

5 Regulace buněčné adheze a polarity

prof. Mgr. Vítězslav Bryja, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PřF MU

Buněčná adheze

CO JE TO BUNĚČNÁ ADHEZE?

- Fyzická interakce buňky s extracelulární matrix nebo mezi dvěma buňkami navzájem.
 - U adhezí rozlišujeme:
 - Dobu/sílu interakce (tranzientní vs. stabilní)
 - Typ molekul, které adhezi zprostředkují (cadheriny, integriny, jiné...)
 - Funkci adheze (signalizace, pohyb, mechanotransdukce, transport, izolace)

ORGANIZACE BUNĚČNÝCH SPOJŮ - JEDNOVRSTEVNÝ EPITEL

Těsné spoje

- spojují membrány sousedících buněk
- hlavní funkce je izolační, není u všech epitelů
- claudiny, occludin

Kotvící spoje – zajišťují propojení s cytoskeletem (mechanické vlastnosti)

- A. mezibuněčné – zprostředkované kadheriny
1. adhezní spoje – s aktinovým c.
 2. desmozomy – s intermed. fil.
- B. buňka k ECM – zprostředkované integriny
- A. fokální adheze – s aktinovým c.
 - B. hemidesmozomy – s intermed. f.

Vodivé spoje – gap junctions

- umožňují intercelulární transport malých rozpustných molekul (do 1,5 kDa)

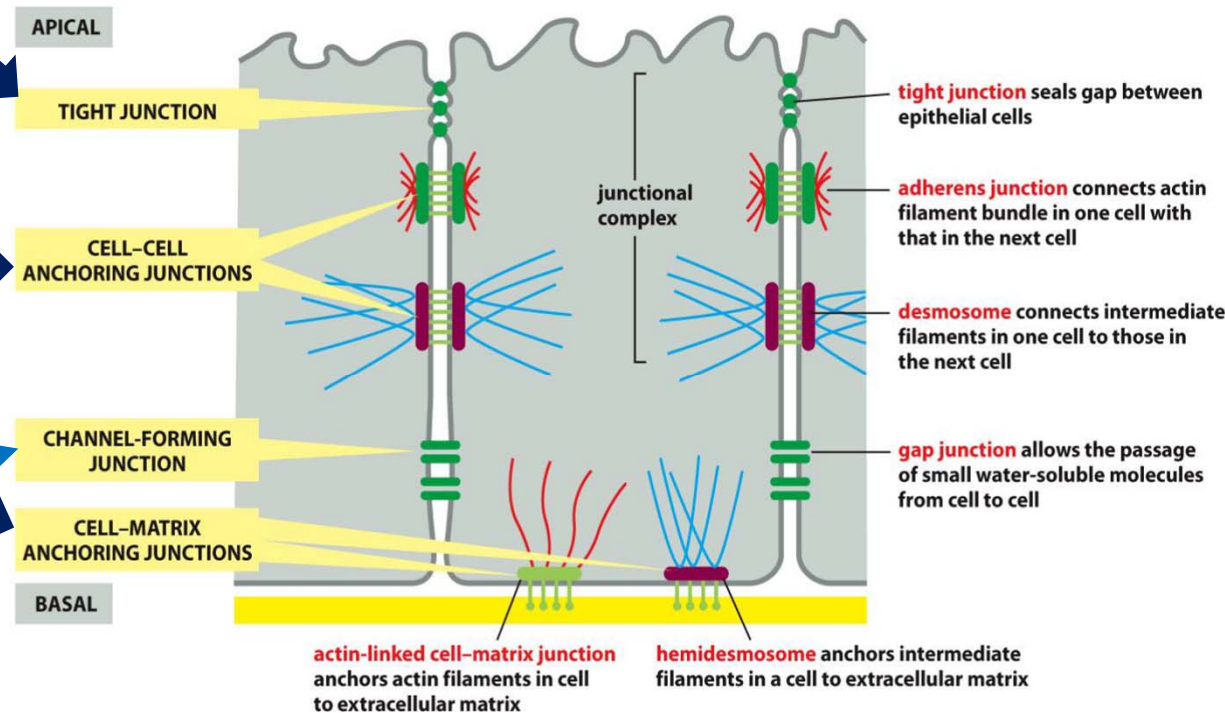
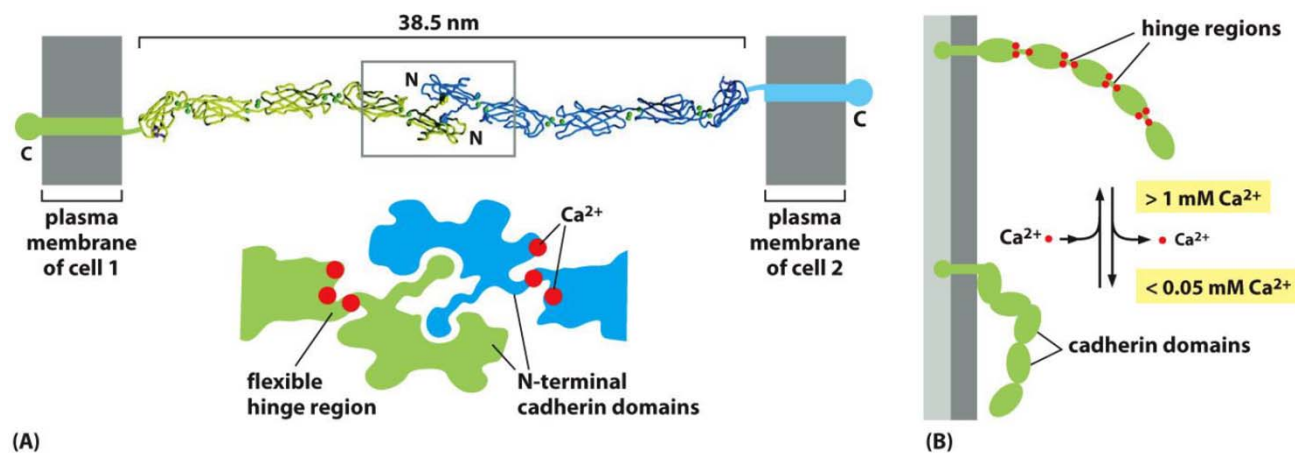


Figure 19-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Kadheriny a jejich regulace

KADHERINY

- Velká rodina proteinů, obsahujících více tzv. kadherinových domén
- Extracelulární Ca^{2+} (**Cadherin**) je vyžadován jako kofaktor pro vazbu mezi N-terminálními doménami
- Vazba je tzv. **homofilní** (vazebním partnerem je pouze jiný kadherin)
- Klasické kadheriny (propojení s aktin. filamenty): E, N, P-cadherin
- Desmozomální (propojení s interm. filamenty): desmogleiny, desmocolliny
- Protokadheriny (mnoho, různé funkce) – např. Fat (buň. polarita)
- Nekonvenční kadheriny (další) – např. CELSR/Flamingo, T-cadherin



- Klasické kadheriny mají do 5 kadherinových domén, neklasické mohou mít až 30.
- Kadheriny se také velmi liší ve svých intracelulárních doménách:
 - Flamingo/Celsr má 7 transmembránových domén, čímž se podobá GPCR receptorům
 - T-cadherin je v membráně zakotvený pouze glykosylfosfatidylinositolovou kotvou

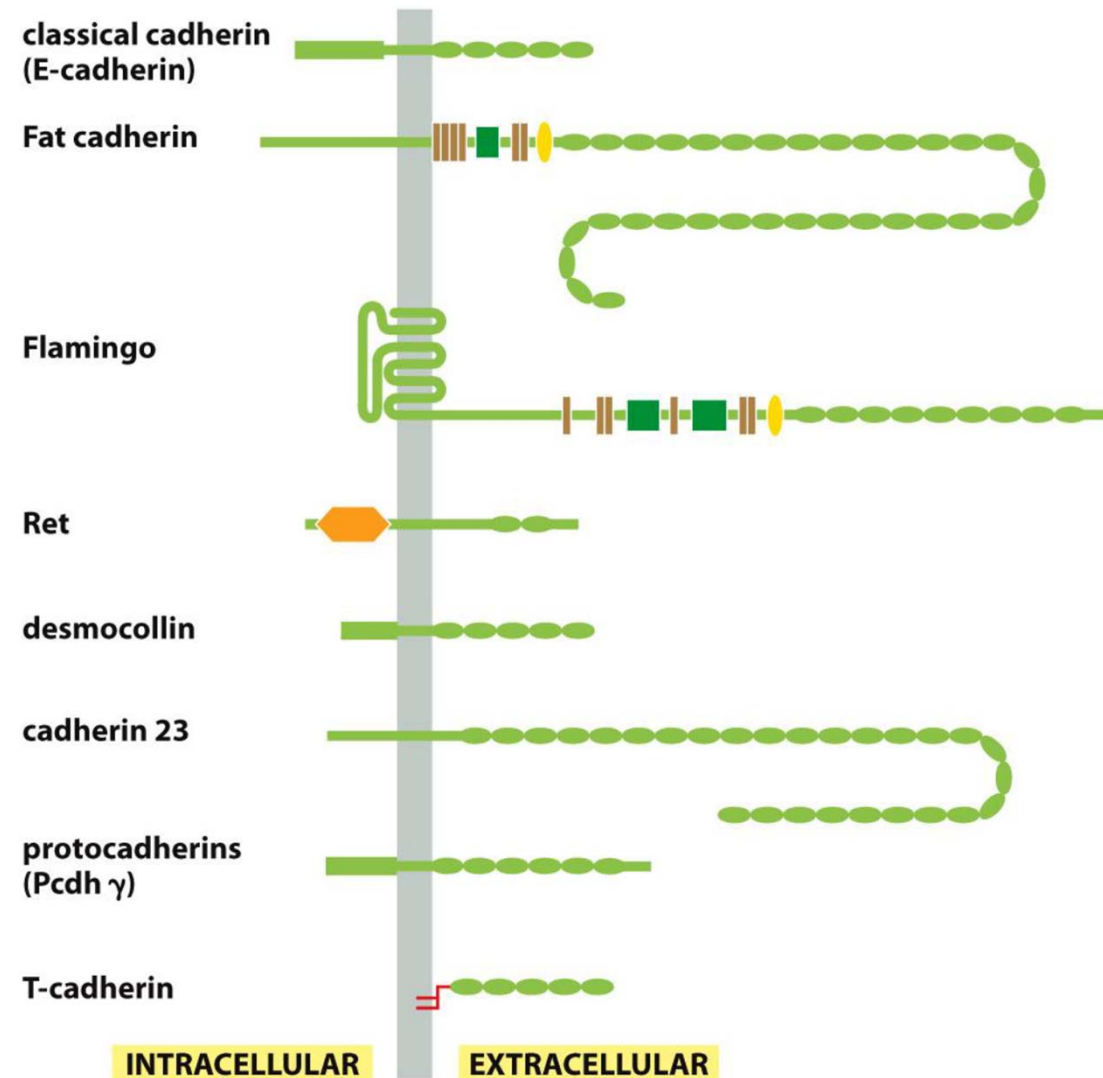


Figure 19-4 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

PROPOJENÍ KLASICKÝCH KADHERINŮ S CYTOSKELETEM

Propojovací komplex tvoří 3 vrstvy:

1. Signalling layer (SL)

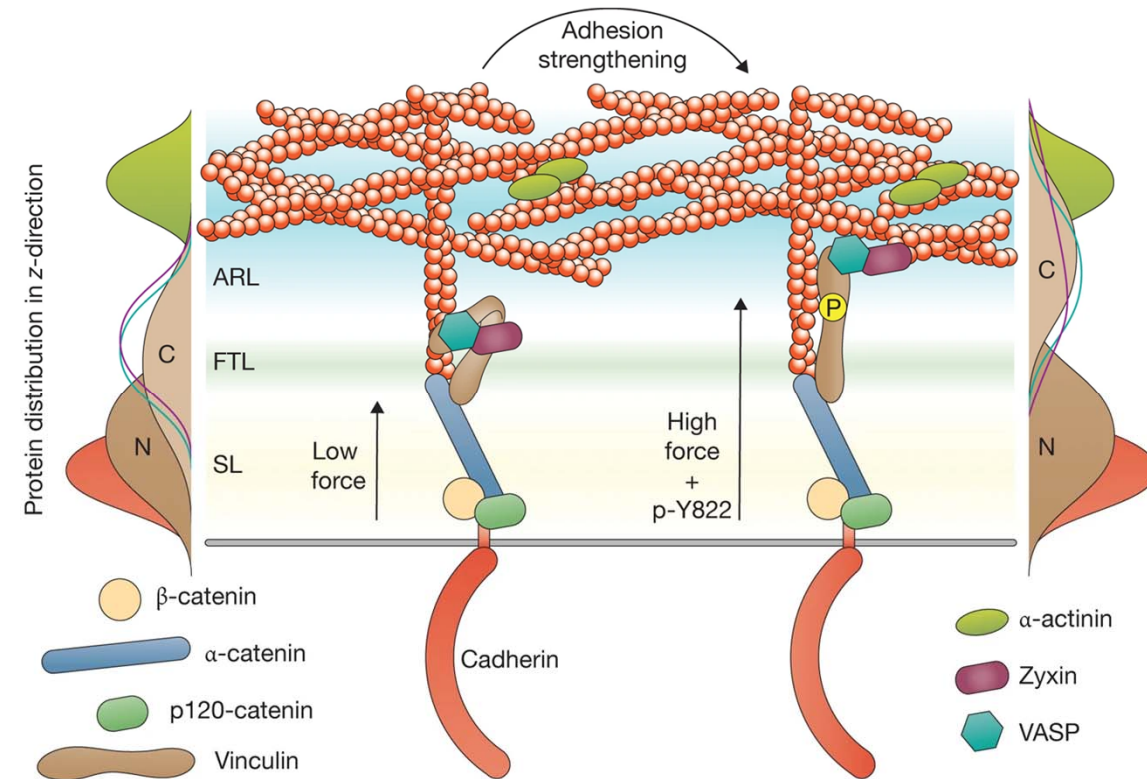
- β - a p120-catenin
- Adaptérové molekuly nezbytné pro aktivaci kadherinu

2. Force-transduction layer (FTL)

- α -catenin, vinculin
- Zvýšení tenze adheze vede k fosforylaci vinculinu a změně jeho konformace (rozbalení), aktivaci a přenosu specifických aktinových regulátorů do vrstvy aktinového kortexu (VASP, zyxin) a jeho přestavbě. Výsledkem je zesílení adheze.

3. Actin regulatory layer (ARL)

- α -actinin, eplin, palladin a další...
- Vrstva aktinového kortexu s jeho regulatory schopnými modulovat jeho mechanické vlastnosti a tím regulovat pevnost a sílu adheze.



<https://www.nature.com/articles/ncb3457>

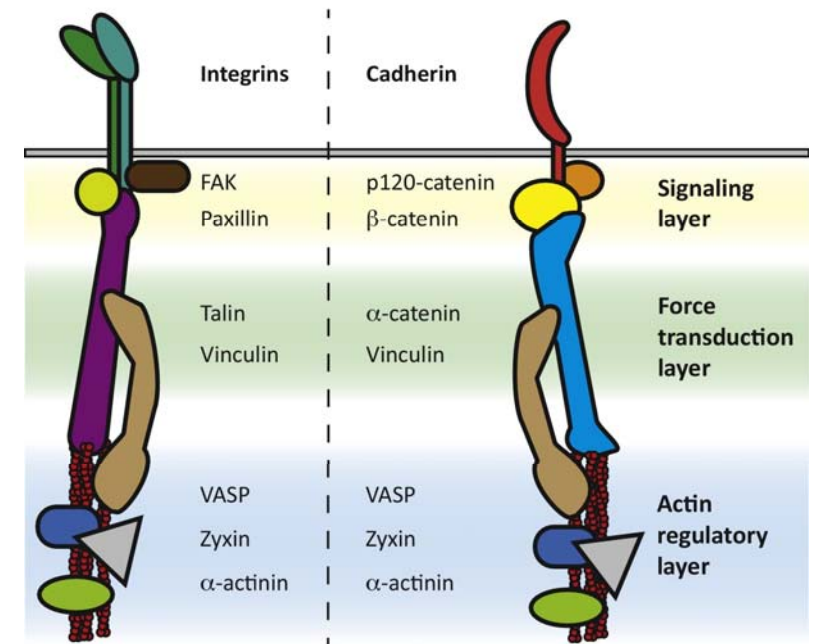
Integriny a jejich regulace

INTEGRINY

- Heterodimery - alfa a beta podjednotky (kódované zvláštními geny)
- U člověka 24 typů (18 genů pro α -podj., 8 genů pro β -podj.)
- **Heterofilní** interakce, často více ligandů
 - ECM: fibronectin, collagen, vitronectin, laminin
 - Buňky: IgCAMs (ICAM1-5, VCAM)
 - Příklad: VLA4 (integrin $\alpha4\beta1$) – váže VCAM-1 a fibronectin
- Fokální adheze (propojené s aktinovým cyt.) – různé integriny
- Hemidesmosomy (propojené s AF) - integrin $\alpha6\beta4$
- Integriny dokáží signalizovat dovnitř i ven z buňky

PROPOJENÍ INTEGRINŮ S AKT. CYTOSKELETEM

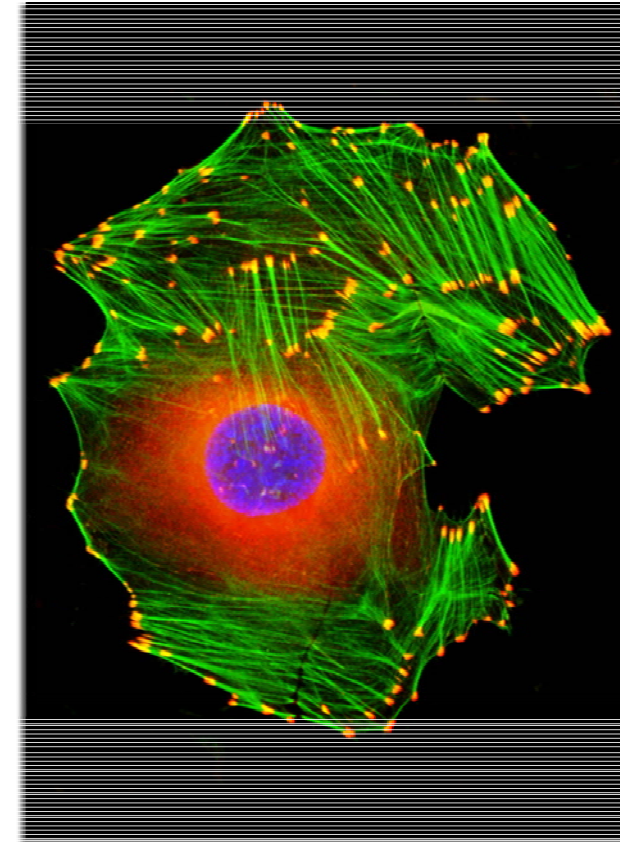
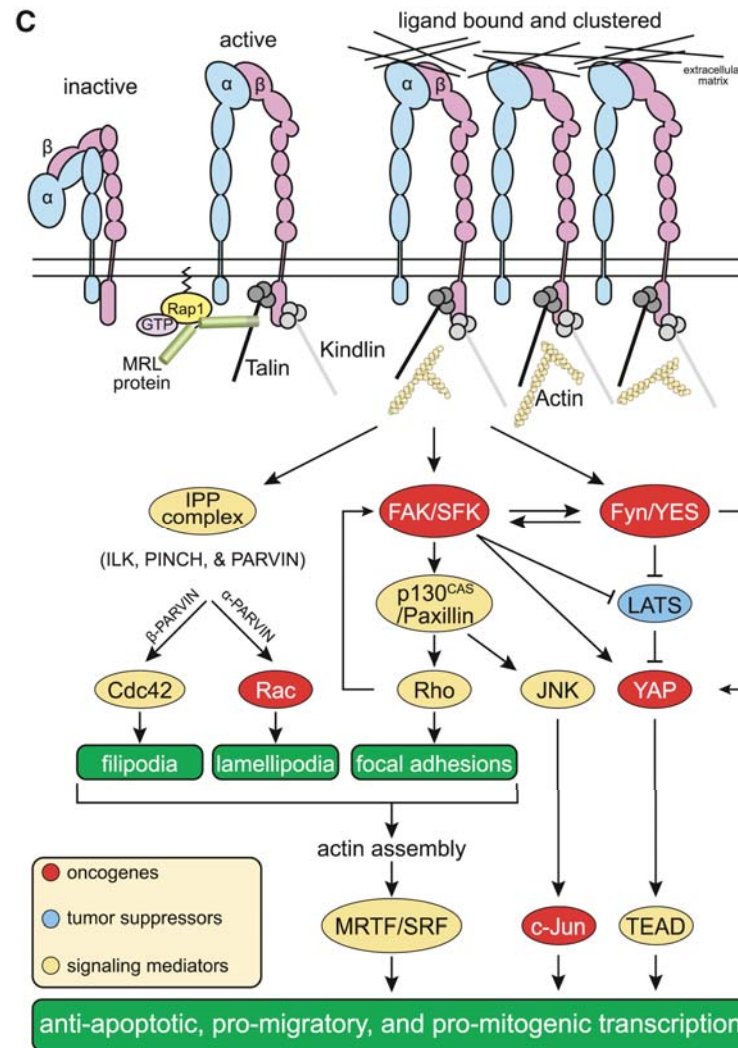
- Propojovací komplex tvoří podobné funkční oblasti jako u kadherinů a využívá totožné distální proteiny, významě se od nich však liší v proximální (signální) části komplexu
- Kinázy FAK (focal adhesion kinase) a Src – integrinová signalizace
- Klíčovým propojovacím proteinem je zde talin



Trends in Cell Biology

- Integriny regulují buněčnou morfologii a migraci
- Mají onkogenní potenciál!
- Fokální adheze: místa clusterování a aktivace integrinů; klíčová role FAK (focal adhesion kinase) a kináz z rodiny Src (SFK – Src family kinases)

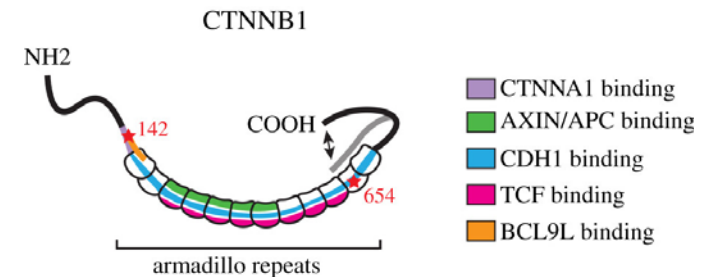
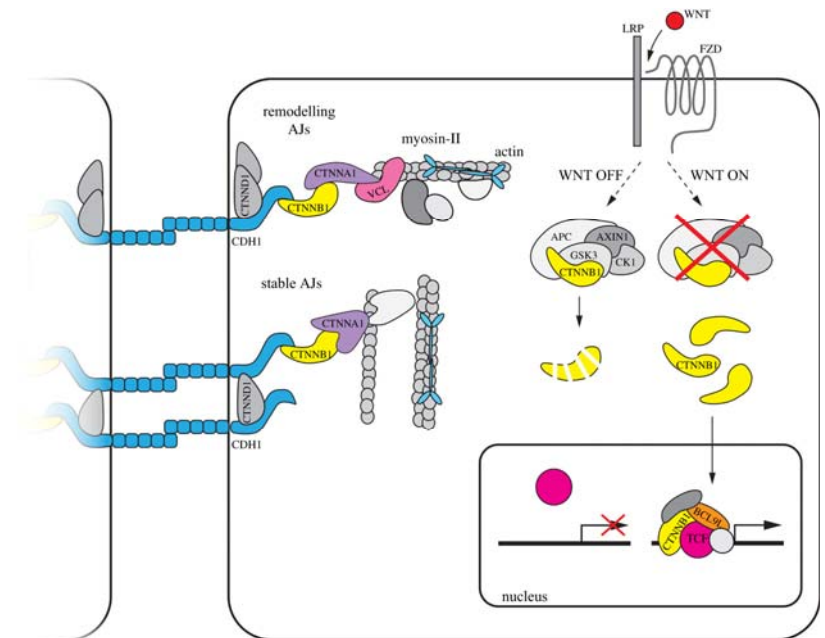
INTEGRINOVÁ SIGNALIZACE



<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.007>
<https://www.nature.com/articles/s41580-019-0134-2>

ADHERENS JUNCTIONS JAKO REZERVOÁRY SIGNÁLNÍCH MOLEKUL?

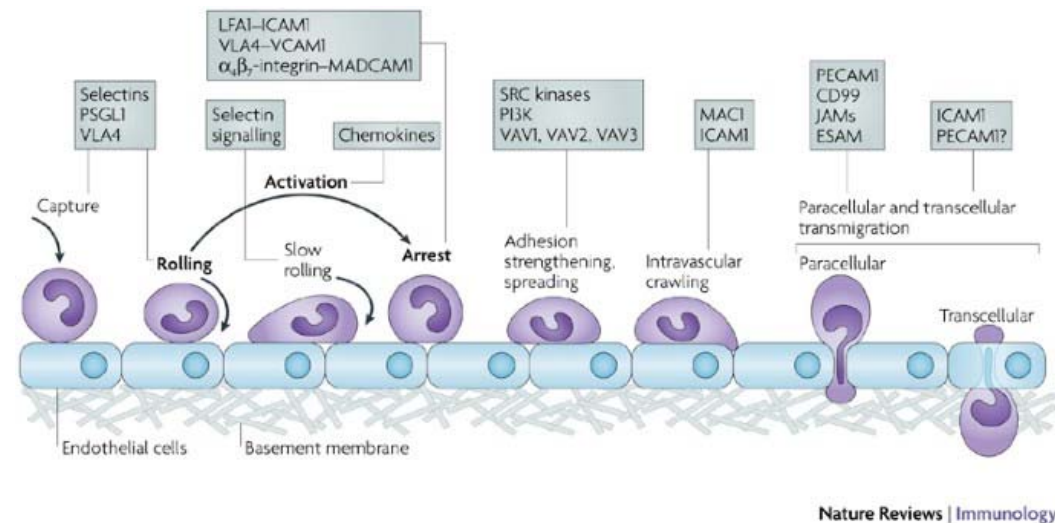
- Příklad β -katenin
 - 2 rezervoáry v epiteliálních buňkách: v AJs (kadherinový linker) a cytoplasmatické (Wnt signalizace)
 - Funkce kadherinové vazby je evolučně starší
 - oba rezervoáry nelze snadno rozlišit, dosud nebyla identifikována žádná posttranslační modifikace, která by je identifikovala
 - V průběhu evoluce nedošlo k oddělení obou funkcí duplikací genů, jak bylo pozorováno v jiných případech
 - Experimentální důkazy o propojení obou poolů



Molekuly přechodných adhezí a ERM komplex

MOLEKULY PŘECHODNÝCH ADHEZÍ

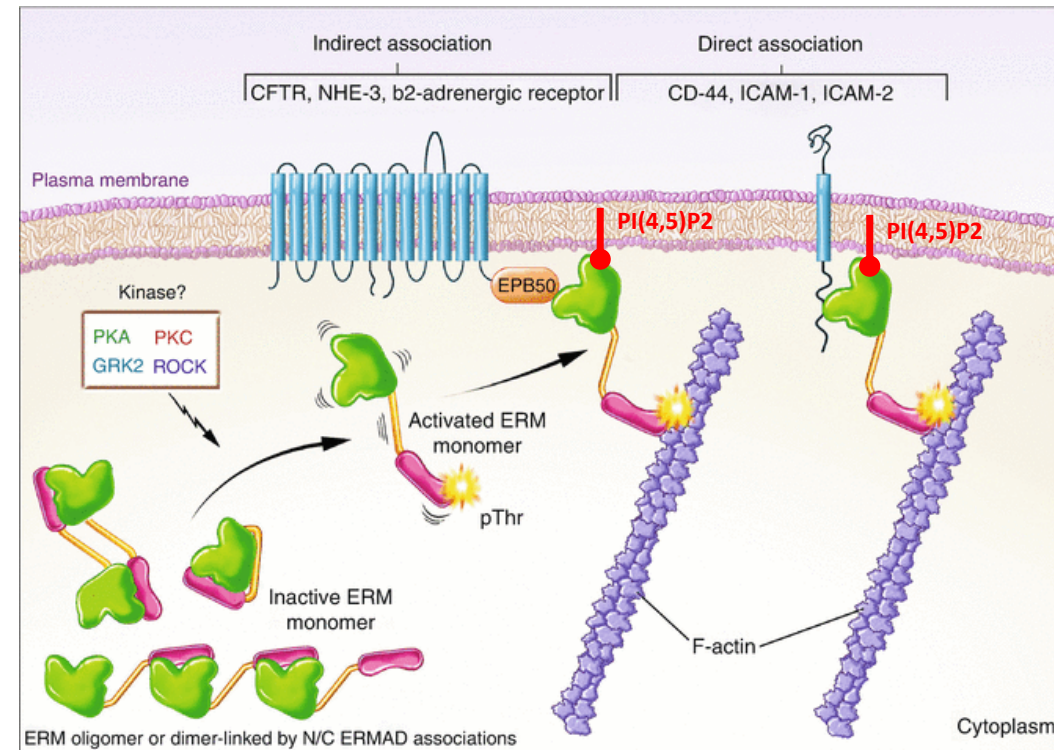
- Immunoglobulinové adhezní molekuly
 - Obsahují imunoglobulinové domény, homofilní i heterofilní interakce
 - Některé slouží jako ligandy integrinů.
 - Př. ICAMs (intercellular adhesion molecules), VCAM (vascular), NCAM (neural), PECAM (platelet endothelial)
- Selektiny
 - Váží sacharidové skupiny na površích jiných buněk
 - Konzervovaná extracelulární lektinová doména (**selektiny**), ovšem velmi rozdílné intracelulárně
 - Především na krevních buňkách a endotelu – např. důležité při rolování lymfocytů po povrchu kapiláry
 - L (leukocyte), E-(epithelial), P-selektin (platelet)



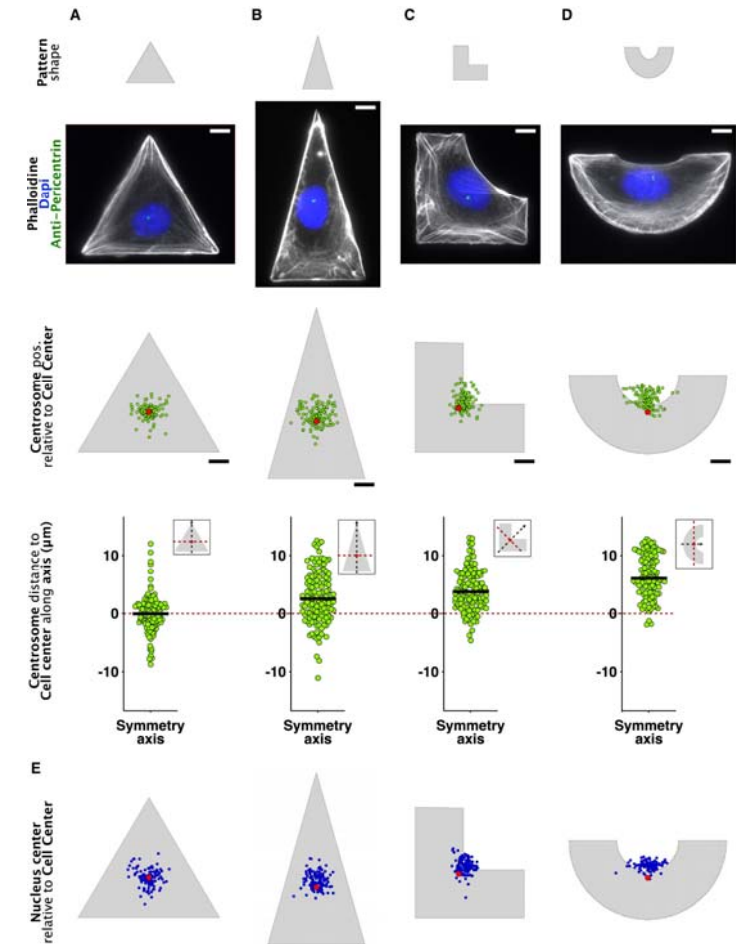
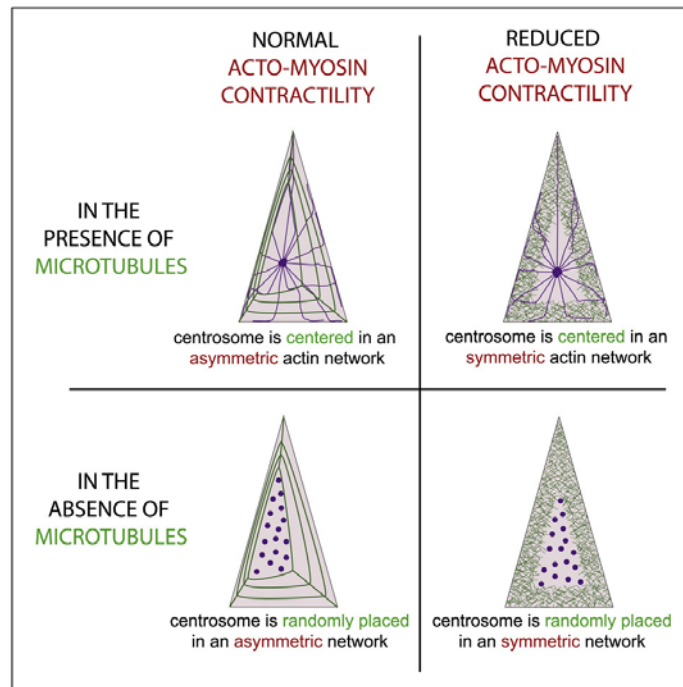
Nature Reviews | Immunology

RODINA PROTEINŮ EZRIN-MOESIN-RADIXIN (ERM)

- Propojuje s aktinovým cytoskeletem celou řadu membránových molekul, včetně většiny IgCAMs, L-selektinu aj. (CD44, EGFR, CRB)...
- Mají podobnou strukturu:
 - N-terminální FERM doména - váže cílovou molekulu/EBP50 a PI(4,5)P2
 - Centrální helikální doména
 - C-terminální doména (C-ERMAD) – váže aktin
- Fosforylace uvolňuje interakci mezi FERM a C-ERMAD, čímž aktivuje ERM protein a umožňuje jeho vazebnou aktivitu a interakci s b. membránou
- Mezi aktivující kinázy ERM protein patří např. různé PKC (Ca²⁺ signalizace), ROCK (RhoA efektor)
- ERM proteiny linkují membránové molekuly přímo anebo přes EBP-50



ARCHITEKTURA AKTOMYOSINOVÉHO CYTOSKELETU URČUJE POZICI CENTROZOMU VŮČI GEOMETRICKÉMU STŘEDU BUŇKY

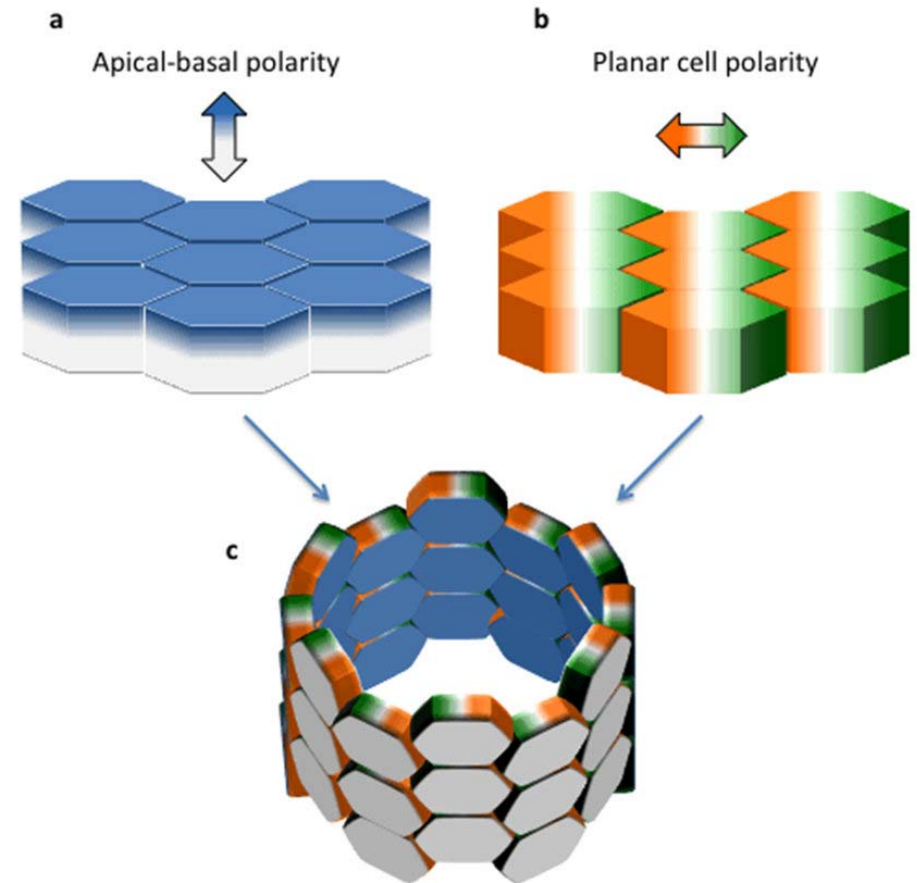


Pozice adhezí tedy určuje pozici centrosomu a s ním spojených organel (Golgiho aparát).

Epiteliální polarita

OSY POLARIZACE V EPITELU

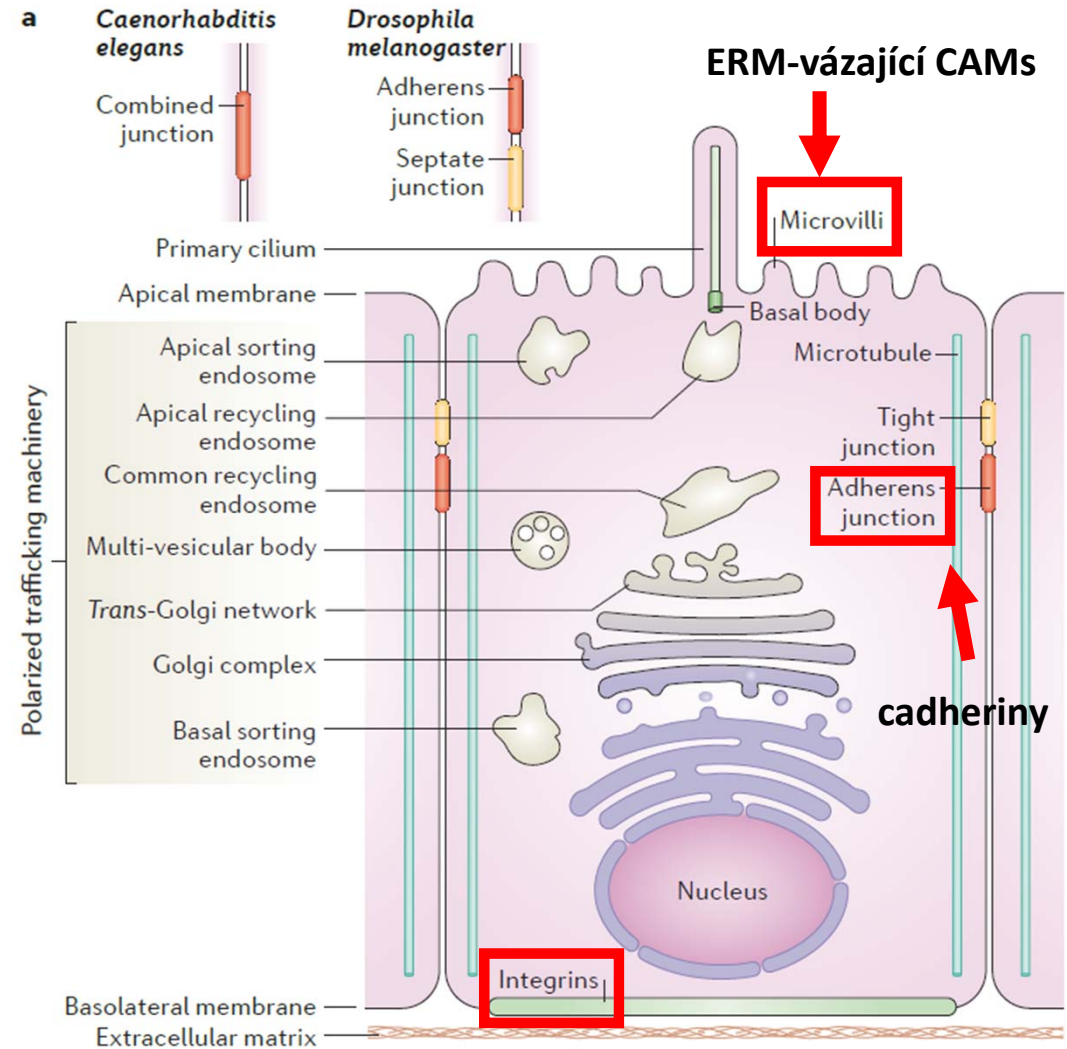
- Apikálně bazální – takřka u všech epitelů
- Planární – pokud je potřeba funkčně specifikovat směr i v rovině epitelu.



Apikobazální (AB) polarita

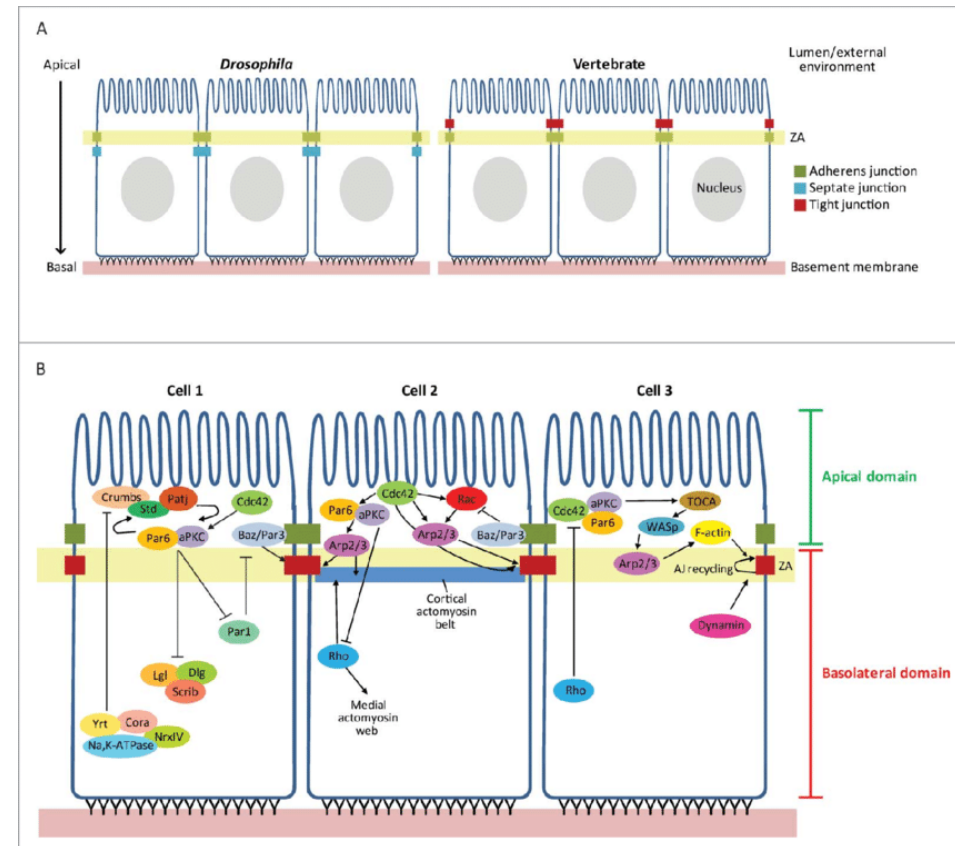
EPITELIÁLNÍ BUNĚČNÁ POLARITA

- Navzdory funkční propojenosti musí být zachována funkční polarita epiteliálních buněk:
 - Specifické molekuly musí být orientovány do lumen, zatímco jiné na rozhraní buněk a ECM, jinak epitel nemůže plnit své funkce.
- Polaritu buněk můžeme vidět
 - Na existenci specializovaných struktur (např. microvilli, cilie)
 - Orientaci vnitřních struktur (např. osa nucleus - Golgiho aparát/centrozom)
 - Orientaci cytoskeletu (apikobázální orientace mikrotubulů, apikální konstriktce u epitelů vytvářející tubuly)

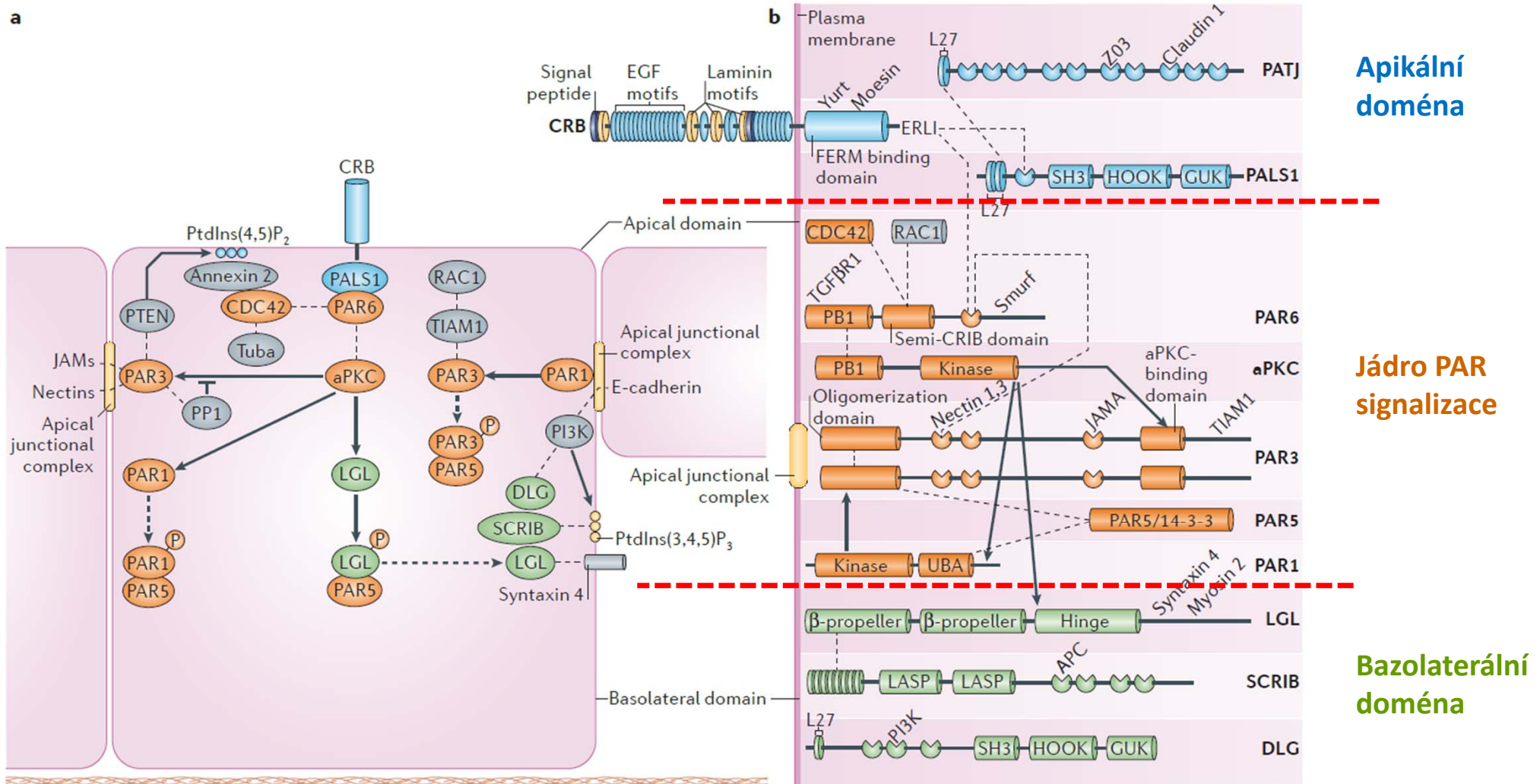


MOLEKULÁRNÍ ZÁKLAD APIKOBAZÁLNÍ POLARITY

- Signální dráha apikálně bazální (Par) polarity
 - Evolučně konzervovaná síť proteinů řídící buněčnou polaritu (nejen) epitelů.
 - V epitelech je jejím hlavním úkolem odlišit od sebe apikální a bazální stranu buňky a vytvořit maturované mezibuněčné spoje (TJ a AJ).
 - Signalizaci lze rozdělit do 3 funkčních domén:
 - Apikální – CRB, Pals, Patj
 - Jádru Par signalizace – koordinace a vymezení apikální a bazolaterální domény
 - Par3 – lokalizuje do apikolaterálního adhezního komplexu (TJ, AJ)
 - CDC42, aPKC, Par6 – apikální
 - Par1, Par5 - bazolaterální
 - Bazolaterální – Dlg (Discs large), Lgl (Lethal Giant Larvae), Scrib (Scribble)



Není nutno do detailu znát

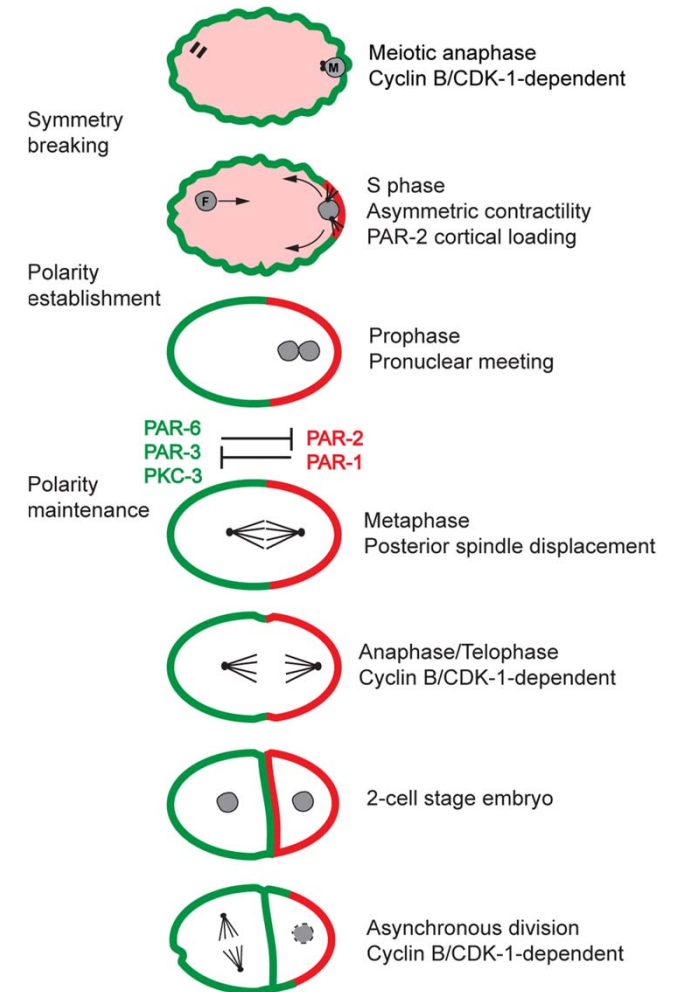
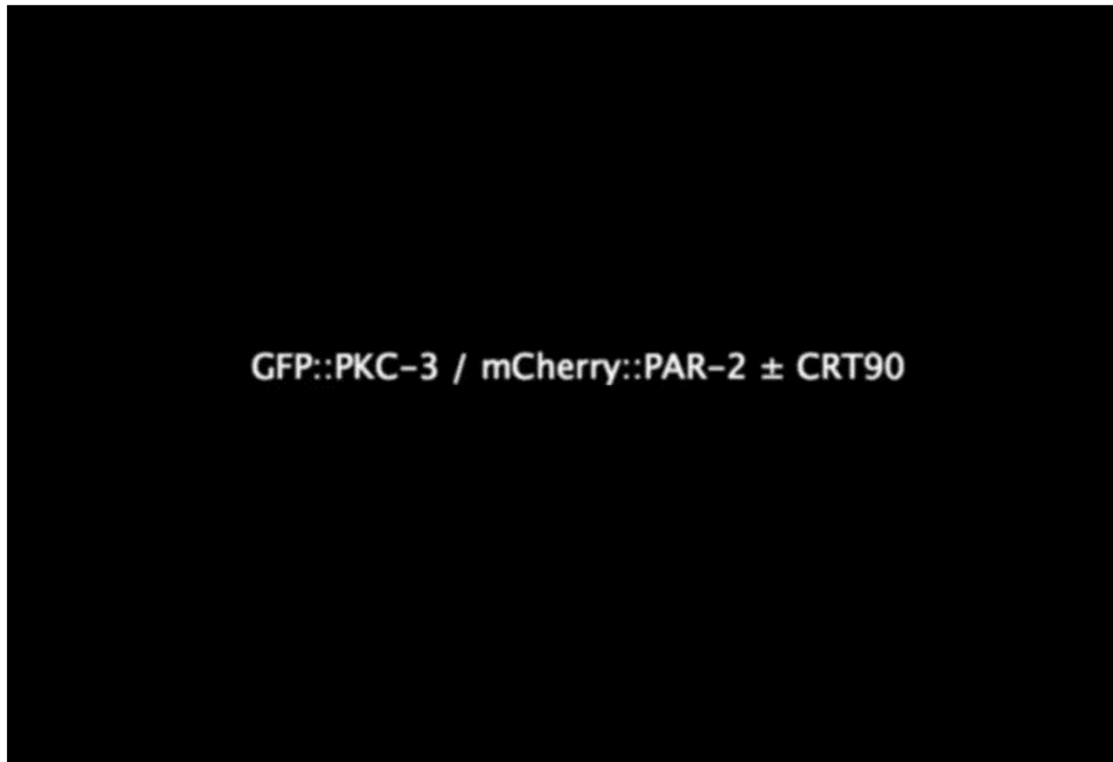


APIKOLATERÁLNÍ ADHEZNÍ KOMPLEX

- PAR3 (partitioning-defective 3)
 - Potenciálně klíčová komponenta celé signalizace, unikátní schopnost oligomerizovat (→ phase separation).
 - Součást PAR komplexu – s PAR6 a atypickou protein kinázou C (aPKC)
 - PAR komplex je esenciální funkční organizátor A-P polarity

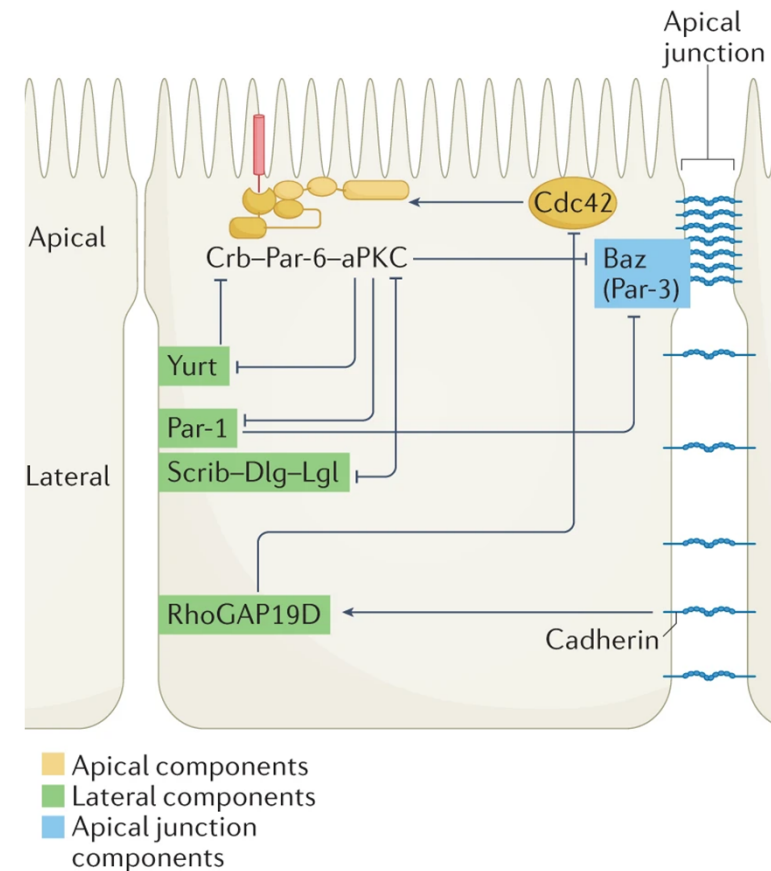
Význam *C. elegans* pro objev principů A-P polarity

- A-P polarity využívá stejné mechanismy jako první asymetrické dělení u zygoty *C. elegans*. Odtud terminologie PAR = partitioning-defective.



ROLE PAR SIGNALIZACE V POLARIZACI

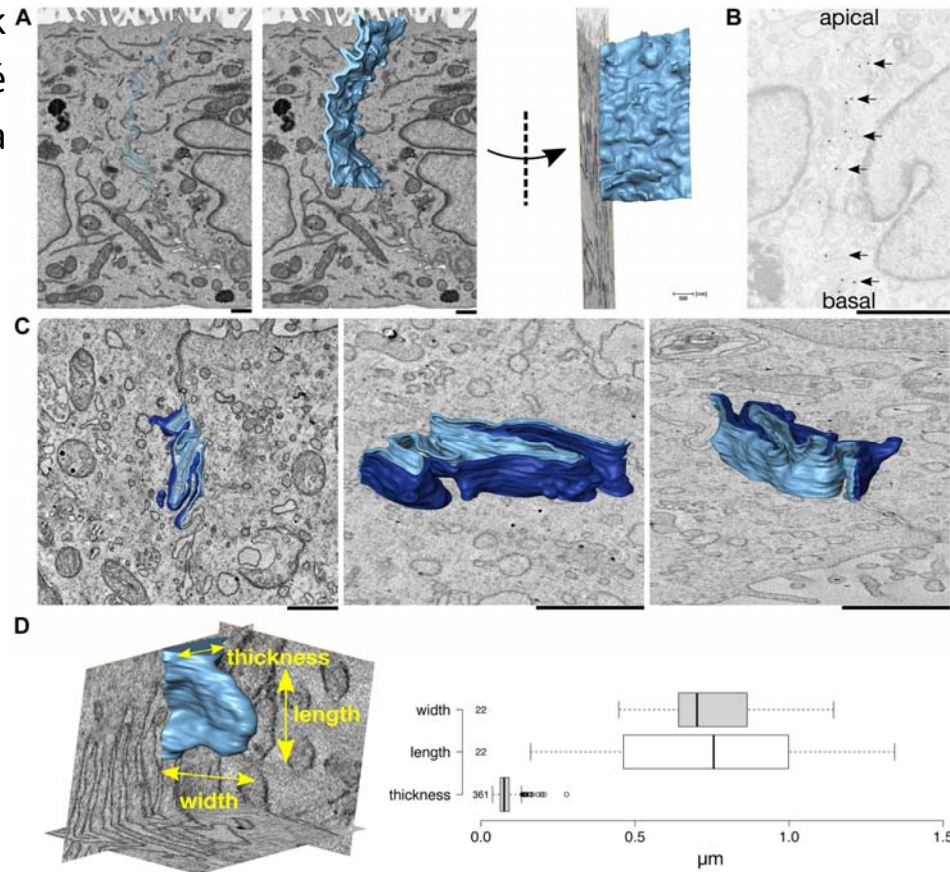
- Par signalizace **neobsahuje** komponentu s charakterem **receptoru pro vnější signál**. V naprosté většině buněčných kontextů tak vnější signál rozhodující o směru polarizace může být různého charakteru:
 - Preexistující bias
 - Ustavené spoje s ECM nebo jinými buňkami
 - Architektura cytoskeletu (např. pozice centrozomu a asociovaných organel)
 - Lokalizace specifických receptorů na povrchu buňky
 - Nový poziční signál
 - Adhezní signalizace (integriny, selektiny...)
 - Jakákoli jiná mezibuněčná signalizace (EGF, Wnt...)
 - Mechanický stimulus (např. stlačení)
 - Gradientové stimuly (chemotaxe, koncentrace živin)
- Par systém tedy nejspíše **nemá lineární charakter** jako jiné signalizace, pouze amplifikuje jiné poziční signály, a realizuje vznik funkční polarity **pomocí antagonistických interakcí** svých komponent.



ADHEZNÍ SPOJE JSOU Z HLEDISKA AKTINU NEJDYNAMIČTĚJŠÍ ČÁSTÍ EPITELU

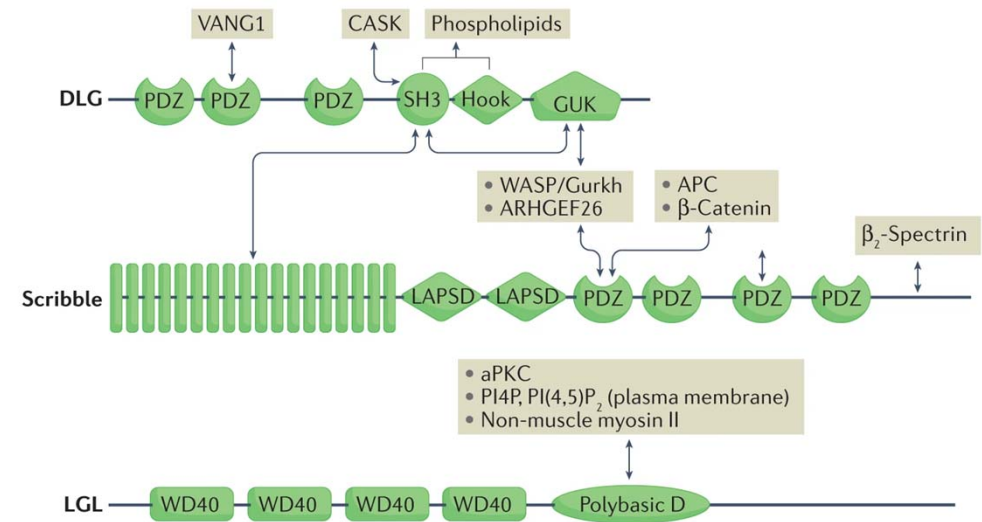
- Místa mechanického propojování epiteliálních buněk vyžadují častou přestavbu, aby přizpůsobily mechanické vlastnosti novým podmínkám. K tomu je potřeba různých aktinových regulatorů, typicky malých GTPáz.
- Běžné důvody pro přestavbu mohou být:
 - Buněčné dělení
 - Růst
 - Apoptóza
 - Mechanický stres
 - Transmigrace leukocytů

Skryté (“kryptické”) protruze v místech adhezních spojů, které vznikají jako vedlejší produkt aktivity aktinových regulátorů (Rac, Rho, Cdc42).



BAZOLATERÁLNÍ DOMÉNA

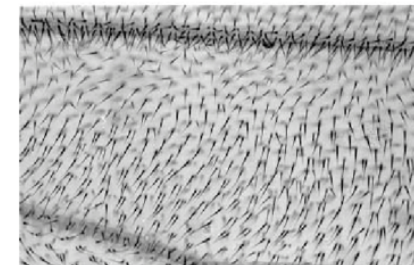
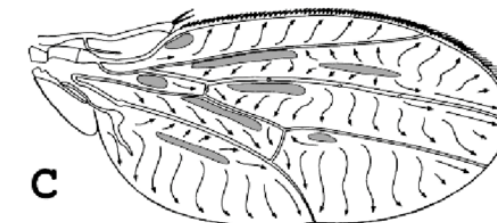
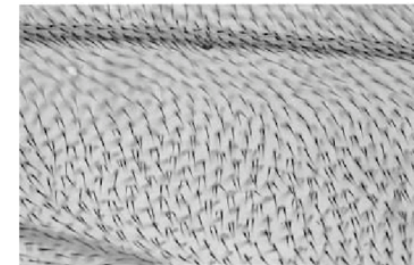
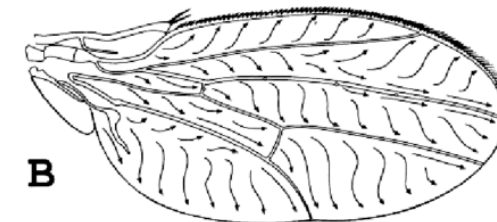
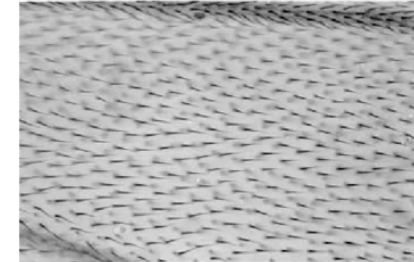
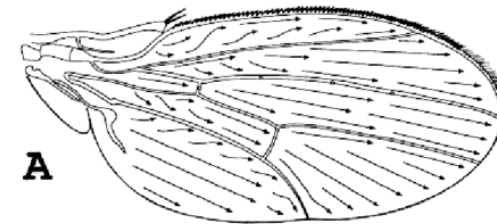
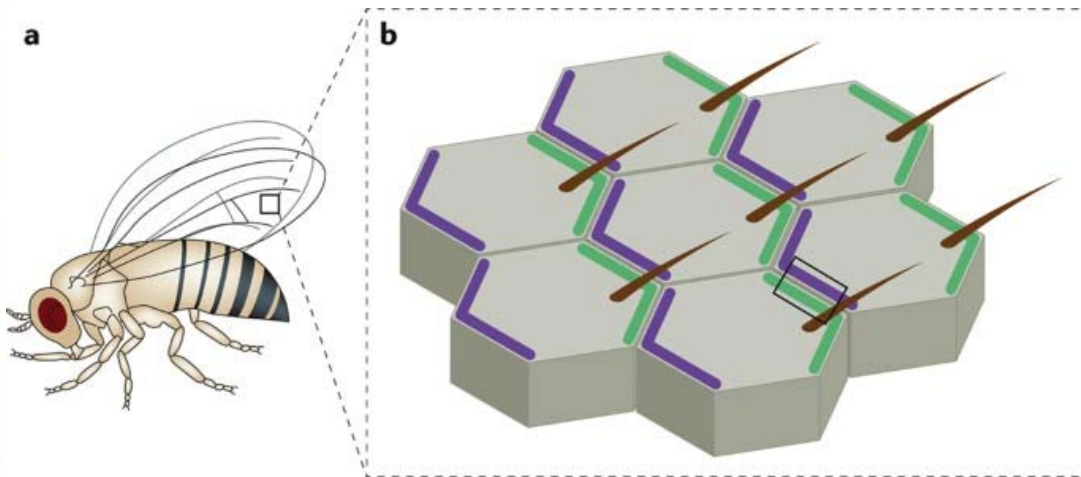
- SCRIB (Scribble), DLG (Discs large), LGL (Lethal giant larvae)
 - Nejméně známá část polaritní signalizace.
 - U *Drosophily* řídí vznik septate junctions, u obratlovců velká míra redundance.
 - Při KO SCRIB a jeho paralogů (Erbin, Lano) dochází ke kompletní disrupci AB polarity u buněk kol. karcinomu.
 - Interakce s proteiny planární polarity (viz dále) a mezibuněčnými spoji (beta-katenin)



Planární buněčná polarita (PCP)

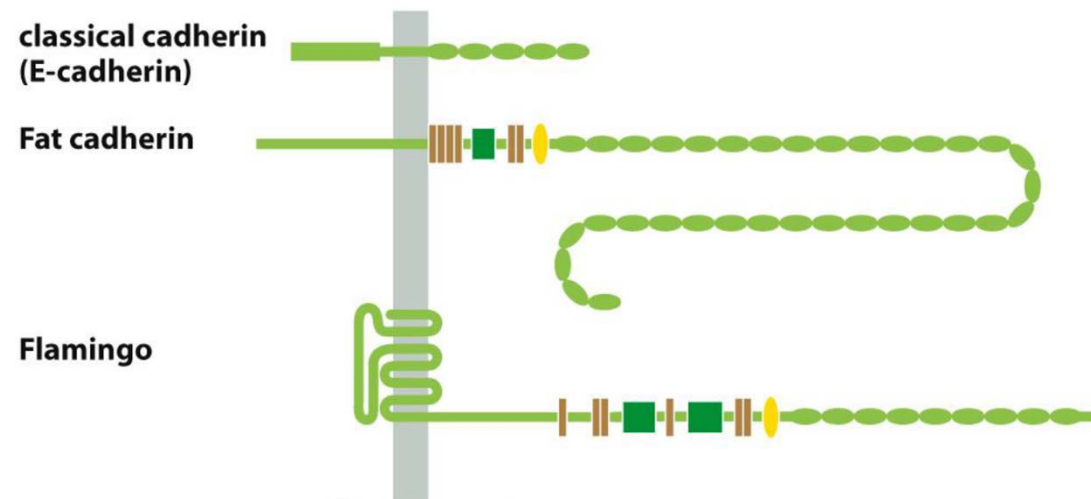
PLANÁRNÍ BUNĚČNÁ POLARITA V KŘÍDLOVÉM EPITELU DROSOPHILY

- *Drosophila* jakožto model mozaikovitého vývoje, obsahuje celou řadu buněčných fenotypů, které vyžadují velice přesnou poziční specifikaci.
- Každá z buněk epitelu křídel obsahuje po jednom aktinovém chloupku, jehož pozice je přísně koordinována s okolními buňkami.
- Planární polarizaci řídí 2 specializované polarizační signální dráhy.



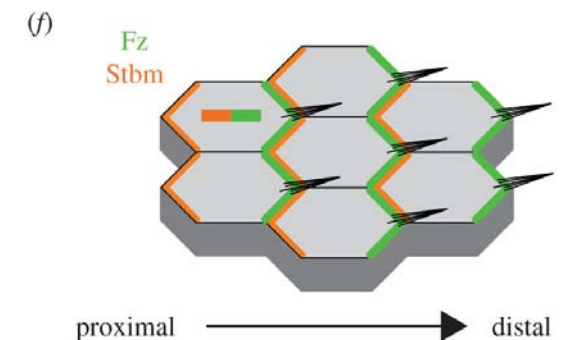
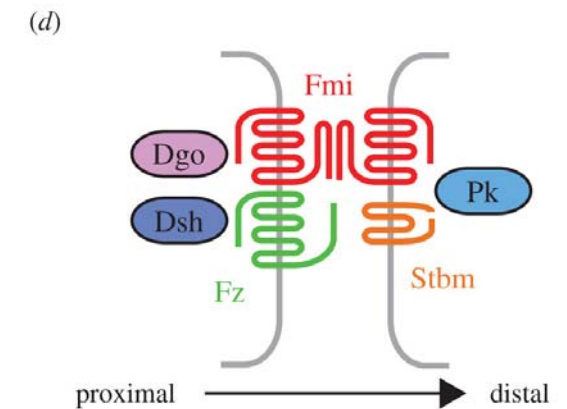
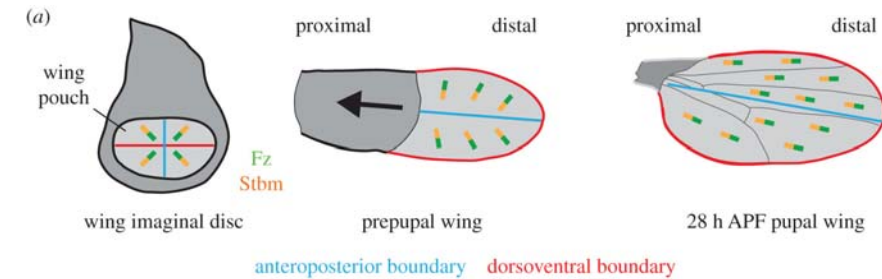
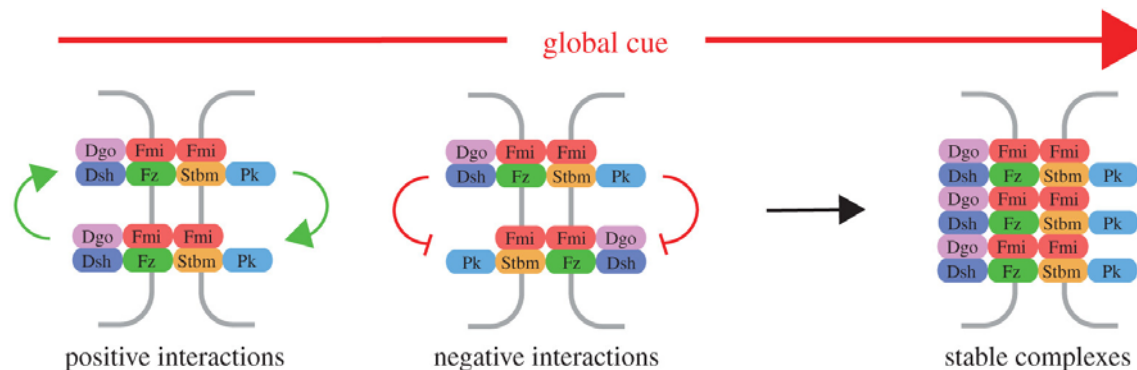
HLAVNÍ PLANÁRNĚ POLARIZAČNÍ SIGNÁLNÍ DRÁHY U DROSOPHILY

- Fat/Dachsous
- Frizzled/PCP core
 - Obě řídí polaritu z adherens junctions.
 - Obě obsahují kadherinovou komponentu.
 - Obě se podílí na stejných procesech, jejich vzájemný vztah však není dosud plně objasněn.



FRIZZLED/PCP JÁDRO

- Cadherinovou komponentou je atypický kadherin Flamingo (Fmi, u obrat. CELSR), který lokalizuje na oba póly buněk a kotví polarizační komplexy:
 - **Distální** – podobný receptorovému komplexu Wnt signalizace
 - **Frizzled** (Fzd) – transmembránový GPCR
 - **Dishevelled** (Dvl) a **Diego** (Dgo) - intracelulární
 - **Proximální**:
 - **Strabismus** (Stbm, u obratlovců VANGL) – transmembránový protein nejasné aktivity
 - **Prickle** (Pk) – intracelulární
 - + další efekторы zodpovědné za polarizovanou tvorbu aktinového chloupku
- Charakter signálu orientujícího polarizaci v tomto modelu je v současnosti debatován.



DALŠÍ ROLE PLANÁRNÍ POLARITY:

- Orientace mikrotubulového cytoskeletu:

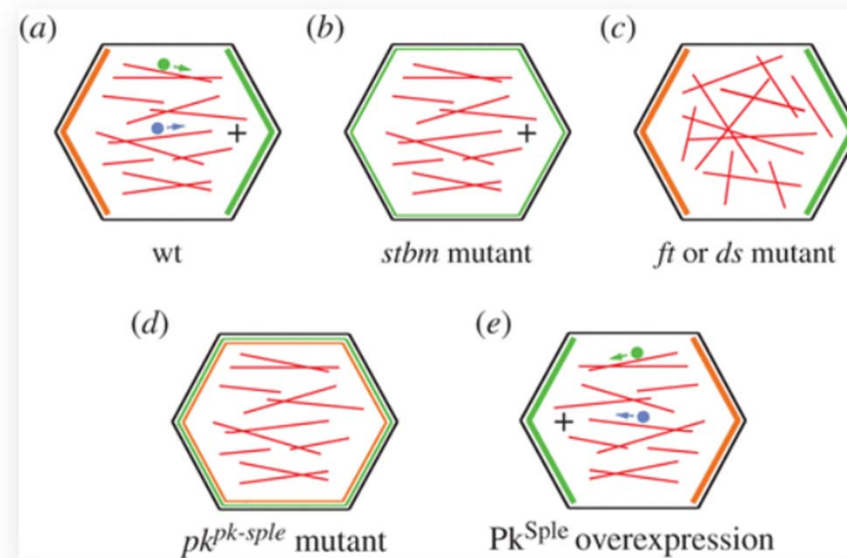
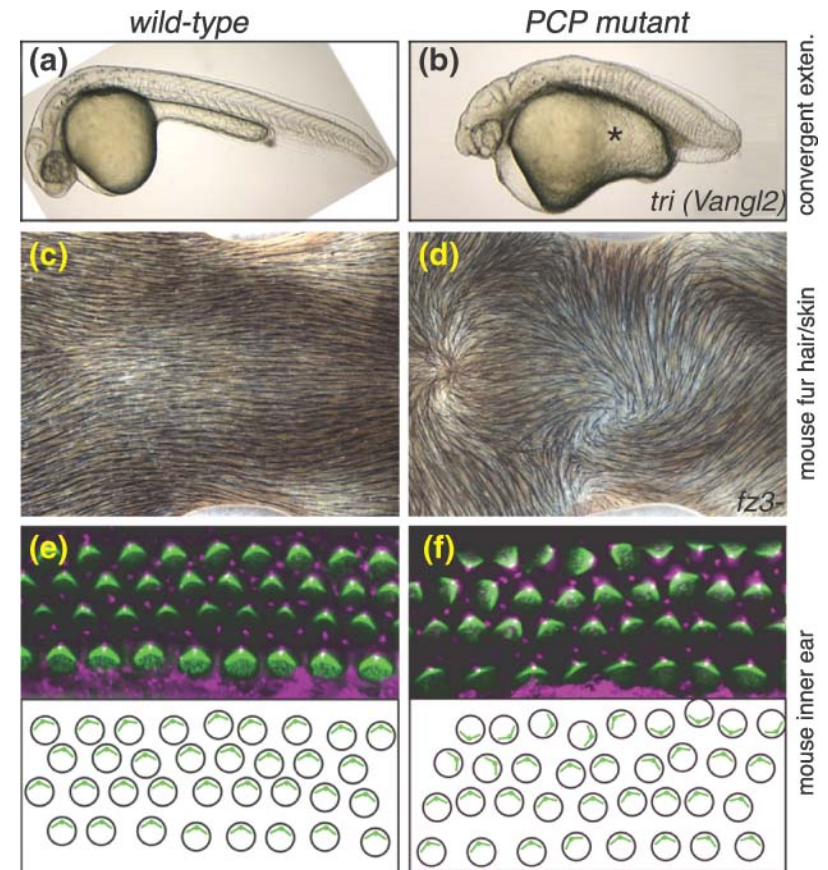
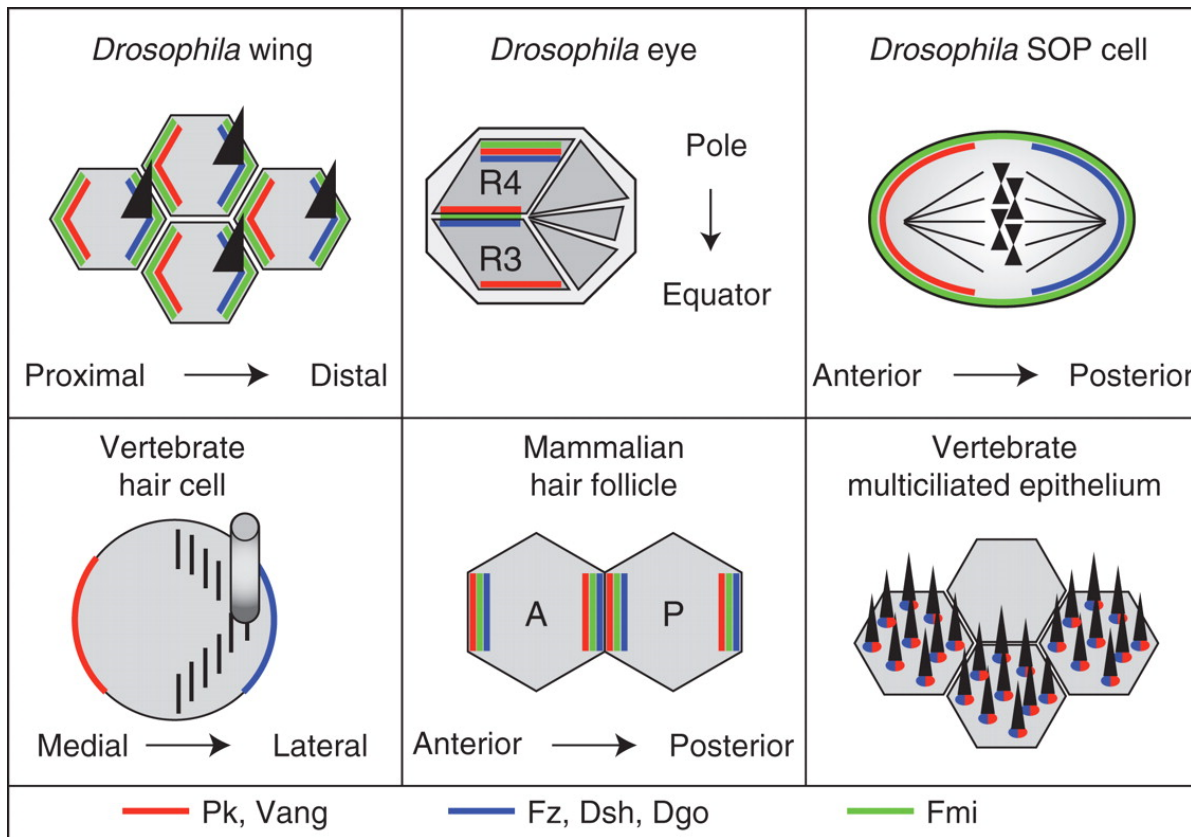


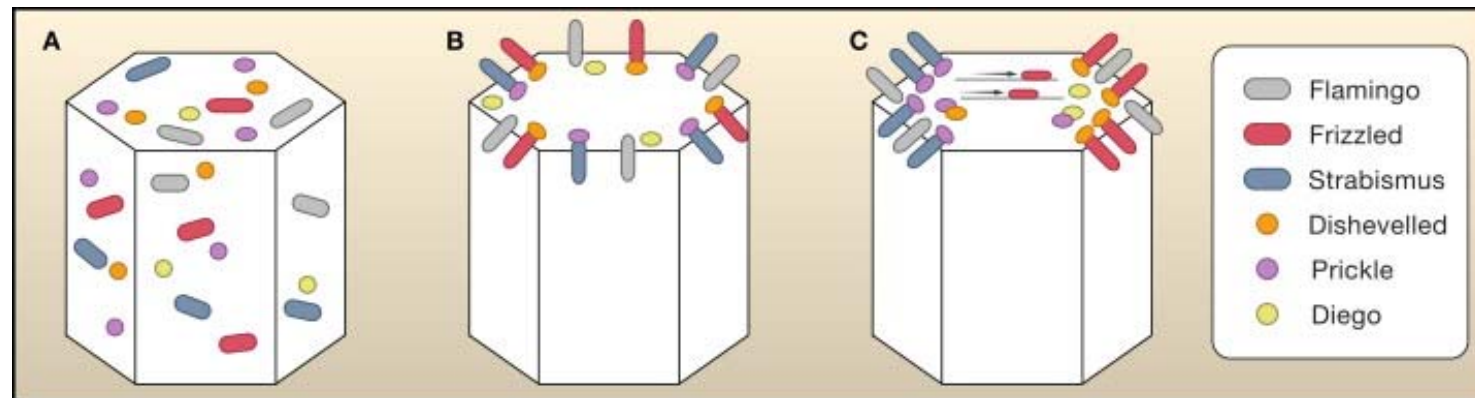
Figure 7. Regulation of microtubule alignment and polarity. (a) In wild-type wings at 24 h APF, microtubules are aligned along the proximodistal axis, and in the proximal region of the wing the plus ends are subtly biased towards the distal cell end. Fz and Dsh particles (green and blue dots, respectively) are associated with microtubules and their movement is biased towards microtubule plus ends. (b) Loss of Fz or Stbm does not affect microtubule alignment or plus-end bias. (c) Loss of Ft or Ds disrupts microtubule alignment along the proximodistal axis. (d) Loss of both isoforms of Pk does not affect microtubule alignment, but the plus-end bias in the proximal wing is lost. (e) Overexpression of Pk^{Sple} reverses the bias in microtubule plus ends in the proximal region of the wing, and there is a reversal in the movement of Dsh particles.

KONZERVOVANOST FZD/PCP CORE NAPŘÍČ ŽIVOČIŠNÝMI MODELY



HIERARCHIE EPITELIÁLNÍ POLARITY A BUNĚČNÝ KOMPAS

1. Iniciální signál ustavující apikálně bazální osu → CDC42
2. Stabilizace a vytvoření funkční apikobazální polarity – Par systém
3. Do vytvořených adhezních spojů se lokalizuje Flamingo/CELSR
4. Polarizace PCP na základě vnějšího signálu



Apikobazální a planární polarita představují dvě na sebe kolmé osy, podle kterých je možné v buňce orientovat cytoskelet. Lokální aktivací aktinových regulátorů (obvykle z oblasti adhezních spojů) je možné za pomoci aktomyosinové kontraktivity a orientace mikrotubulů organizovat ve 3D vnitřní architekturu buňky.

SHRNUTÍ 1

- Různé adhezní molekuly tvoří specifické domény na povrchu epitelu, avšak jsou funkčně propojené pomocí aktinového kortexu.
- Apikobazální polarita epitelů je řízena evolučně konzervovaným systémem PAR proteinů.
- PAR signalizace nejspíše nemá lineární charakter, pouze zesiluje předem existující poziční informaci.
- Apikolaterální adhezní komplex (AJ + TJ) je důležitým organizačním centrem polarity epitelů, je dynamický a může sloužit jako iniciační místo protruzivní aktivity.
- Apikobazální a planární polarita vytváří 2 osy, podle kterých je vystavěna architektura aktomyosinového cytoskeletu v epitelech. Ten určuje vnitřní organizaci buňky.