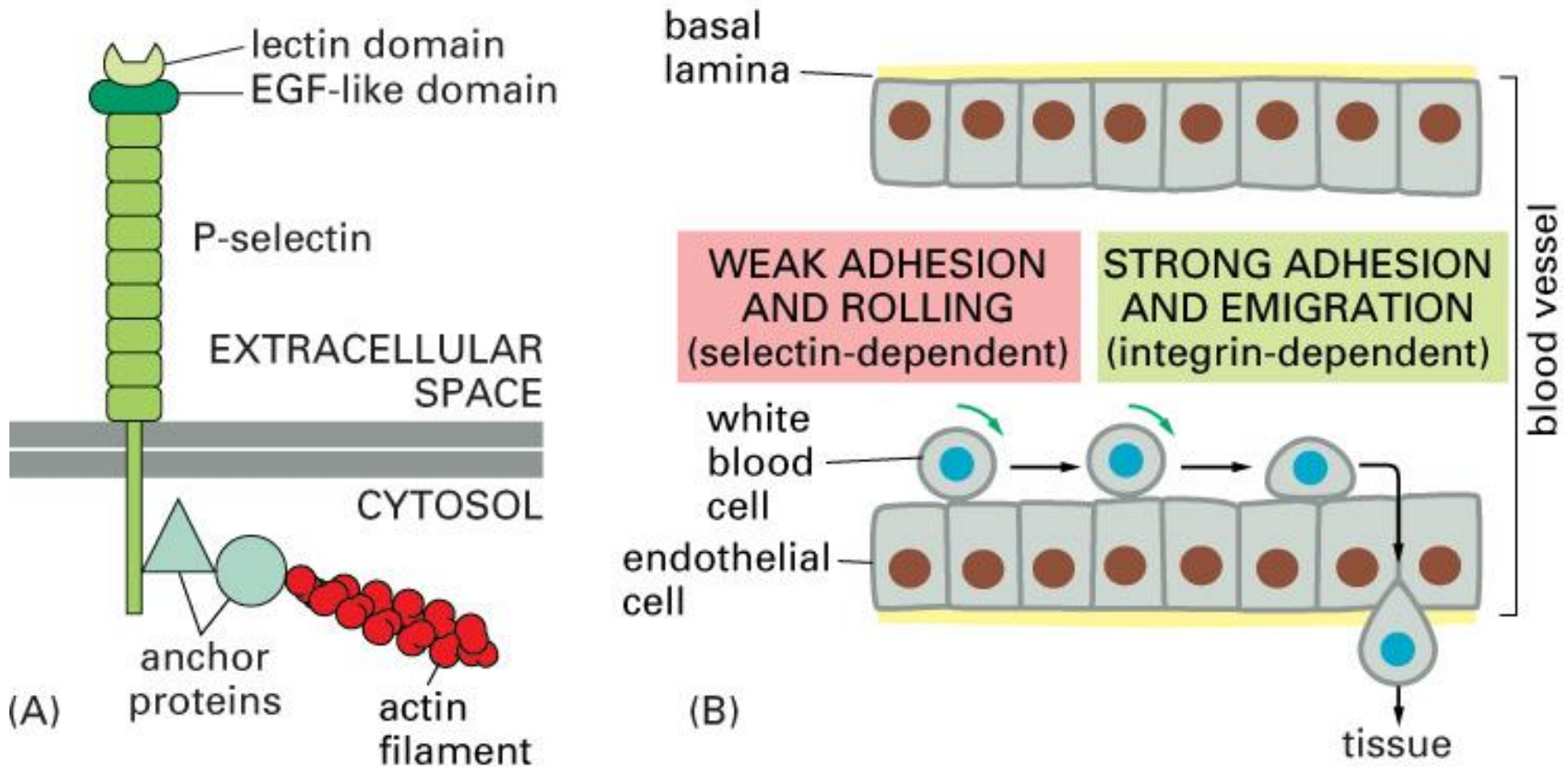


Figure 19–30. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Adherentní spoje buňka - mimobuněčná matrix (ECM)

Specializované oblasti membrány – **fokální kontakty** nebo **adhezivní plaky**, 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)**, **integrin-linked kináza (ILK)** a kinázy rodiny Src.

FAK je spojena s proteiny talinem a paxilinem. Fosforylací dochází k aktivaci systému.

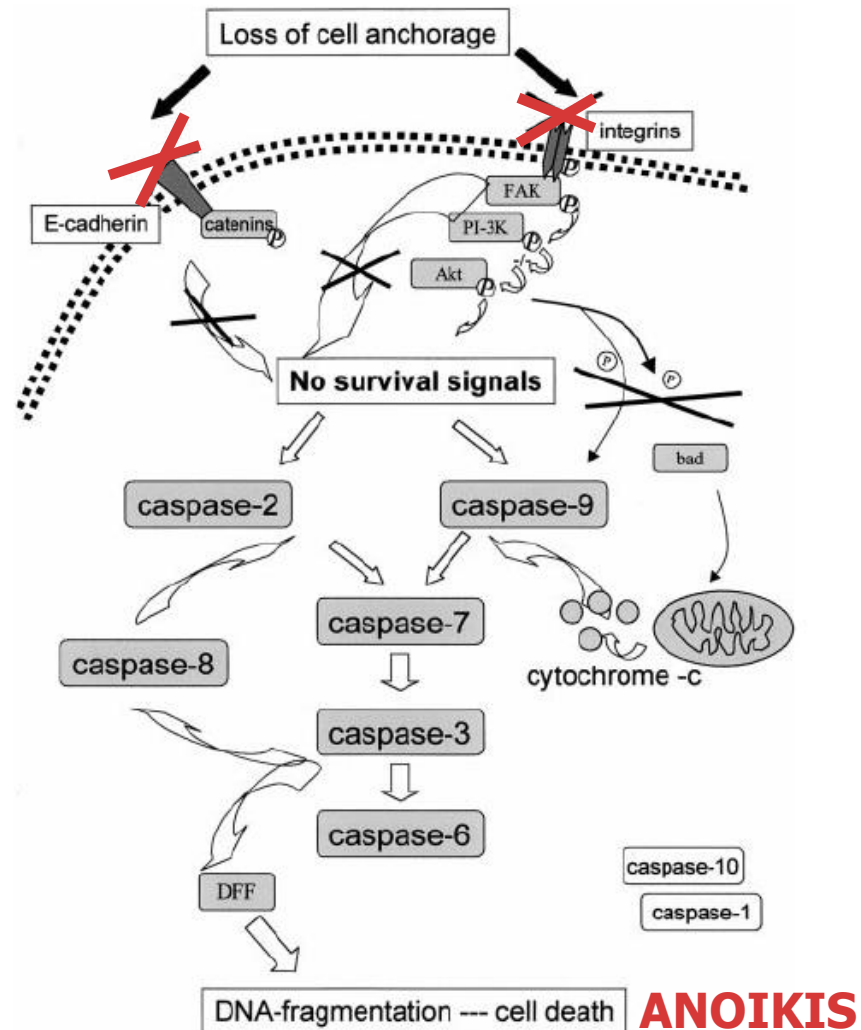
Po ztrátě kontaktu s ECM dochází k tzv. **anoikis (detachment - induced apoptosis)**, tj. apoptóze indukované uvolněním buněk s fyziologických vazeb.

# 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)

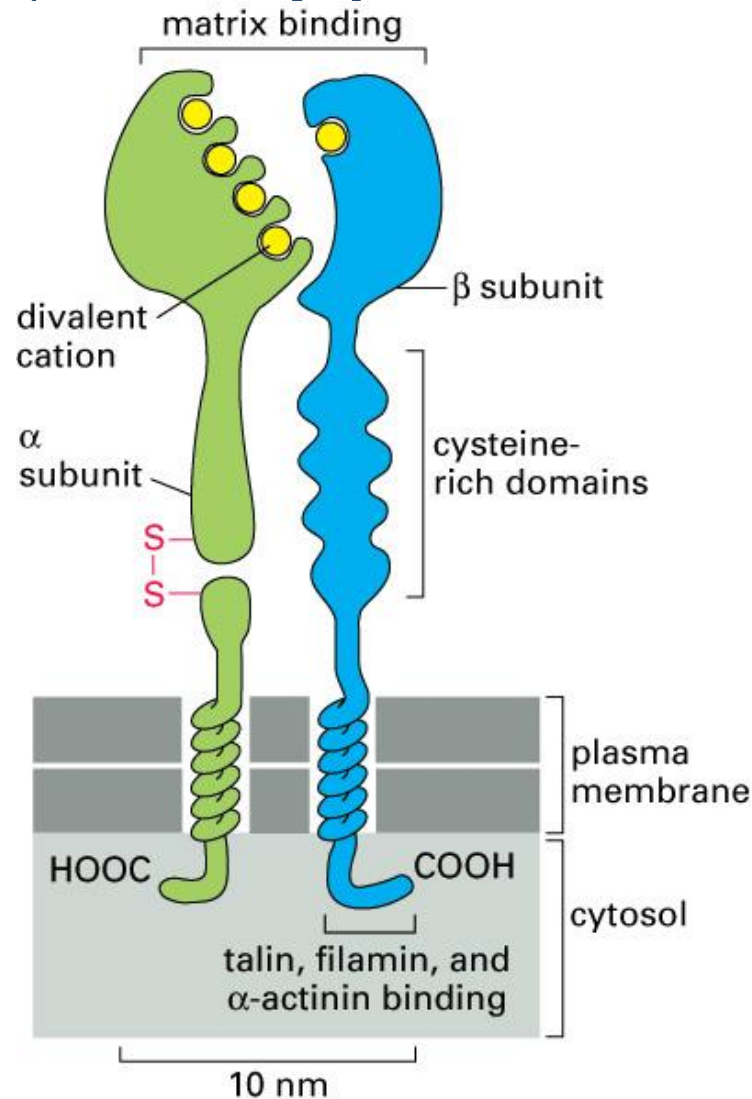


Figure 19–64. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Fokální adheze

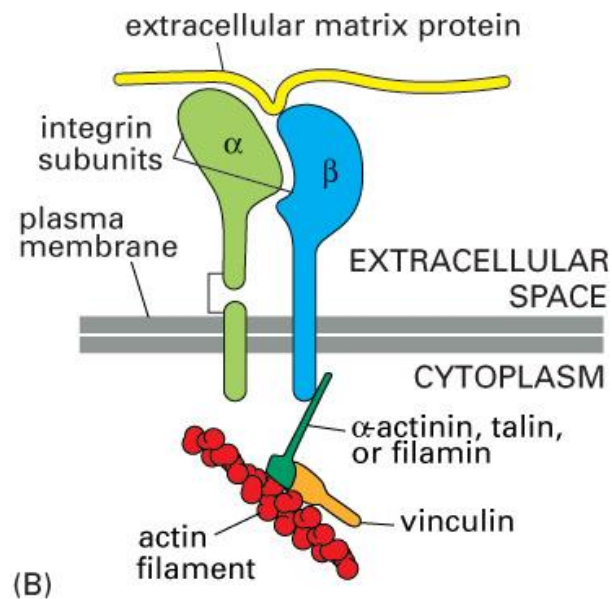
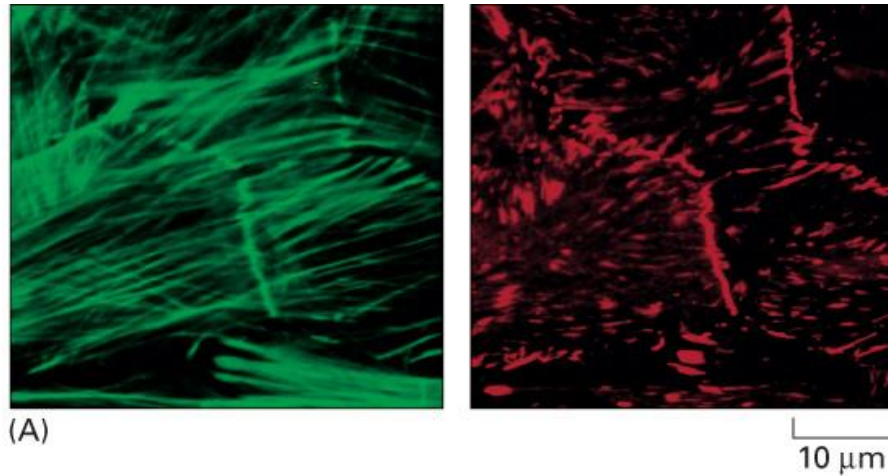


Figure 19–12. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Regulace mimobuněčné vazebné aktivity integrinu zevnitř buňky

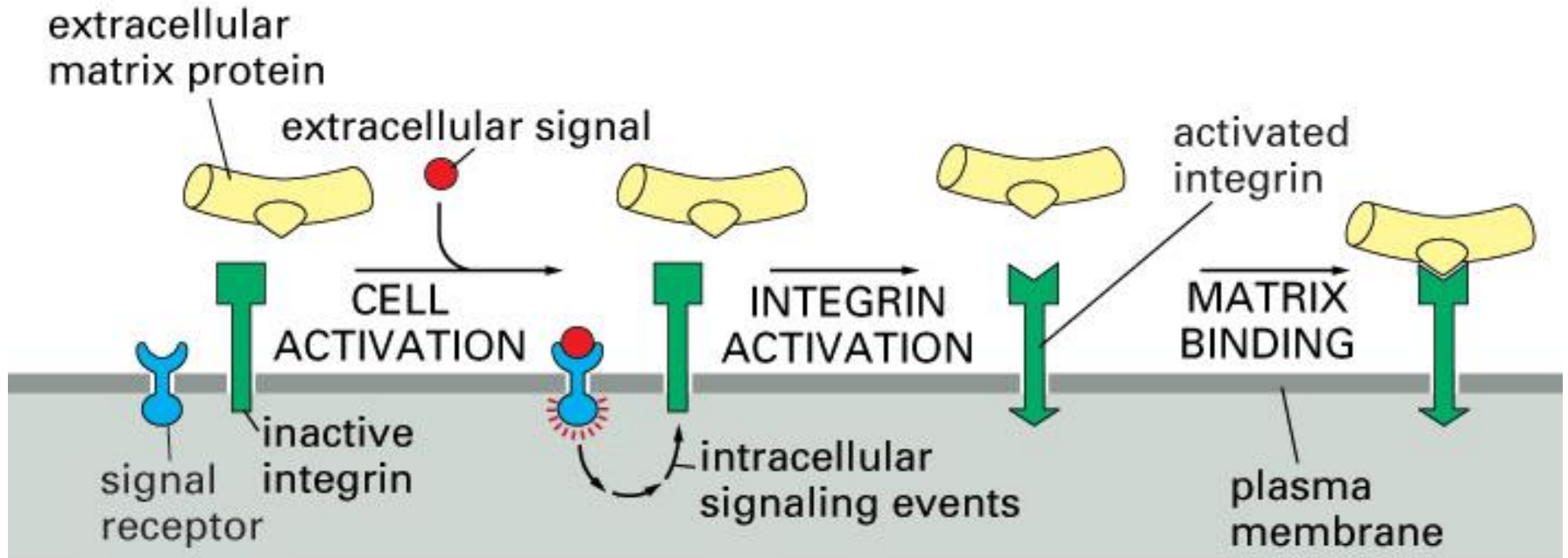


Figure 19–65. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



# Desmosomy a hemidesmosomy

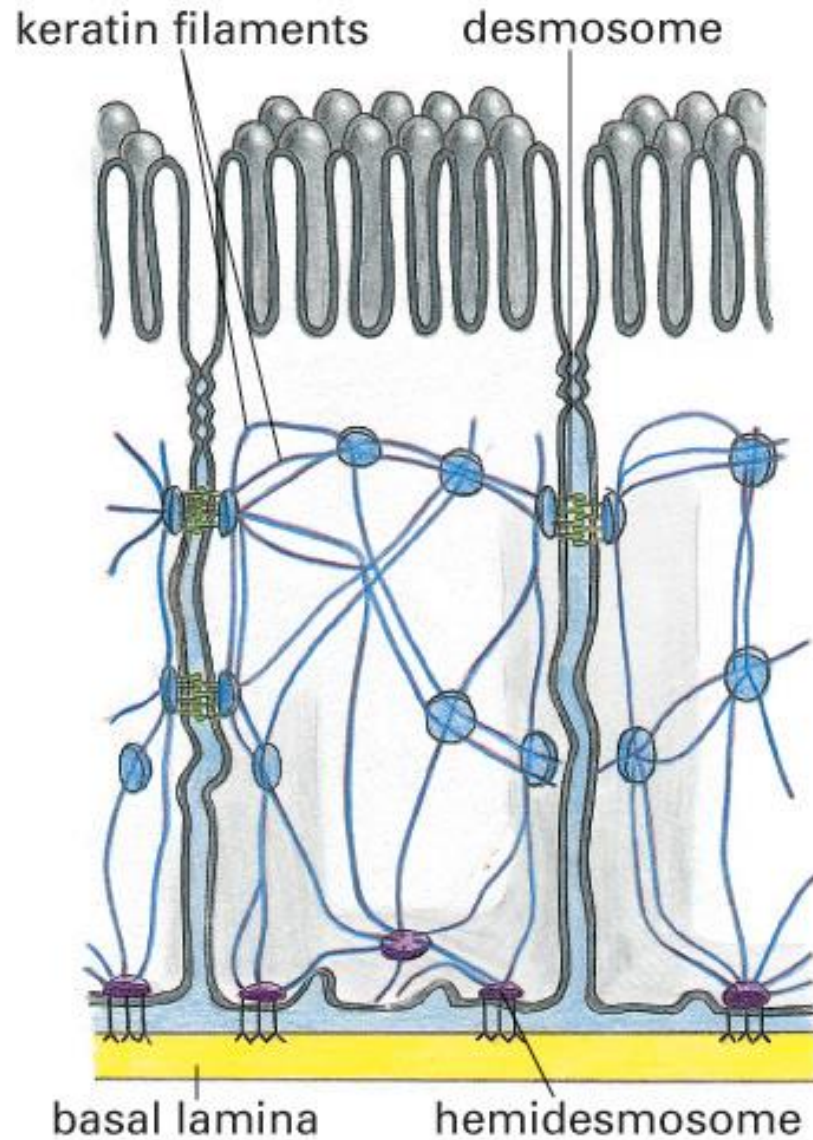


Figure 19–13. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# GAP JUNCTIONS - mezerovitá spojení

gap junctional intercellular communication (GJIC)

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

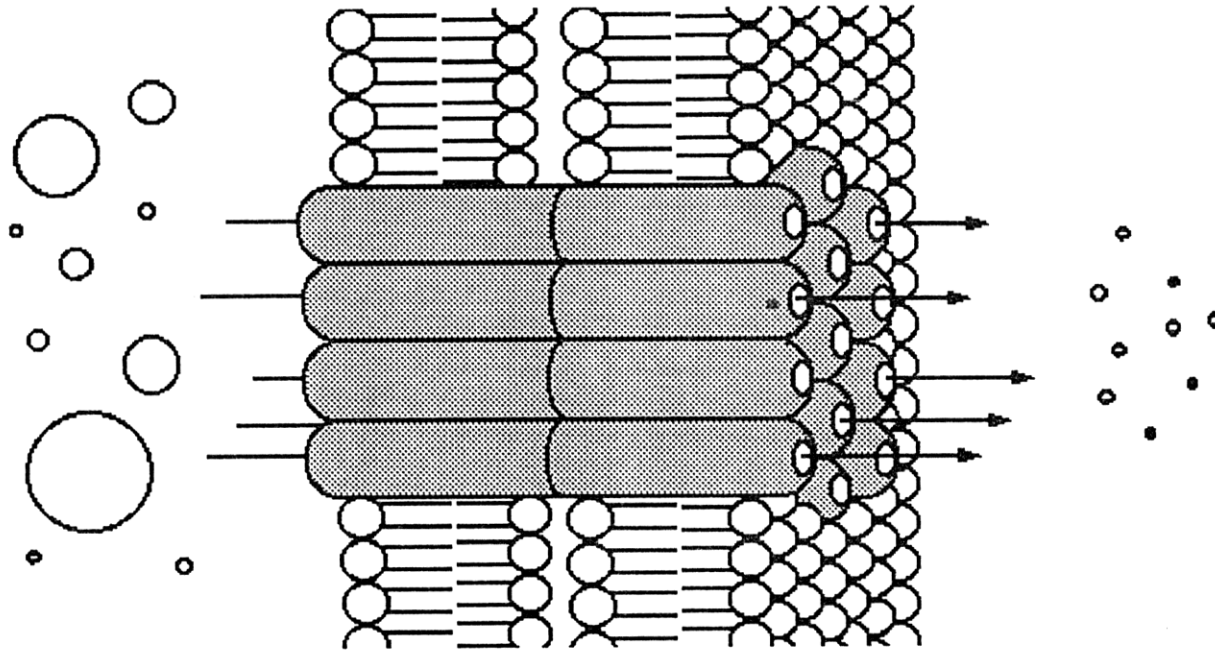
Krátký poločas života (několik hodin), rychlá biosyntéza a degradace, reakce na změny fyziologických podmínek

6 molekul konexinů tvoří konexon.

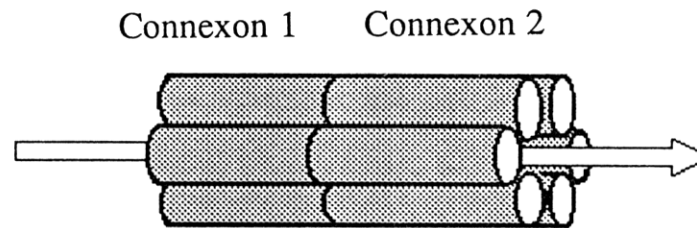
Konexony sousedních buněk se spojují v kanálek překlenující mezeru (gap) 2-4 nm propustnou jen pro malé molekuly. Permeabilita je regulována. Otevírání a zavírání závislé např. na pH, konc. divalentních iontů.

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

# Model gap junctions



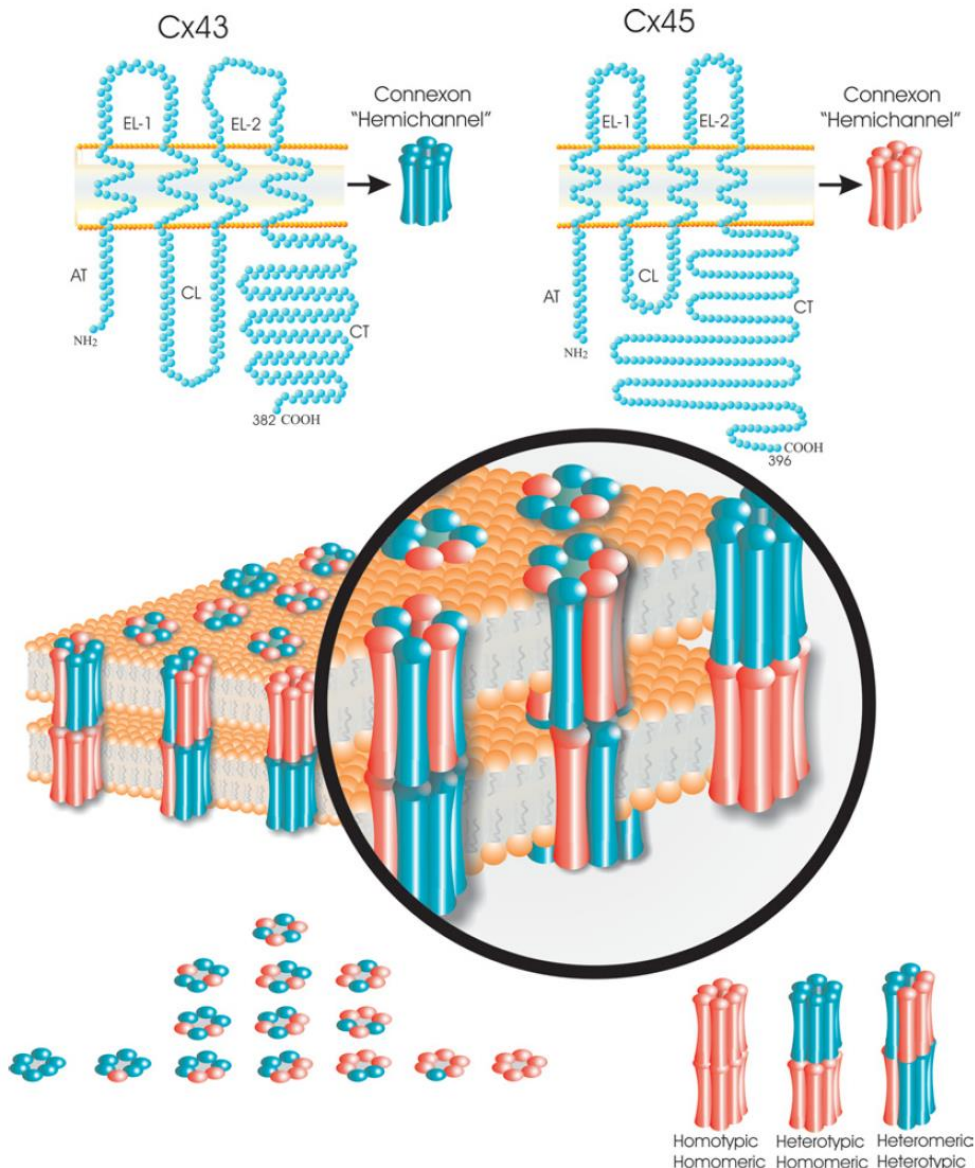
Small ions and molecules pass through gap junction channels, but macromolecules cannot.



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.

# Příklad členů konexinové rodiny Cx43 a Cx45

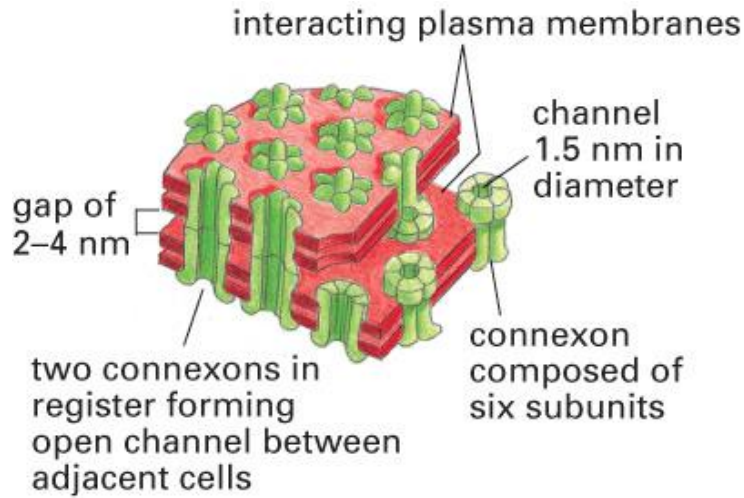


4x prochází membránou a tvoří vnější smyčky a vnitřní konce v cytoplasmě.

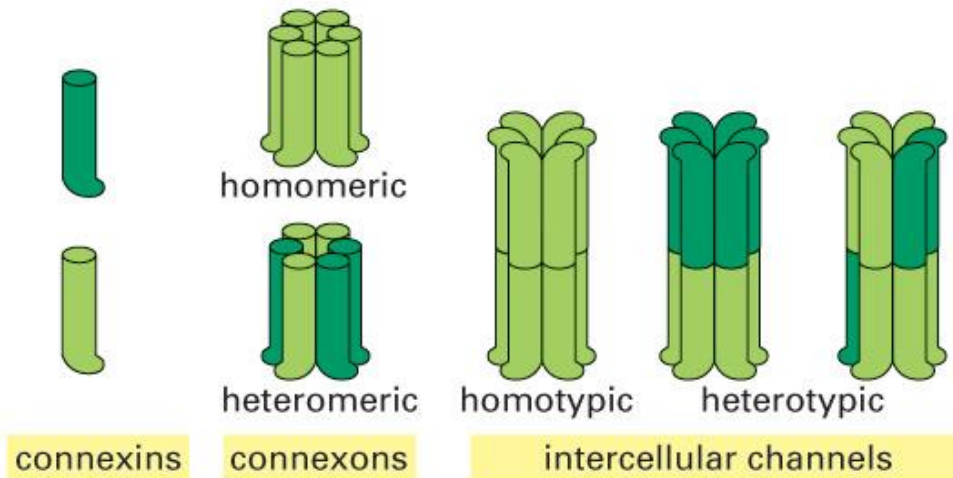
6 konexinů oligomerizuje do konexonu nebo kanálu, který má homo-, hetero- nebo kombinovanou strukturu – až 14 možností různého uspořádání konexonu ze 2 členů rodiny Cx



# Gap junctions



(A)



(B)

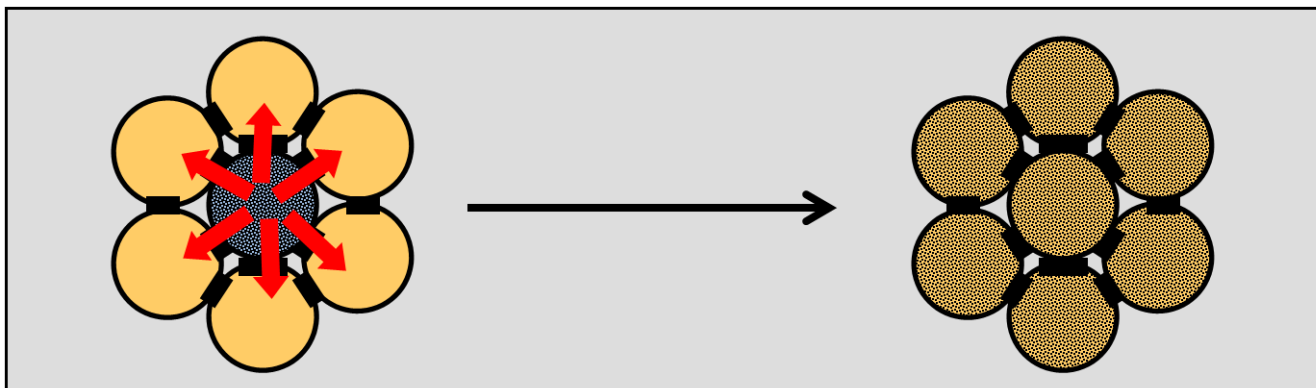
Figure 19-15. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Fyziologická úloha GJIC

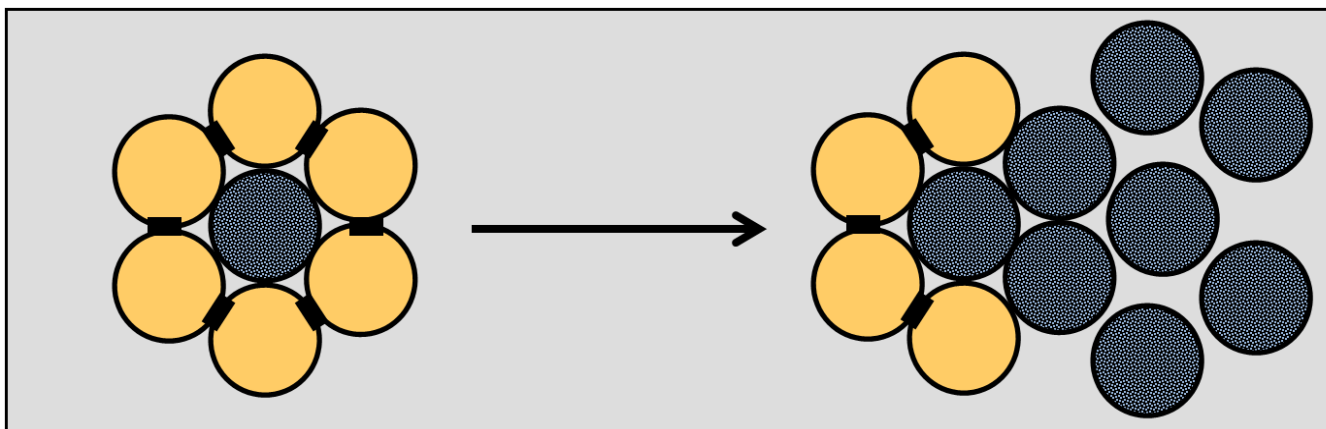
- **HOMEOSTÁZA**  
rychlá rovnováha živin, iontů a tekutin
  - **ELEKTRICKÁ SPOJENÍ**  
slouží jako el. synapse u neuronů, buněk hladkého svalstva, srdečních myocytů
  - **TKÁŇOVÁ ODPOVĚĎ NA HORMONY**  
druzí poslové ( $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, ceramid, IP3) procházejí ze stimulovaných buněk dále - šíření signálů v buněčných 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, diferenciací, apoptózy a adaptivní odpovědi



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

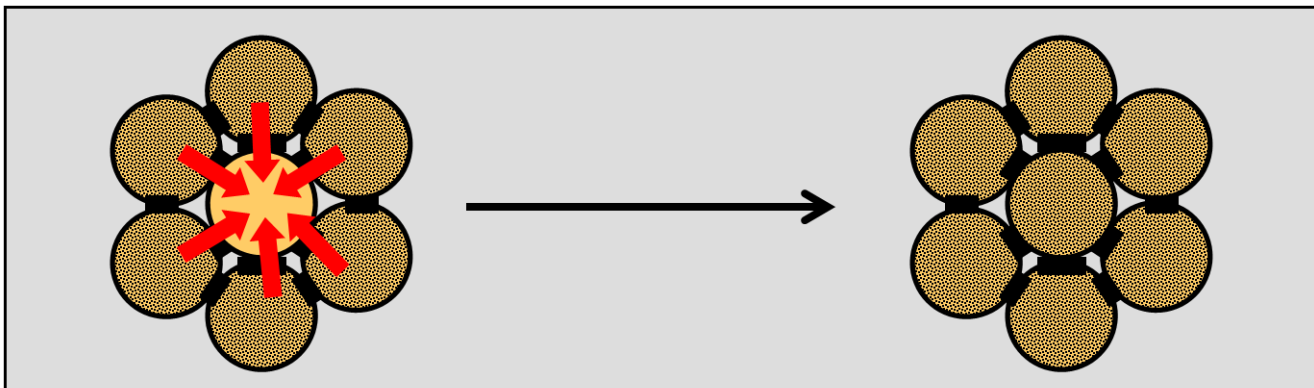


Růstově stimulační signál difunduje do sousedních buněk přes GJ a dosahuje substimulační úrovně

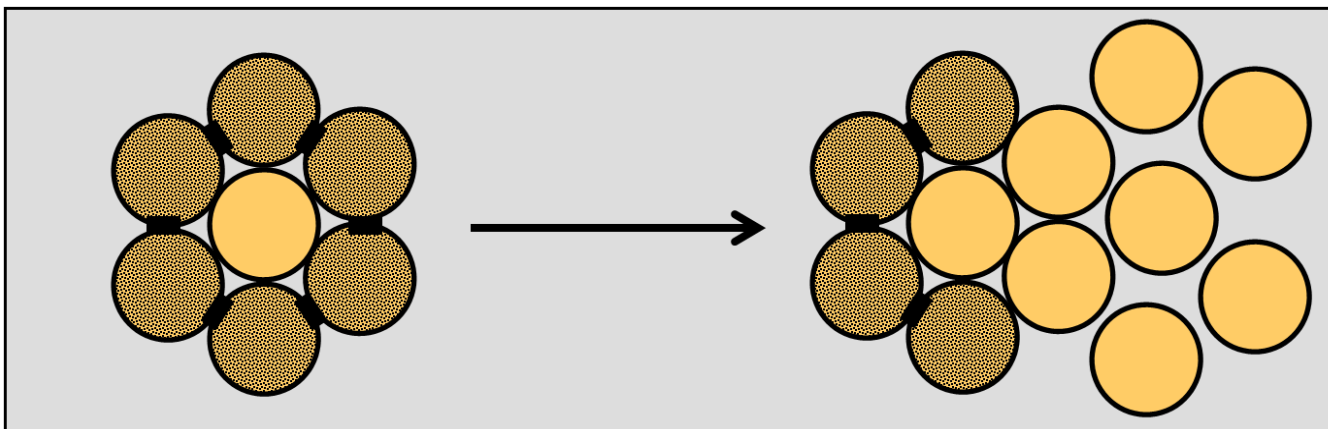


K difúzi signálu nedochází u buněk postrádajících GJ a je zahájeno buněčné dělení

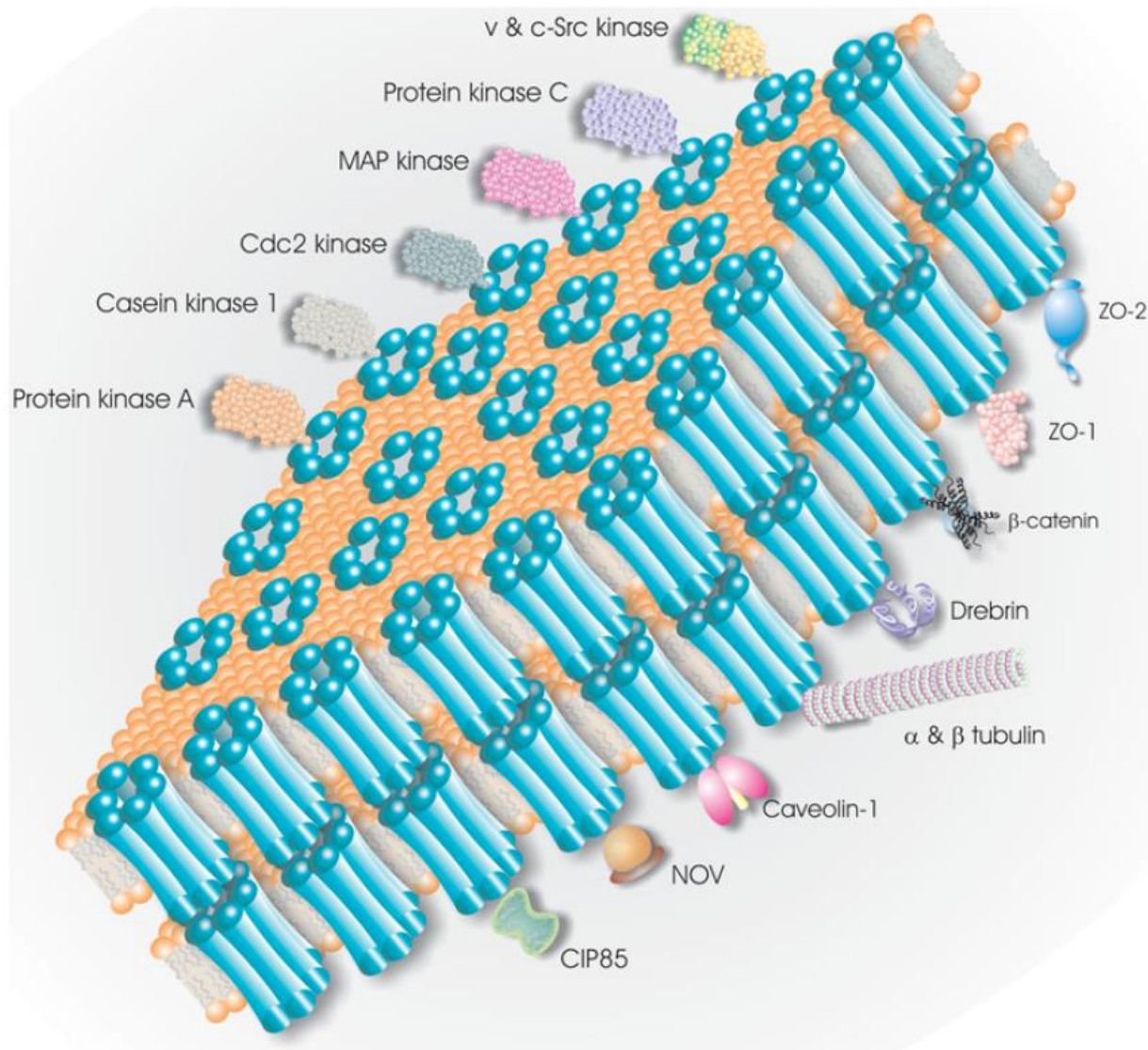
# Model růstové kontroly prostřednictvím gap junctions (GJ) - Růstově inhibiční signál



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



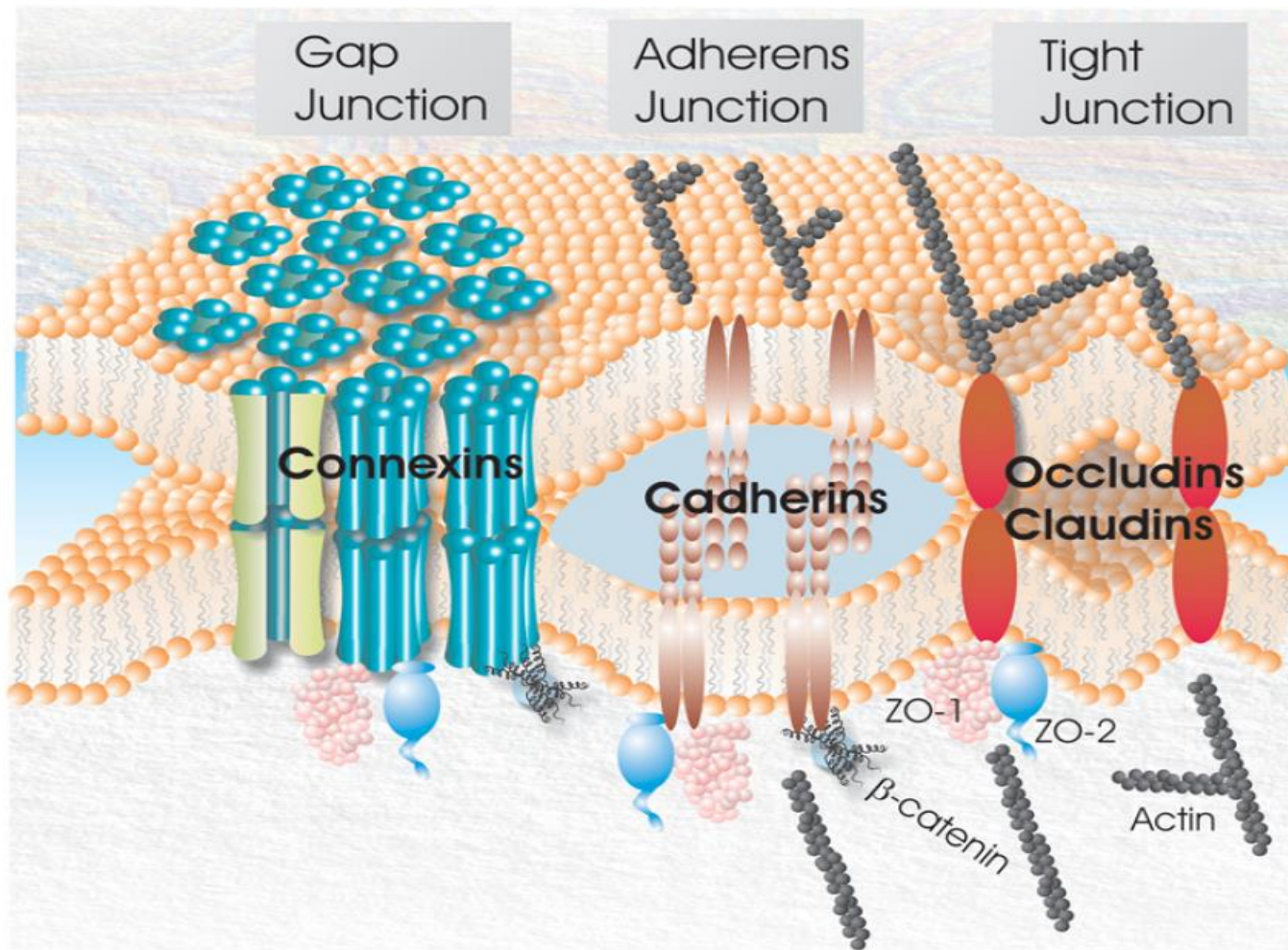
Signál se nešíří do buněk postrádajících GJ a dochází k buněčnému dělení



Proteinové kinázy, které fosforylují Cx43. Kromě nich existuje řada dalších proteinů s přímou či nepřímou vazbou na Cx.

Laird D.W. Biochem J, 394:527, 2006





GJ tvořené konexiny, adherentní spoje tvořené kadheriny a TJ tvořené okludiny a klaudiny jsou u epiteliálních buněk v těsné blízkosti a sdílí vazebné proteiny, které je napojují na aktin a mikrofilamenta. Vazebné proteiny (beta-catenin, zonula occludens, ZO-1,-2) tak umožňují "cross-talk" mezi třemi spojovacími komplexy a jsou řízeny některými společnými regulačními ději.

# Extracelulární (mimobuněčná) matrix (ECM)

ECM může ovlivňovat tvar, přežití a proliferaci buněk. Existují reciproční interakce mezi ECM a cytoskeletonem. 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:

- **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

- **Vláknité proteiny** – kolagen, elastin, fibronectin, laminin – strukturální a adhezivní funkce

# Proteolytická – antiproteolytická rovnováha

## Degradace komponent ECM

Kooperativní aktivita systému proteolytických enzymů:

- Lyzozomální proteázy (aspartyl a cystein proteázy – katepsiny)
- Serinové proteázy – plasminogen, plasminogenové aktivátory (PA)
- Metalloproteinázy

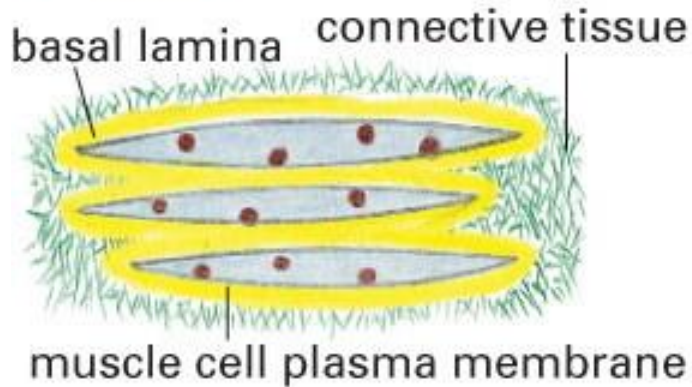
**Plasminogenové aktivátory** - přeměňují plasminogen na plasmin. Plasmin degraduje různé složky ECM včetně fibrinu, fibronektinu, lamininu atd. Plasmin také aktivuje několik typů metalloproteínáz.

**Rodina metalloproteínáz (MMP)** - asi 16 členů, většina jsou rozpustné sekretované enzymy nebo transmembránové proteiny schopné digesce ECM nebo komponent bazální membrány. Různé typy podle struktury a substrátové specifity (kolagenázy, gelatinázy, stromelysiny). **PA a MMPs jsou sekretovány spolu se svými inhibitory** (za normálních podmínek nízká hladina), což zajišťuje přísnou kontrolu lokální proteolytické aktivity a je tak zachována normální struktura tkání.

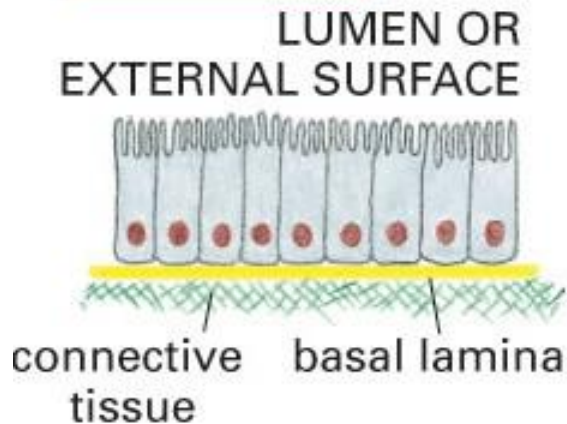


# Tři způsoby organizace bazální laminy

## MUSCLE



## EPITHELIUM



## KIDNEY GLOMERULUS

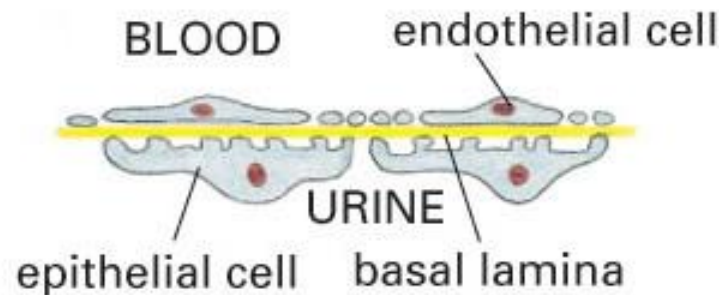


Figure 19–55. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Souhrn spojovacích a nespojovacích adhezívnych mechanizmů vazby savčích buněk navzájem a s ECM

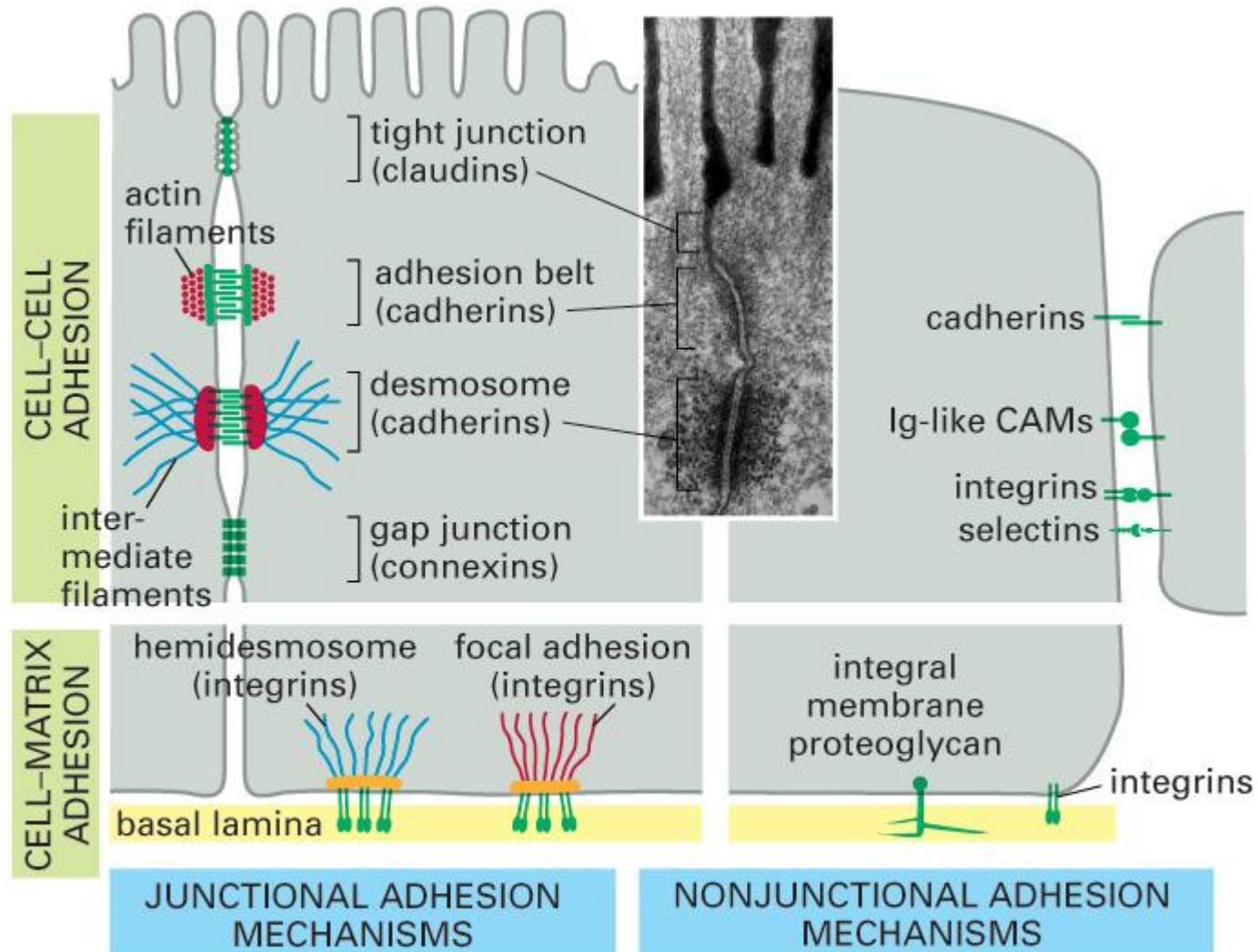


Figure 19-32. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Souhrn různých buněčných spojení nalezených u epitelálních buněk obratlovců

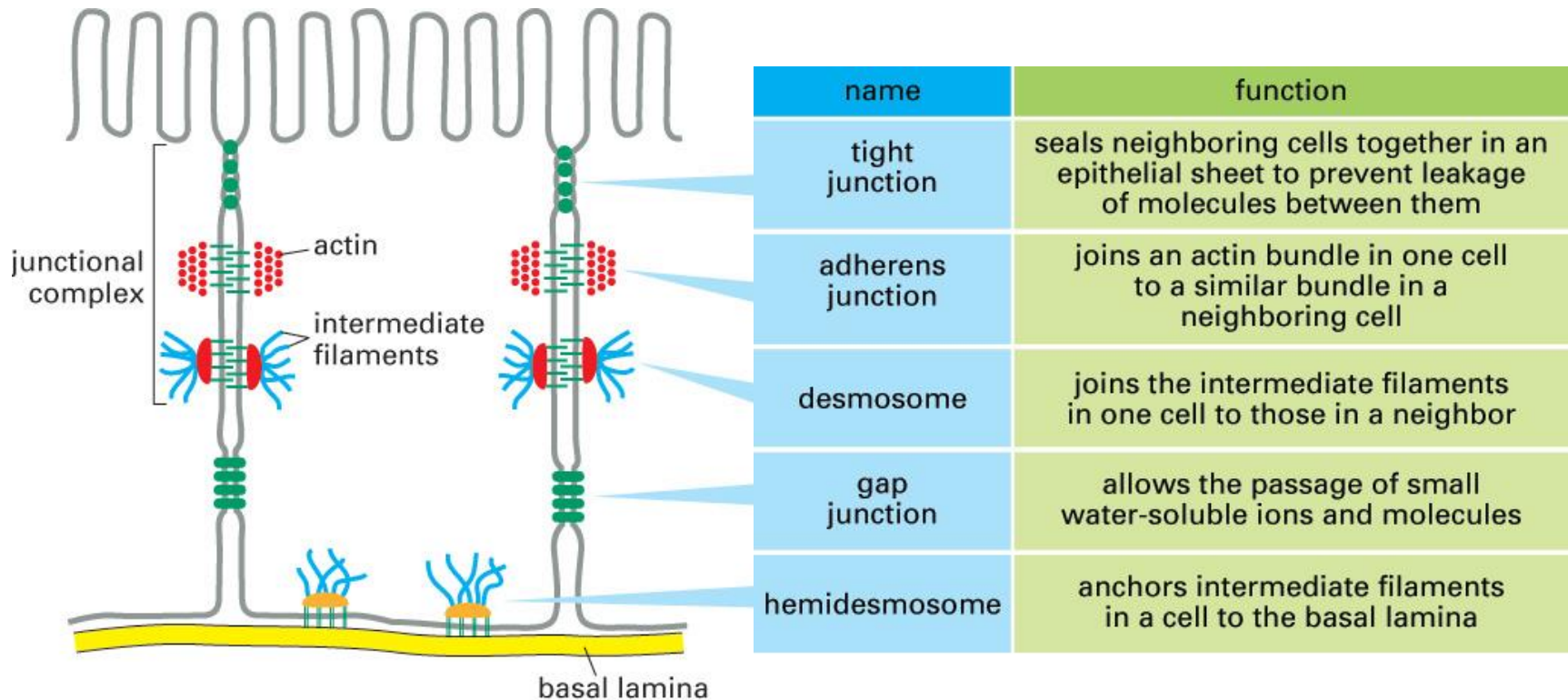


Figure 19-19 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.