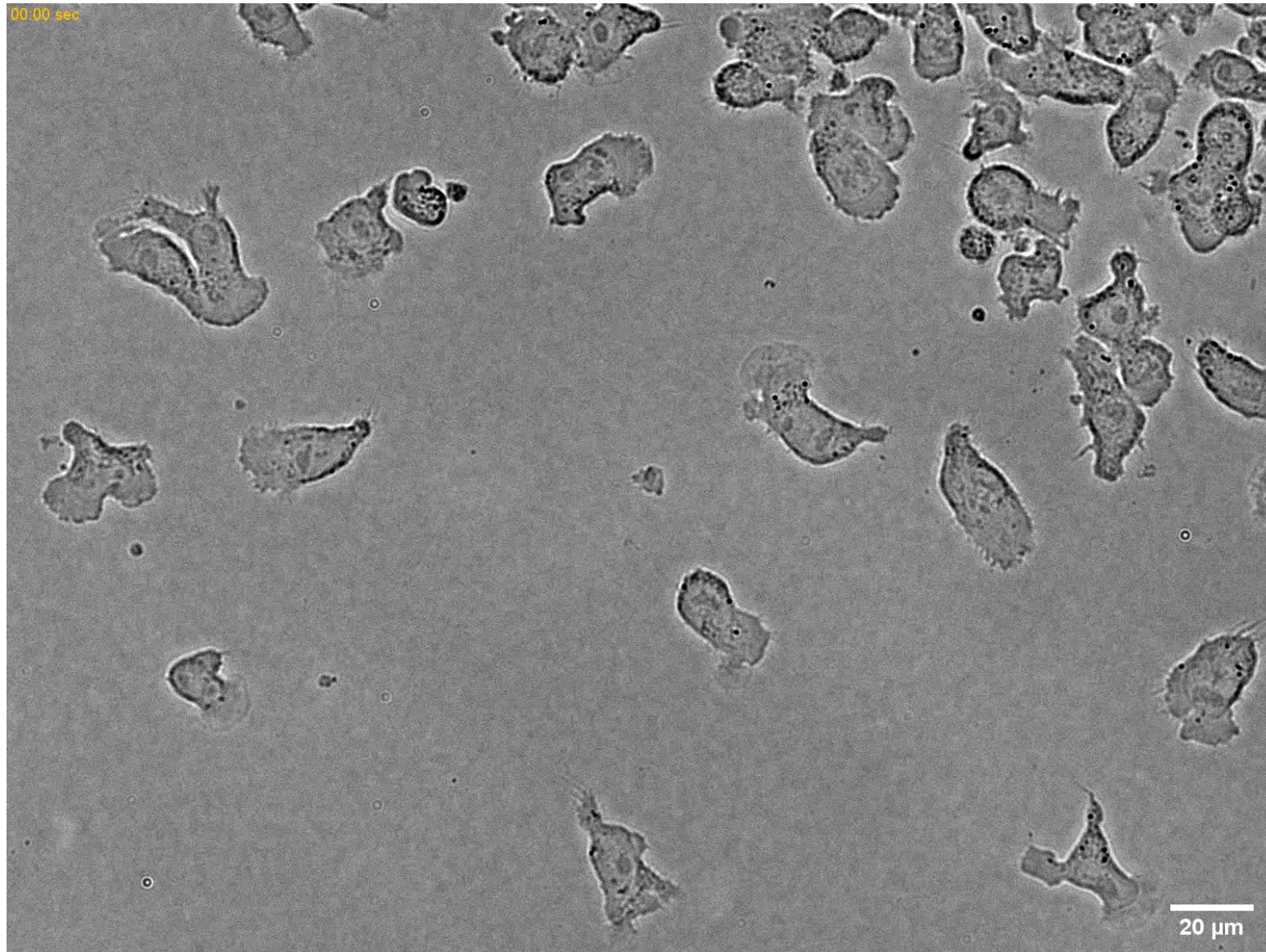


# 10 Regulace buněčné migrace

prof. Mgr. Vítězslav Bryja, Ph.D.

Ústav experimentální biologie PŘF MU

# BUNĚČNÝ POHYB – B-LYMFOCYT

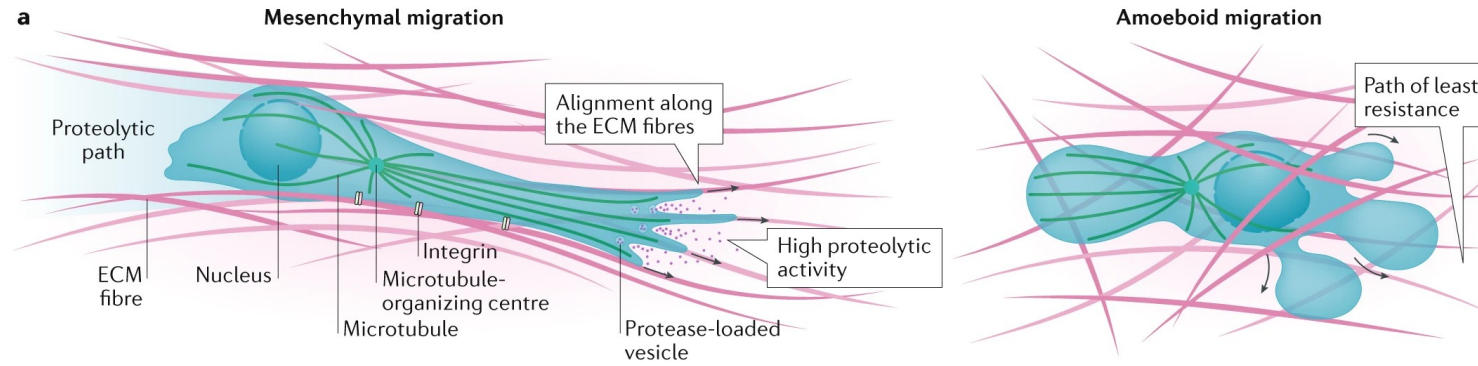




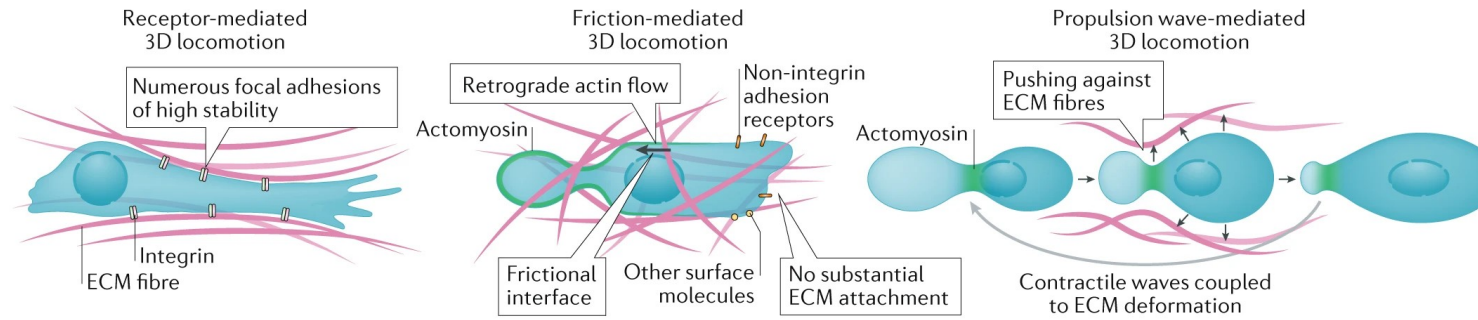
# Základní typy buněčné migrace

# MIGRAČNÍ MÓDY

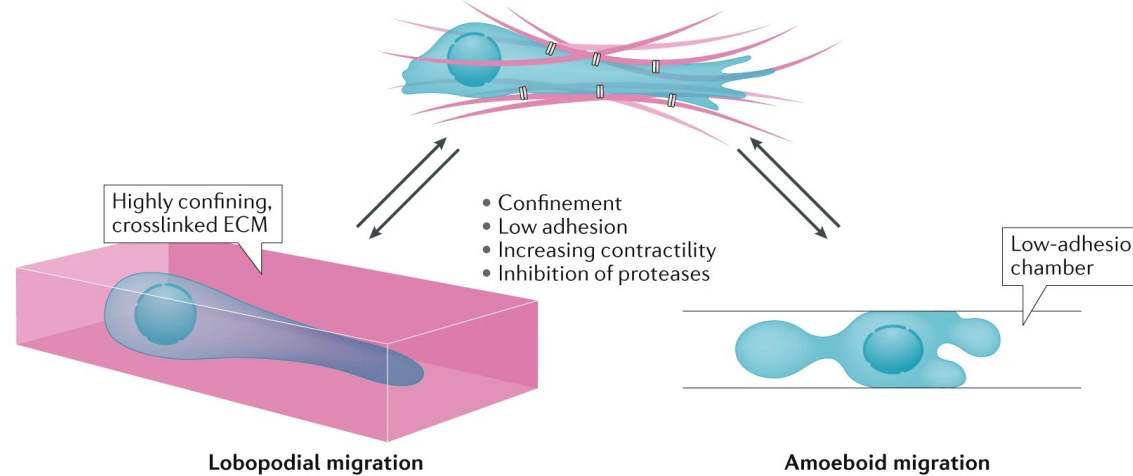
- **Améboidní vs. mezenchymální**
- Hlavní rozdíly:
  - Míra a význam adheze k povrchu (nižší u améboidní)
  - Využití aktomyosinové kontraktility (vyšší u améboidní)
  - Pozice MTOC (u améboidních většinou za jádrem, u mezenchymálních naopak, není ale 100%)
  - Rychlost:
    - Mezenchymální: maximálně jednotky  $\mu\text{m}/\text{min}$
    - Améboidní: až okolo 15  $\mu\text{m}/\text{min}$
- Typičtí zástupci:
  - Mezenchymální: fibroblasty, epiteliální buňky prošlé EMT včetně řady nádorových linií
  - Améboidní: imunitní buňky (s výjimkou makrofágů), améby (např. Dictyostelium)



**b Mechanisms of 3D locomotion**

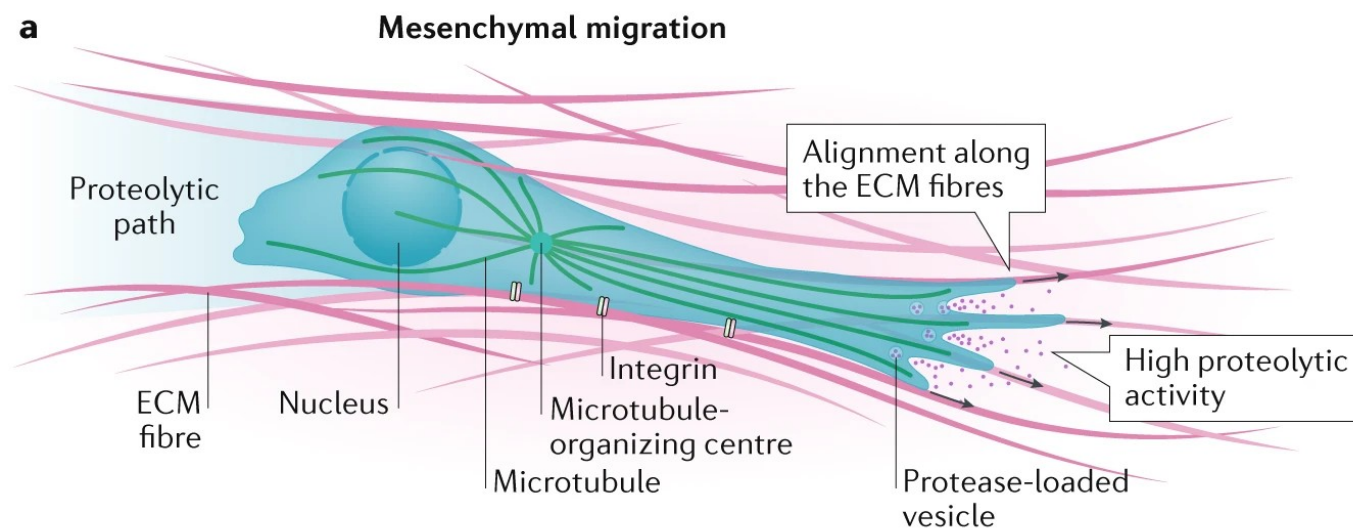


**c Mesenchymal migration**





# Mezenchymální migrace



# POHYB BUŇKY PO SUBSTRÁTU

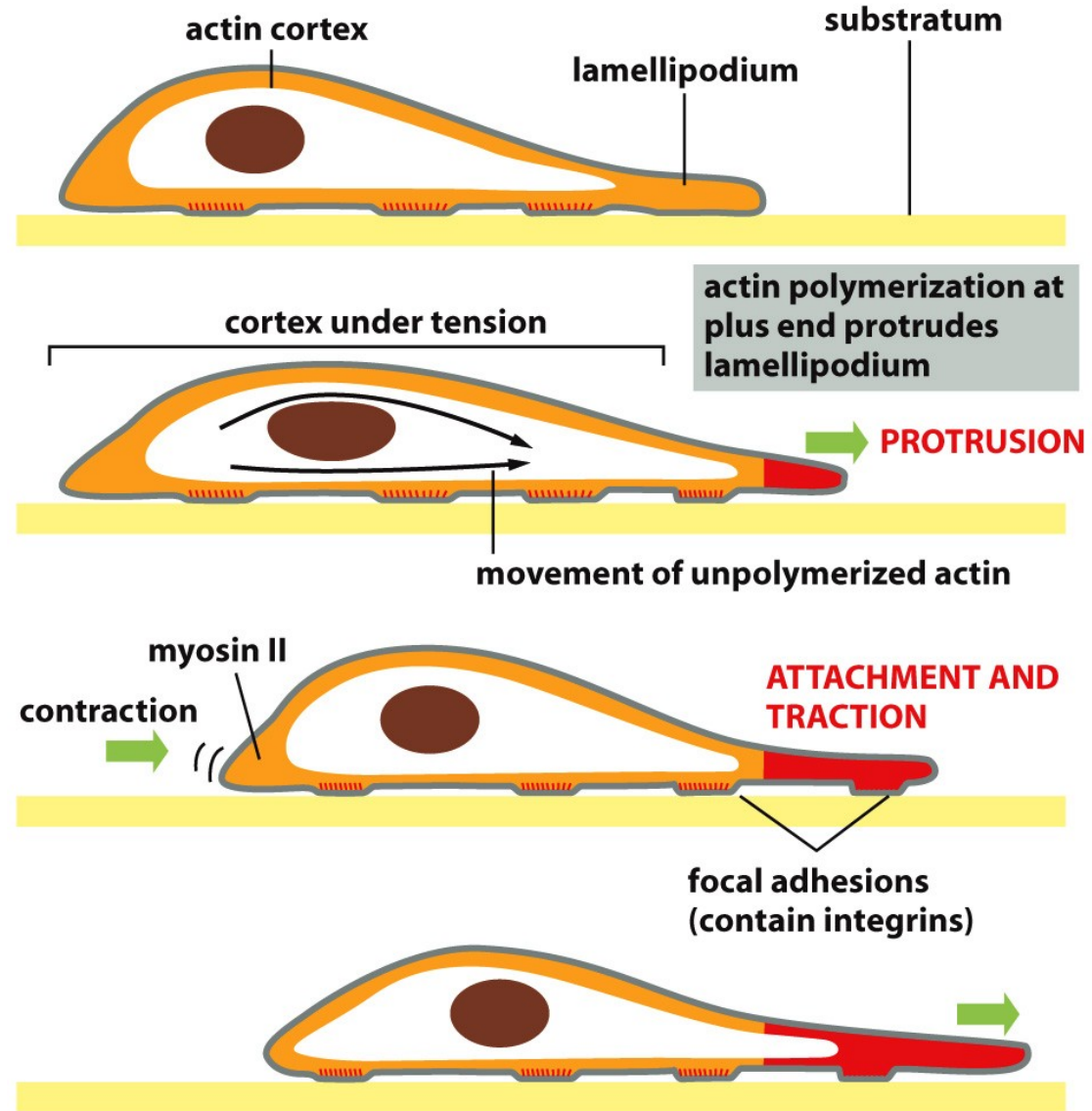
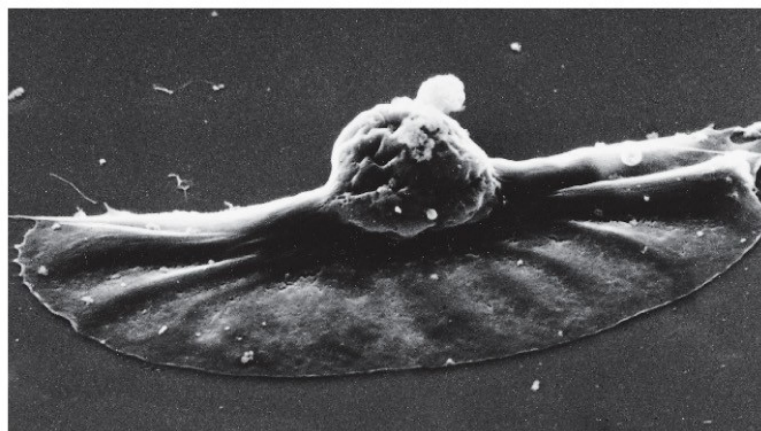


Figure 16-75 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## POHYB BUŇKY PO SUBSTRÁTU – MODEL KERATOCYTŮ (V KŮŽI RYB A OBOJŽIVELNÍKŮ)

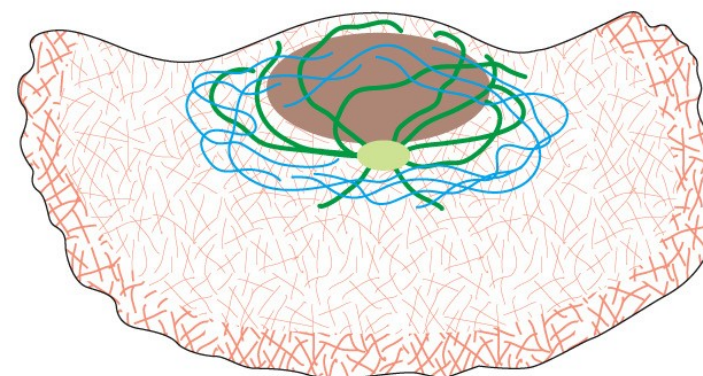


(A)



(B)

10  $\mu\text{m}$

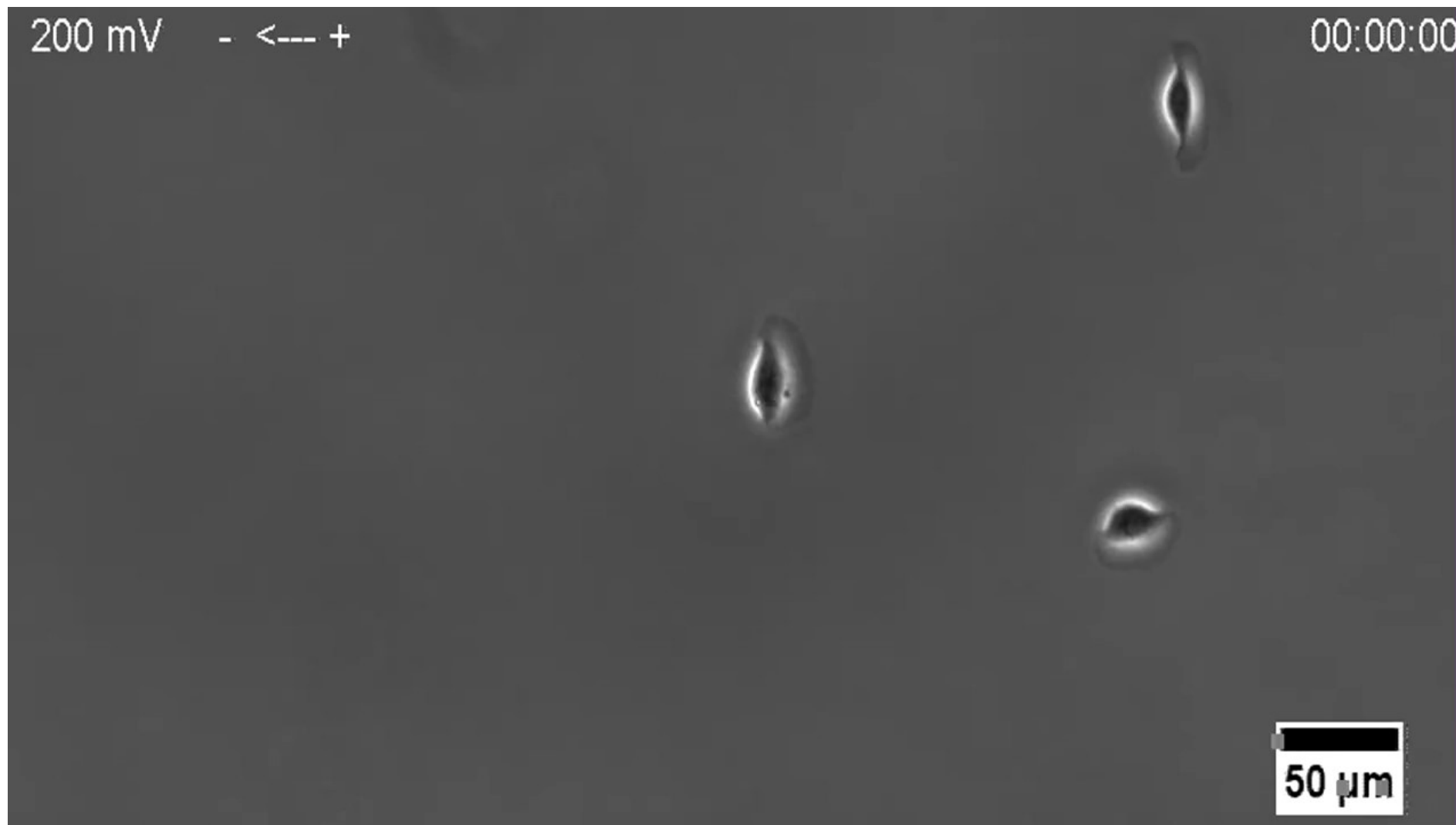


(C)

Figure 16-77 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



# Migrovat mohou i buněčné fragmenty



# AKTINOVÁ SÍŤ V LAMELIPODIU – KLÍČOVÁ ROLE ARP2/3



Figure 16-78a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# AKTINOVÁ SÍŤ V LAMELIPODIU – KLÍČOVÁ ROLE ARP2/3

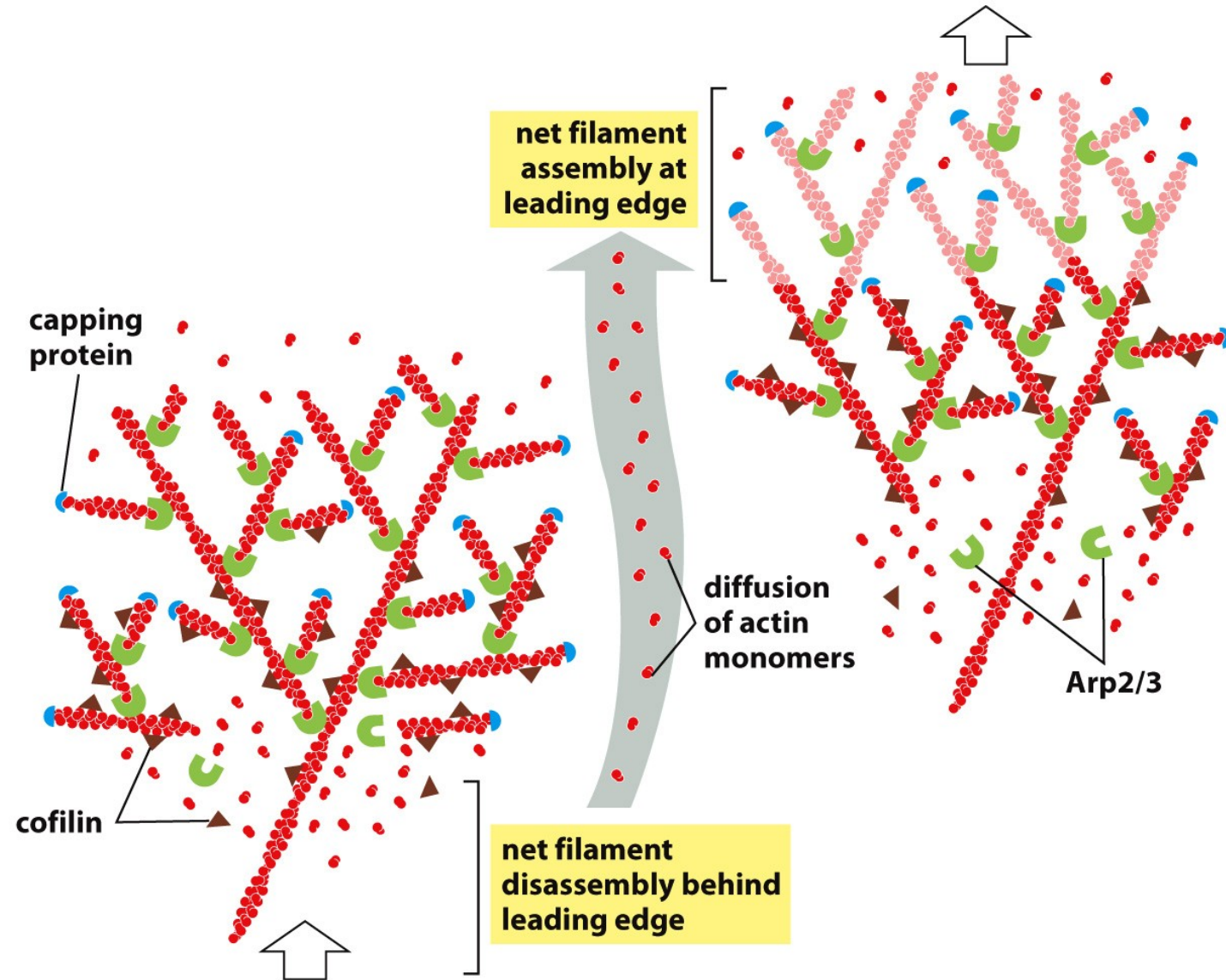


Figure 16-80 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

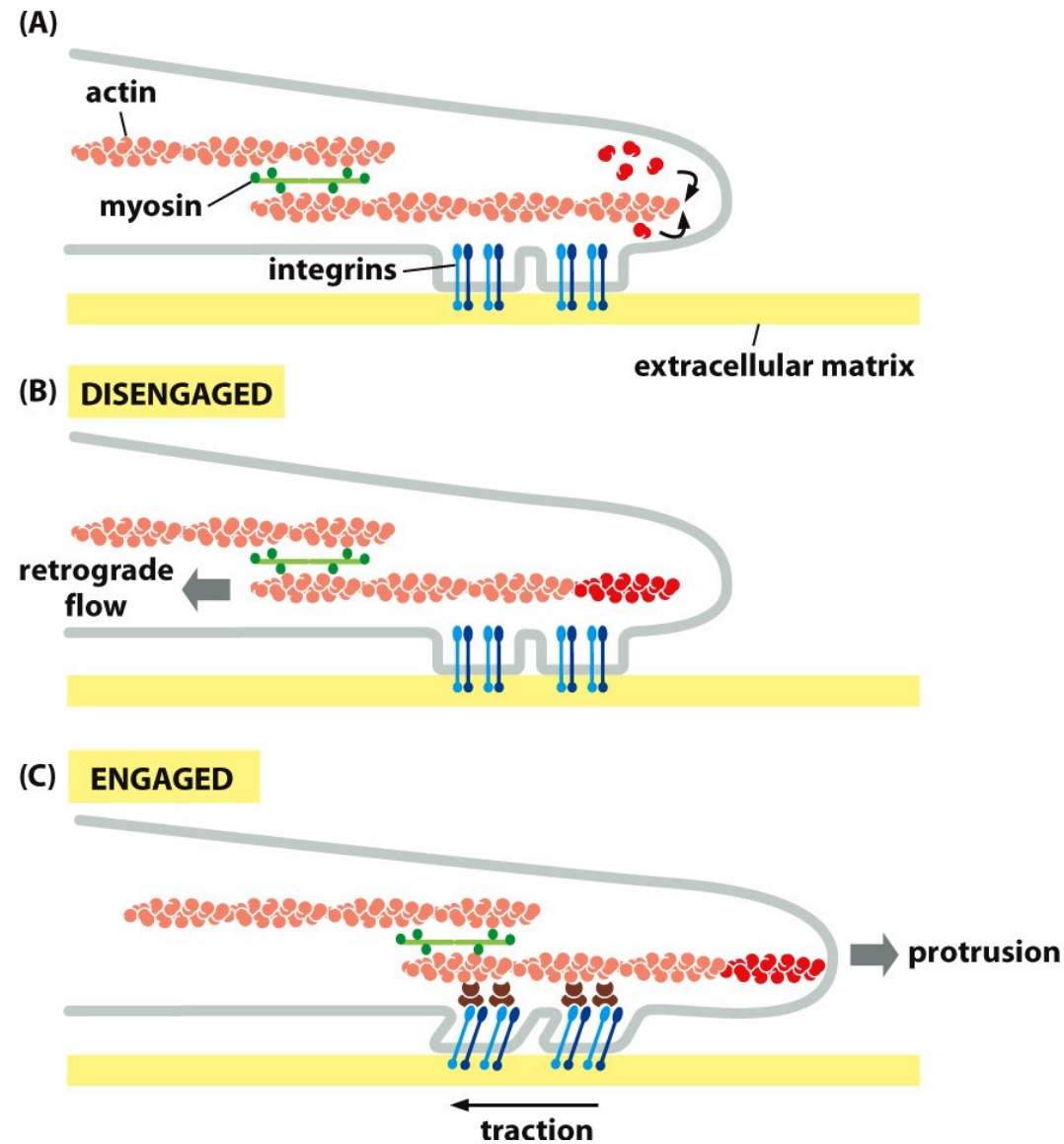


# POHYB BUŇKY PO SUBSTRÁTU – KLÍČOVÁ



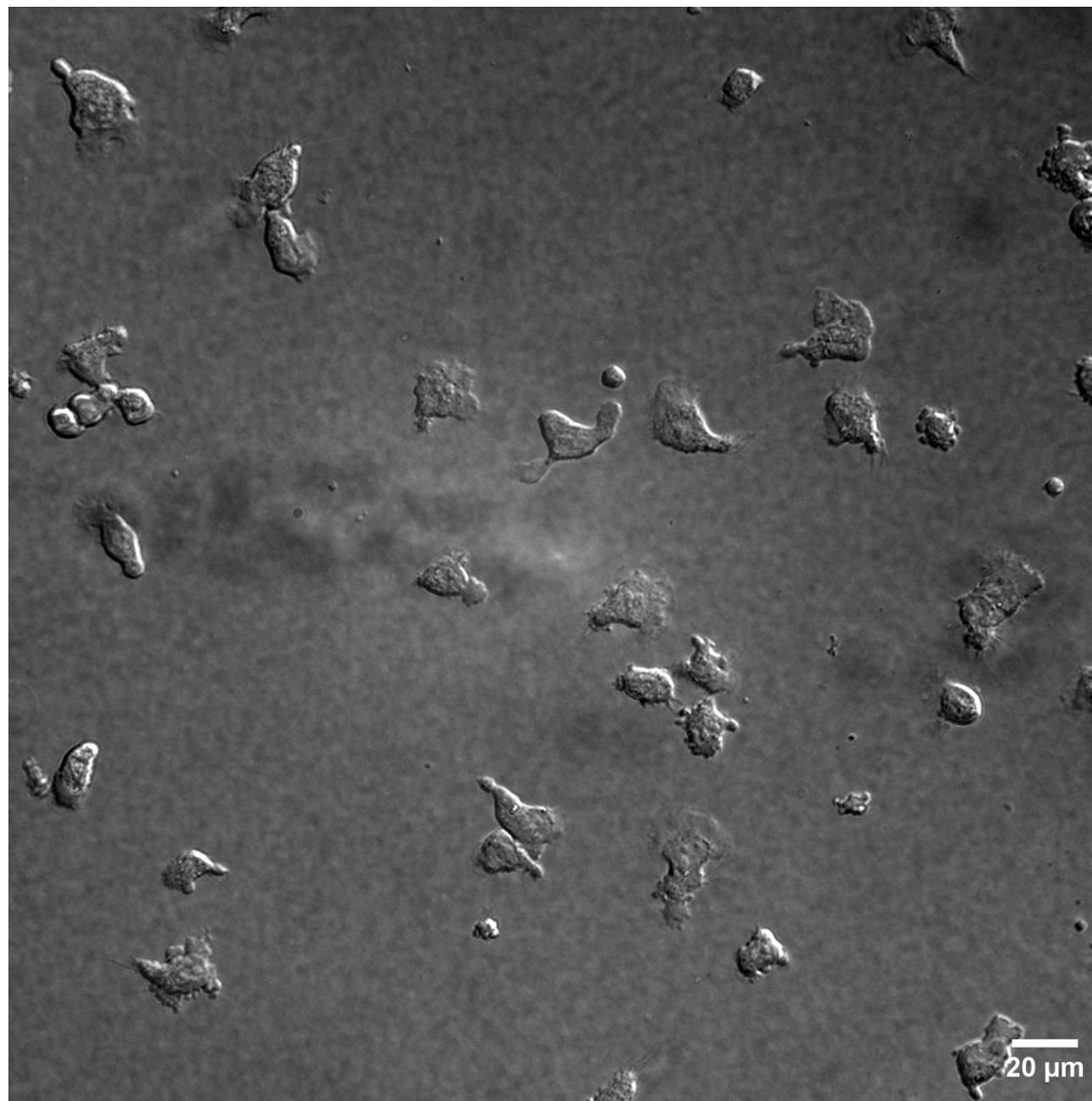
The Formation of  
Focal Adhesions

# POHYB BUŇKY PO SUBSTRÁTU – KLÍČOVÁ ROLE INTEGRINŮ



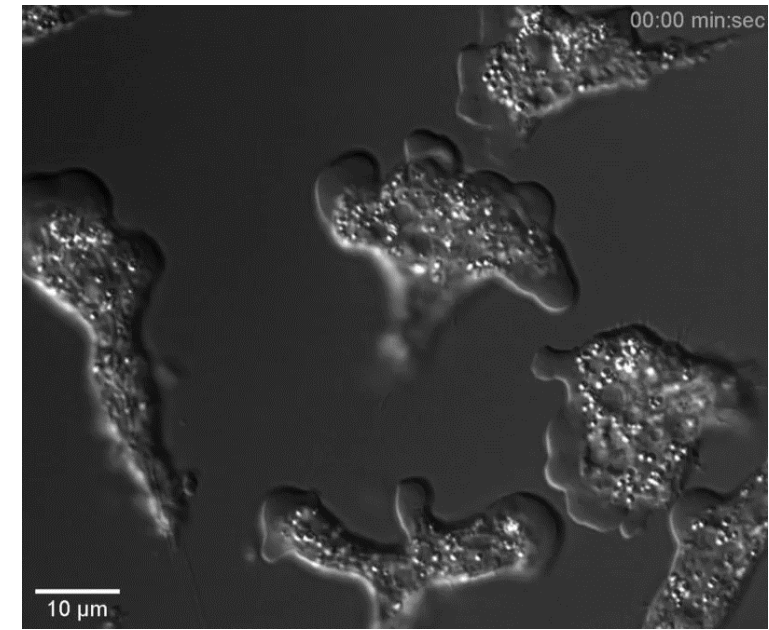
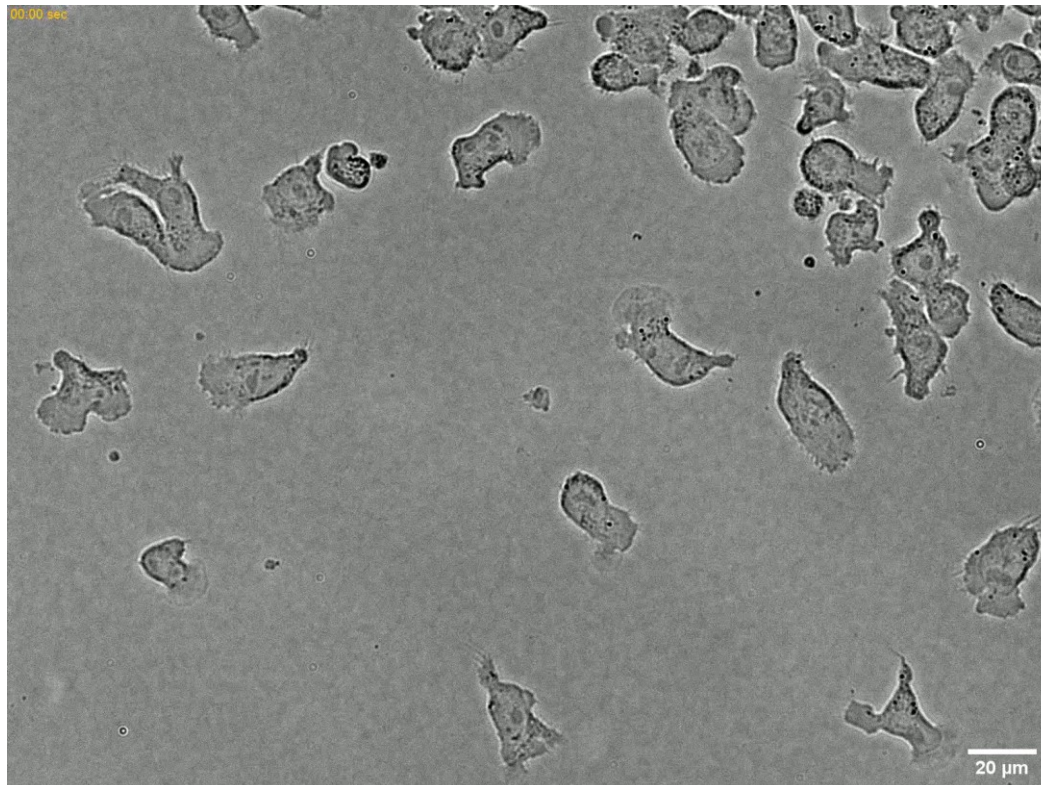
# Amoeboidní migrace





# KONZERVOVANOST AMÉBOIDNÍ MIGRACE NAPŘÍČ HISTORIÍ EUKARYOT

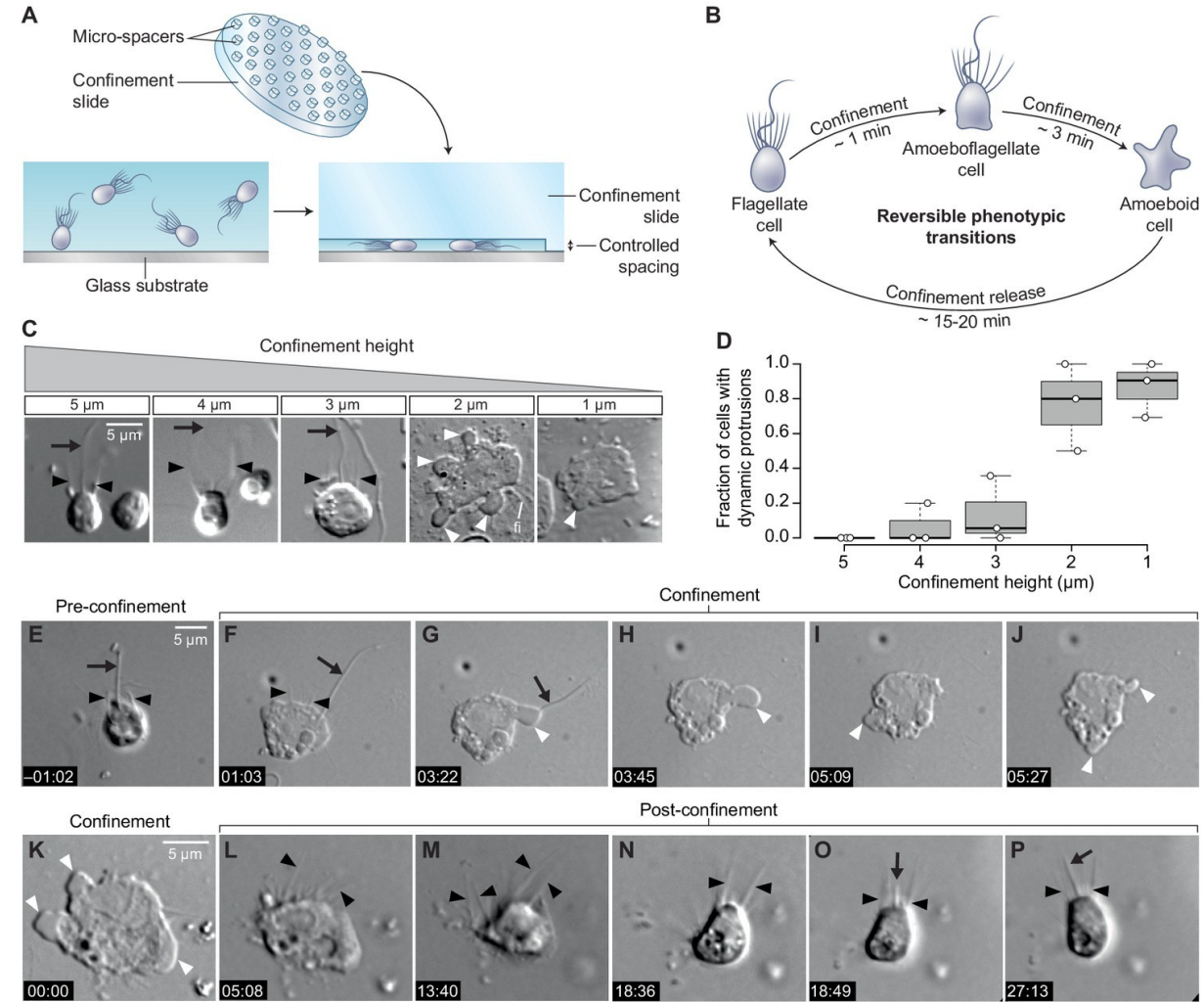
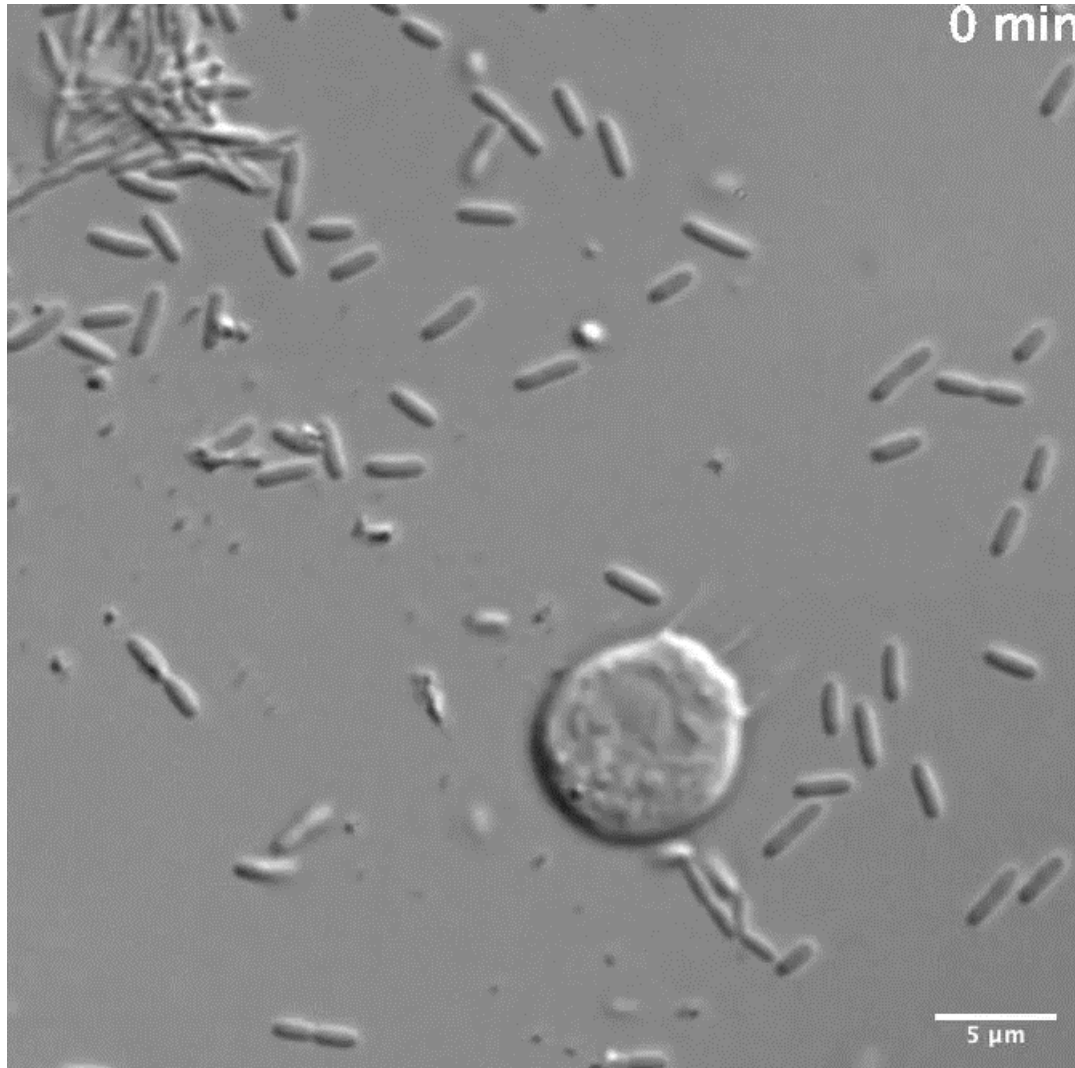
- Améboidní migrace – název napovídá, že je pojmenována po způsobu pohybu jednobuněčných améb
- Podobnost pohybu leukocytů a améb není náhodná, jde o evolučně konzervovaný mechanismus, řízený téměř totožnými proteiny.
- I u takových jednobuněčných organismů, u nichž se donedávna schopnost améboidně migrovat nepředpokládala, se často dá indukovat.





# INDUKCE AMÉBOIDNÍHO FENOTYPU U TRUBĚNKY (CHOANOFLAGELLATA)

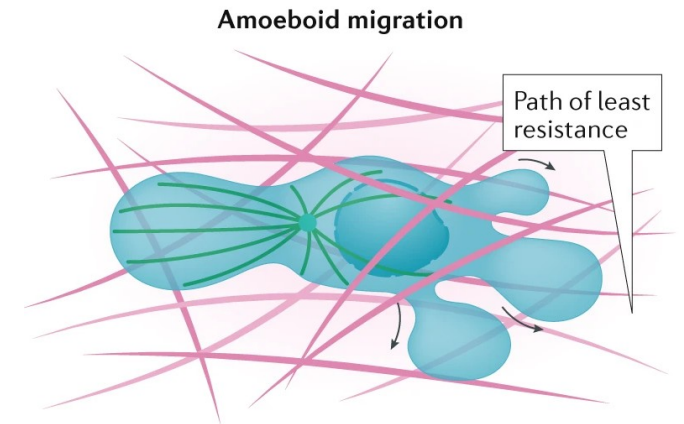
- Mechanickým stlačením lze u truběnky vyvolat reverzibilní améboidní transformaci. Po ní může truběnka uniknout ze stlačeného prostoru.





## PROČ JE U AMÉBOIDNÍCH BUNĚK MTOC VZADU?

- Améboidní migrace je evolučně určena pro prostorově omezená prostředí.
- Leukocyty používají své plastické jádro jako mechanický sensor toho, jestli se daným prostorem protáhnou. Jádro je tedy vpředu buňky, aby s ním mohlo být manipulováno.

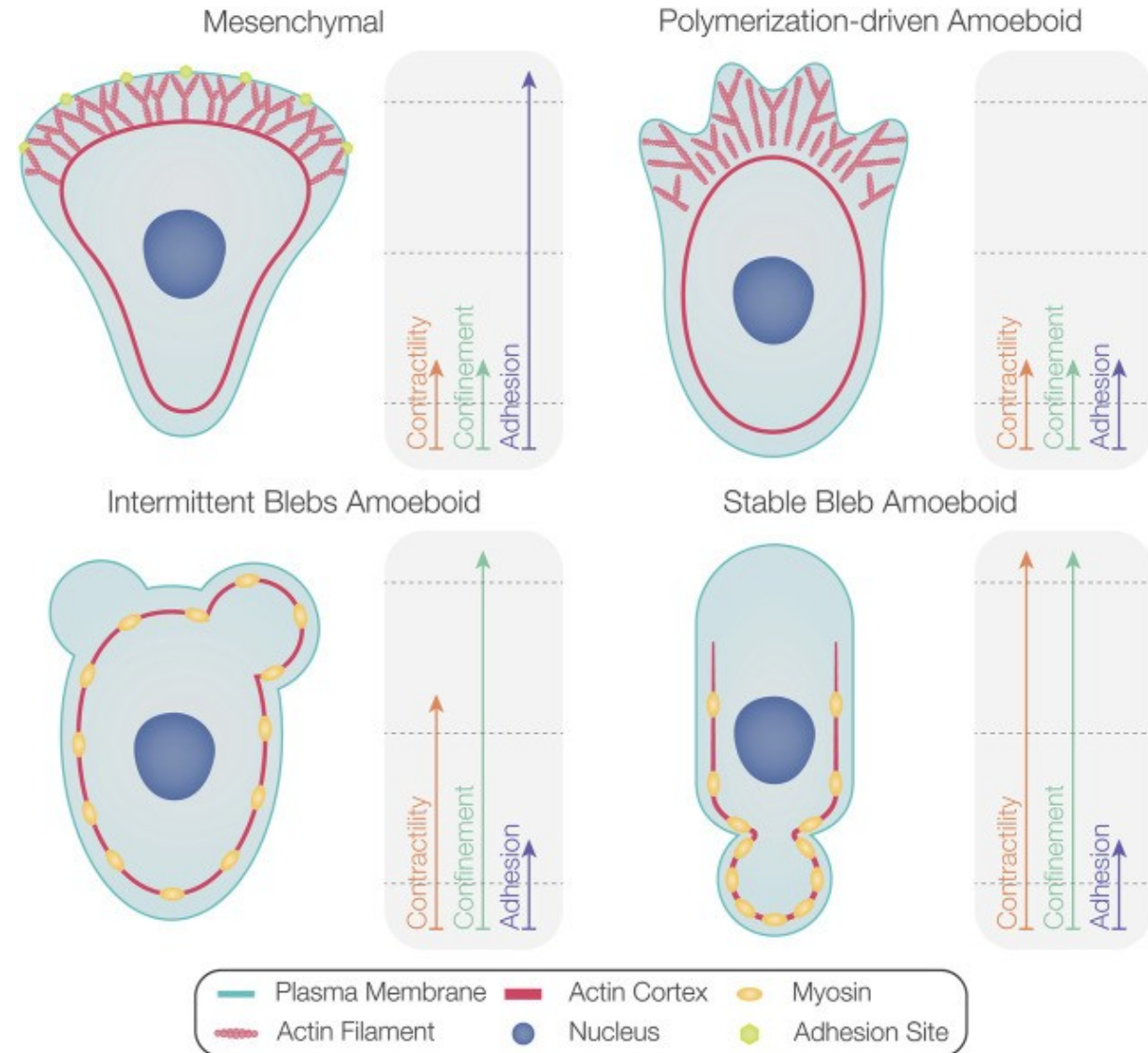


# BLEBBING

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9337749/>

## Charakteristika blebbingu:

- **Tvorba blebů/výdutí:** Buněčný blebbing zahrnuje vytváření výčnělků nebo výdutí na buněčné membráně.
- **Odpojení membrány od cytoskeletu:** Bleby vznikají díky lokalizovanému odloučení buněčné membrány od podkladového cytoskeletu.
- **Změny aktinového cytoskeletu/buněčného kortexu:** Změny v aktinovém cytoskeletu, což je síť proteinových vláken poskytujících buněce strukturální podporu, jsou často spojeny s procesem blebbingu.
- **Dynamika a reverzibilita:** Blebbing je dynamický a reverzibilní proces, který může nastat v reakci na různé podněty, jako jsou mechanický stres, změny osmotického tlaku nebo expozice určitým látkám.

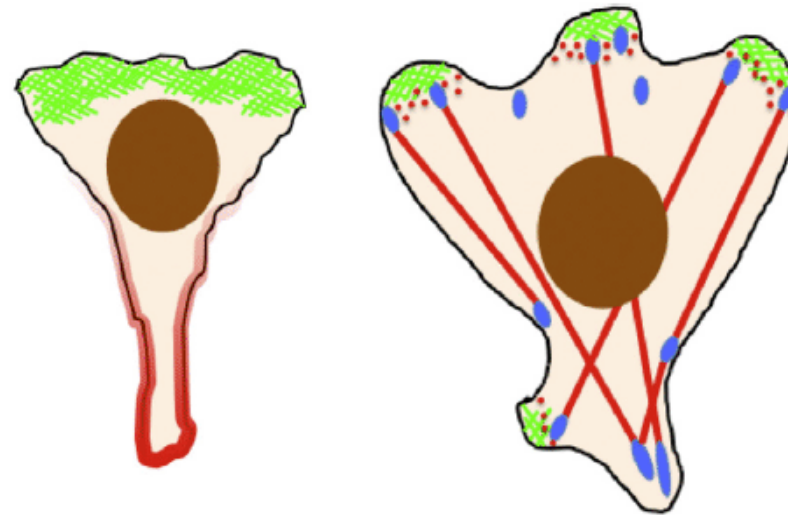


# DVA EXTRÉMNÍ MÓDY MIGRACE SHRNUTÍ: AMÉBOIDNÍ VS. MEZENCHYMÁLNÍ

Dendritic F-actin

Myosin II structures

Focal adhesions

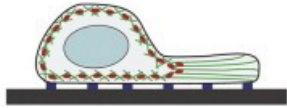
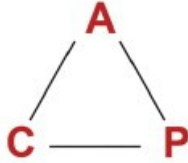
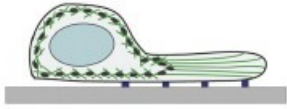
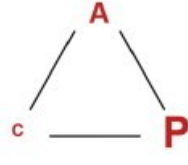

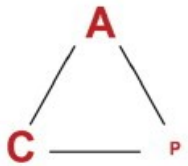
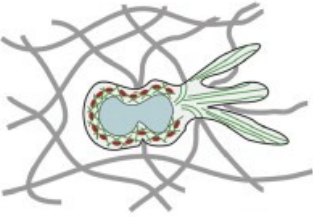
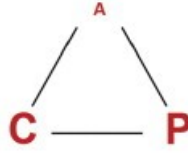
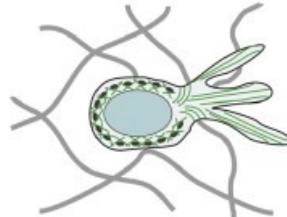
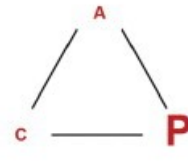
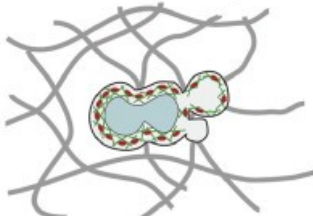
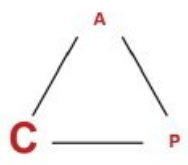


	Amoeboid	Mesenchymal
Migration speed	Fast, ~ 10 $\mu\text{m}/\text{min}$	Slow, < 1 $\mu\text{m}/\text{min}$
Polarity	Well-defined front and rear	Multiple, competing lamellipodia
Adhesion	Relatively weak, mostly intercellular	Strong, mostly ECM with well-defined adhesion complexes
Migration mechanics <i>in vivo</i>	Squeezing through pores in matrix/stroma	Traction via adhesion to ECM, matrix degradation as necessary
Organization of action cytoskeleton	Thick dendritic actin network at the cell front; elsewhere, cortical actomyosin mediates contractility beneath the plasma membrane	Dendritic F-actin in lamellipodia; acto-myosin minifilaments mediate contractility behind the leading edge(s) and form thick stress fibers attached to focal adhesions
Chemoattractant receptors	GPCRs	RTKs



# KOMPLIKACE KLASIFIKACE BUNĚČNÉ MIGRACE

- Problematika klasifikace migrace:
  - Dělení je umělé, ve skutečnosti existuje plynulý přechod od jednoho módu k druhému.
  - Stejně buňky se mohou chovat jinak v závislosti na vnějších podmínkách
    - “Lepivost” substrátu, dimenzionalita (3D/2D/1D)
  - Různé buňky obsahují jiný “mix” cytoskeletárních regulátorů, což vede pokaždé k trochu jinému migračnímu fenotypu.

	Amoeboid morphology	Force balance	Leukocytes	Other amoeboid cells
I 2D			neutrophils [16,34], T lymphoblasts [43,44]	<i>Dictyostelium</i> [32,33,41,42], <i>Amoeba proteus</i>
II 2D protrusive			dendritic cells (M.S. unpublished), MyoII-inhibited neutrophils [16] and T cells [17]	nematode sperm [21,46], MyoII-inhibited <i>Dictyostelium</i> [18,20]
III 2D contractile				<i>Dictyostelium</i> [20,23]
IV 3D			dendritic cells [19], neutrophils [19], B lymphoblasts [19], T lymphoblasts [39]	<i>Fundulus</i> deep cells [26]
V 3D protrusive			MyoII-inhibited dendritic cells [19] and neutrophils [19]	
VI 3D contractile			LatB-treated dendritic cells (Suppl. Video2, Fig. 1B)	zebrafish PGCs [25], <i>Fundulus</i> deep cells [24,26], amoeboid tumor cells (see references in Box 1)

Adhesion

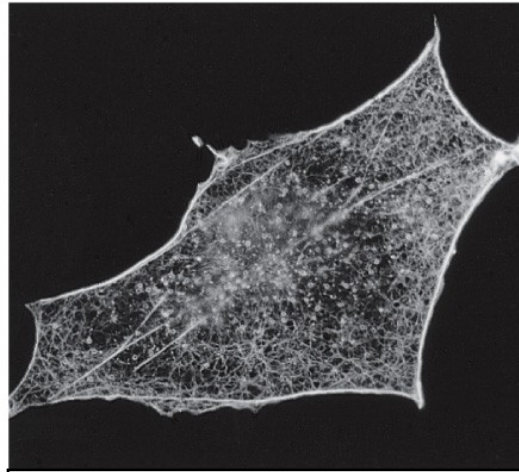
Protrusion

Contraction

# Význam malých GTPáz v regulaci dynamiky cytoskeletu a migrace

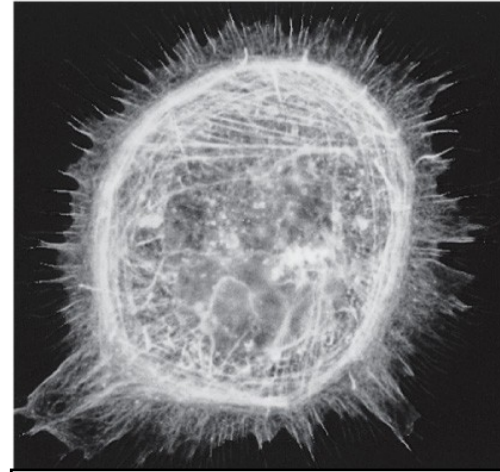


actin staining



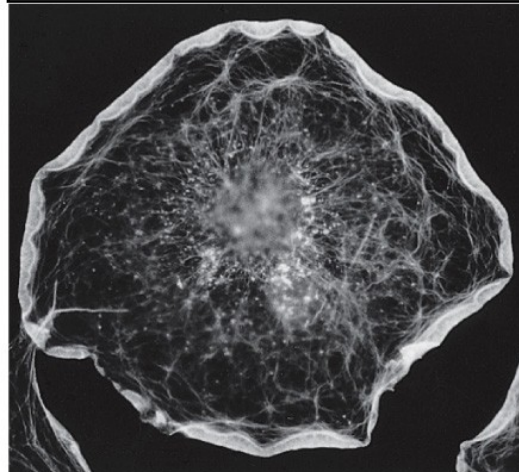
Klidová buňka

actin staining



Filopodia

fimbrin

Arp2/3  
filamin

Lamelipodia



Stresová vlákna

non-muscle  
Myosin II  
 $\alpha$ -actinin

# MALÉ GTPÁZY Z RHO RODINY JSOU KLÍČOVÉ REGULÁTORY CYTOSKELETU

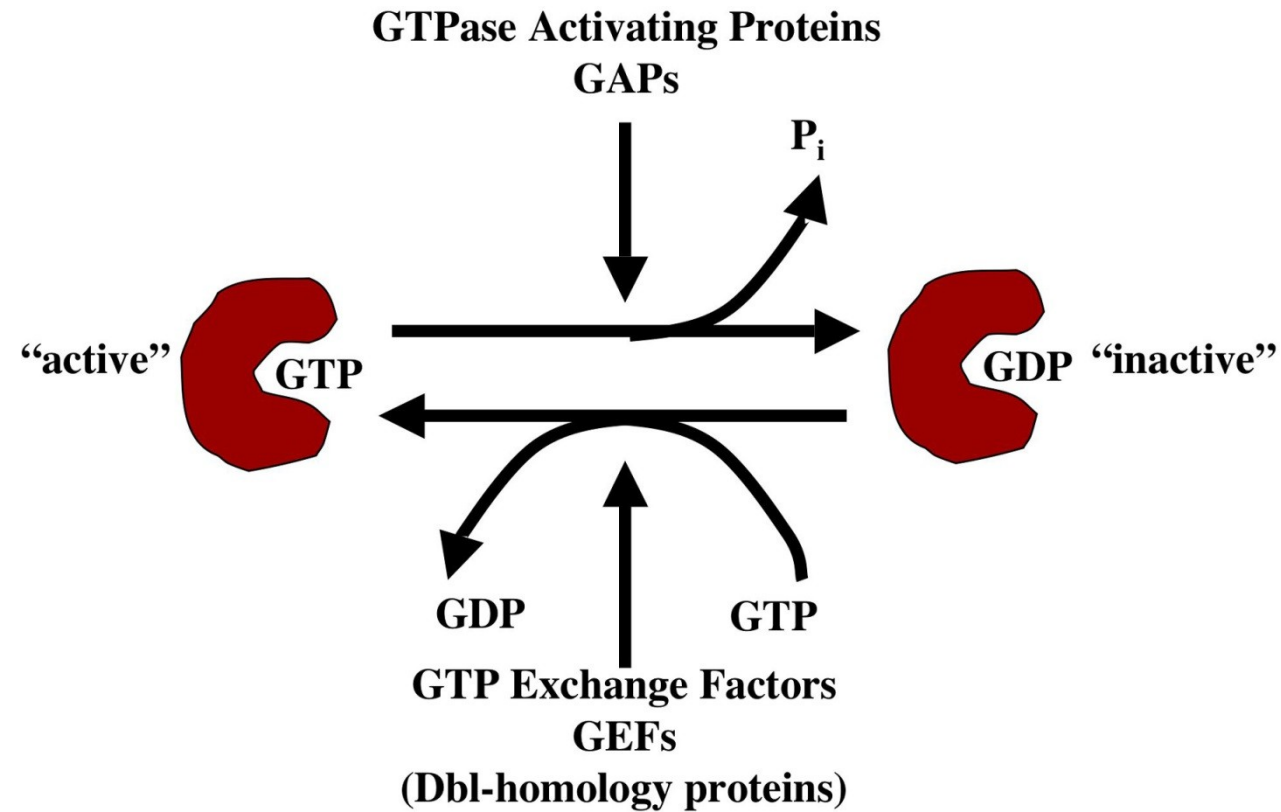


Figure 16-84 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# MALÉ GTPÁZY Z RHO RODINY JSOU KLÍČOVÉ REGULÁTORY CYTOSKELETU

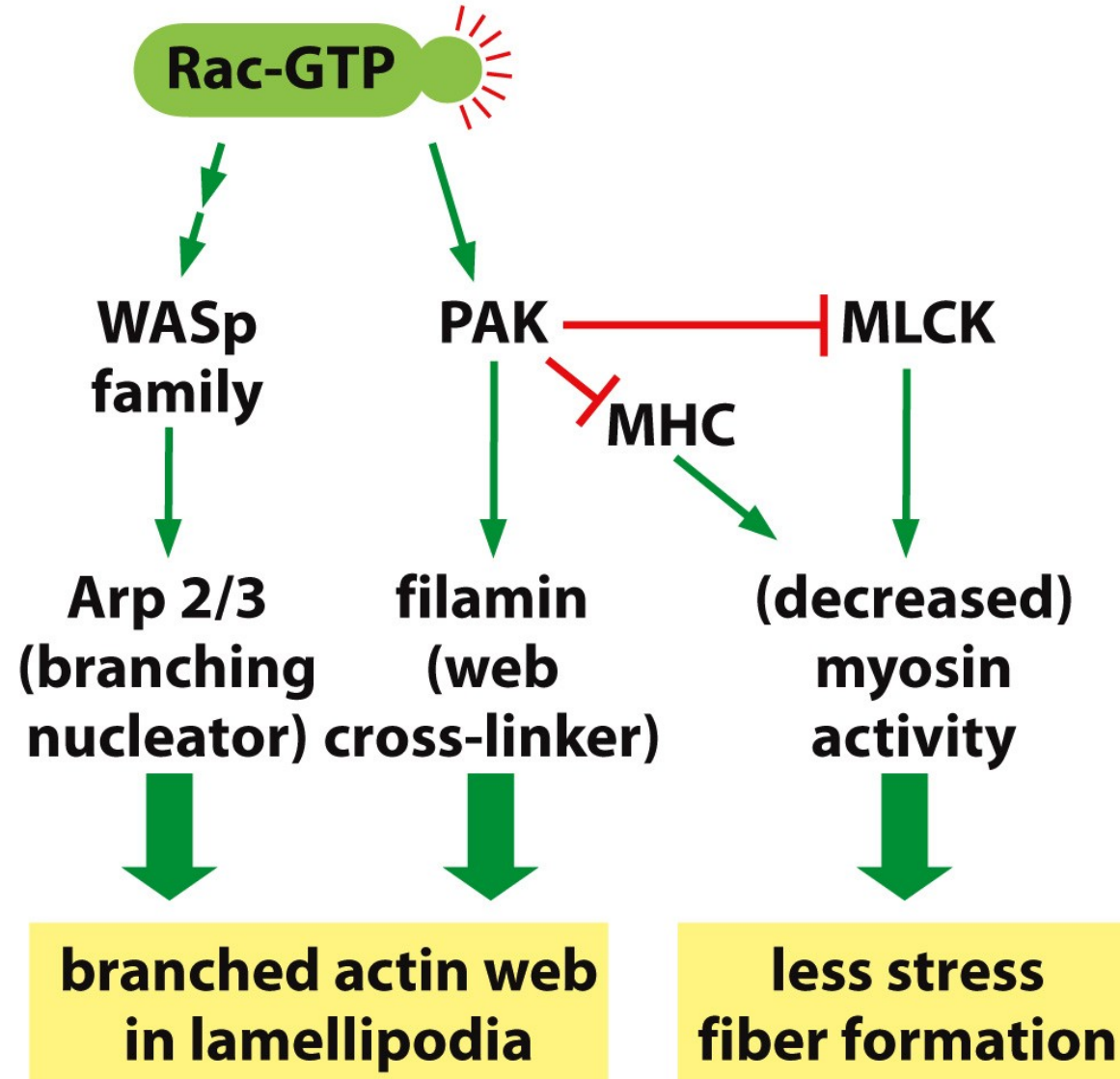


Figure 16-85a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



# MALÉ GTPÁZY Z RHO RODINY JSOU KLÍČOVÉ REGULÁTORY CYTOSKELETU

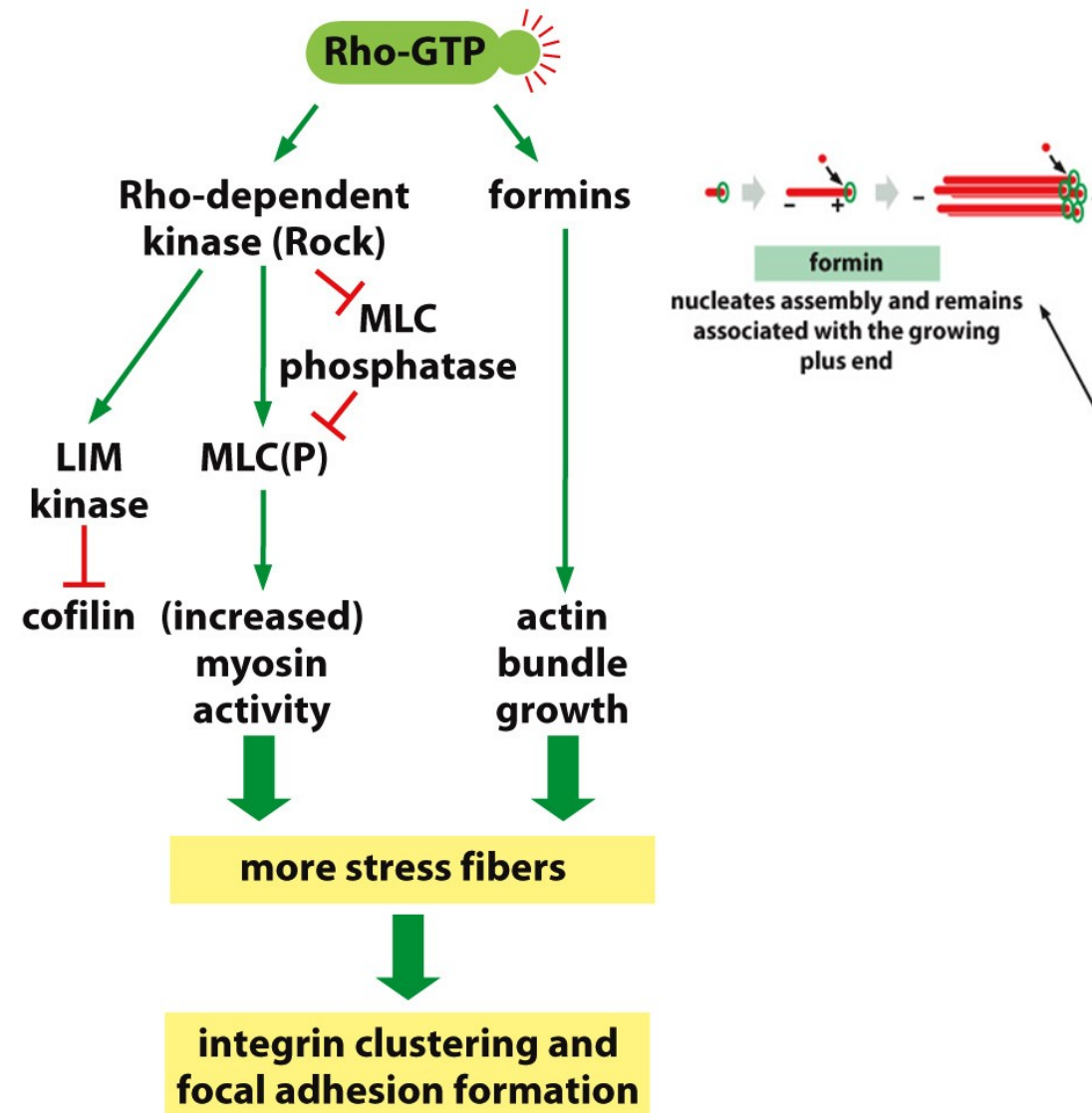
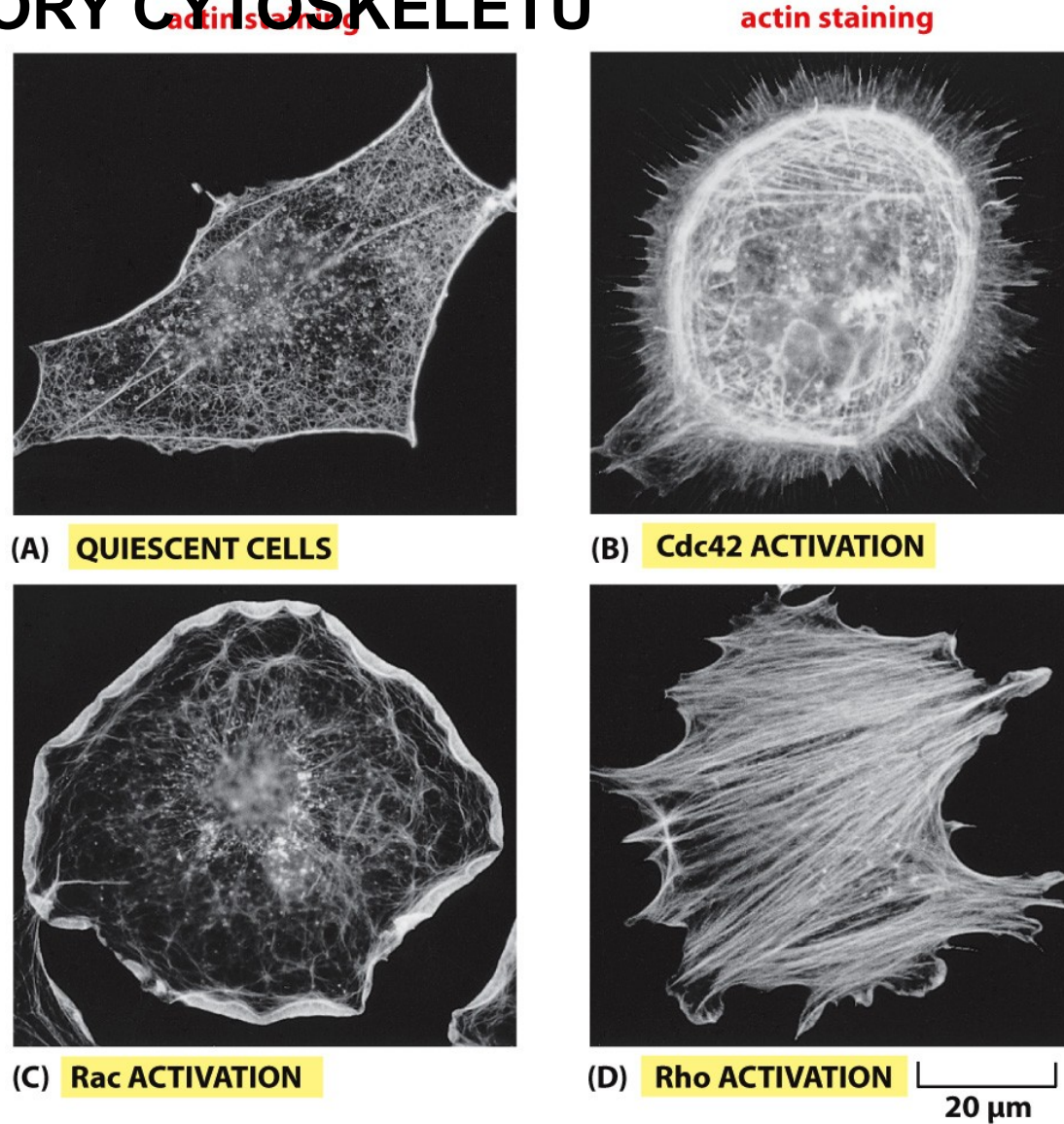


Figure 16-85b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# MALÉ GTPÁZY Z RHO RODINY JSOU KLÍČOVÉ REGULÁTORY CYTOSKELETU

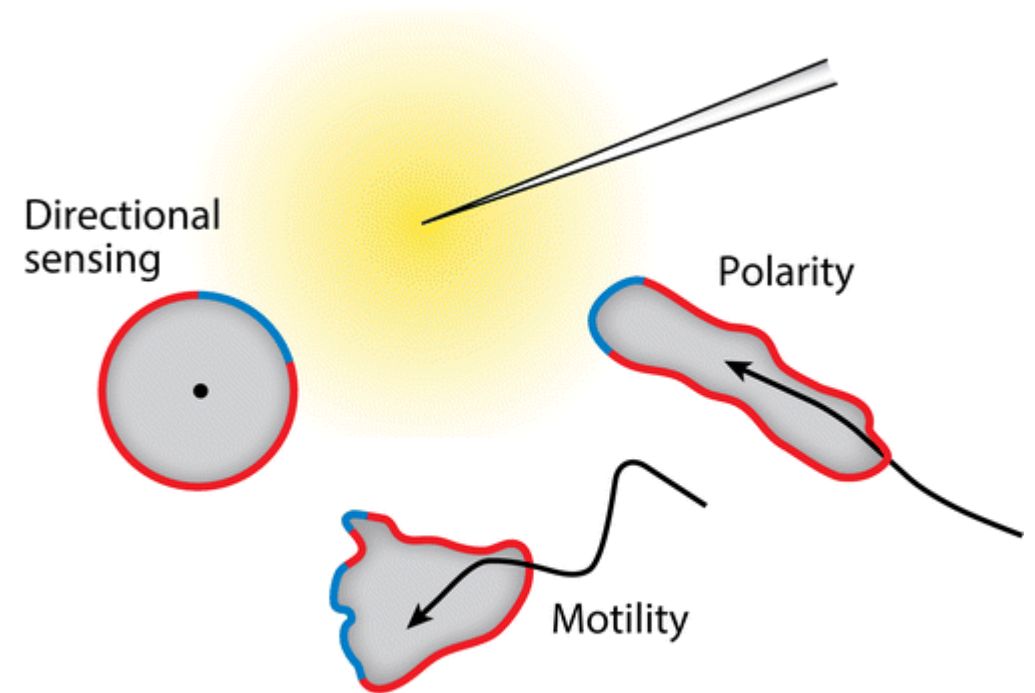


# **Navigace buněčné migrace alias určení směru**



# INICIACE BUNĚČNÉ MIGRACE

- Migrace buněk je určena 3 aspekty:
  - Směrové vnímání (schopnost vnímat směrované signalizace – př. gradient chemokinu)
  - Buněčná polarita (schopnost morfologické a funkční polarizace: leading edge vs. trailing edge)
  - Motilita (samotná schopnost pohnout se z místa)



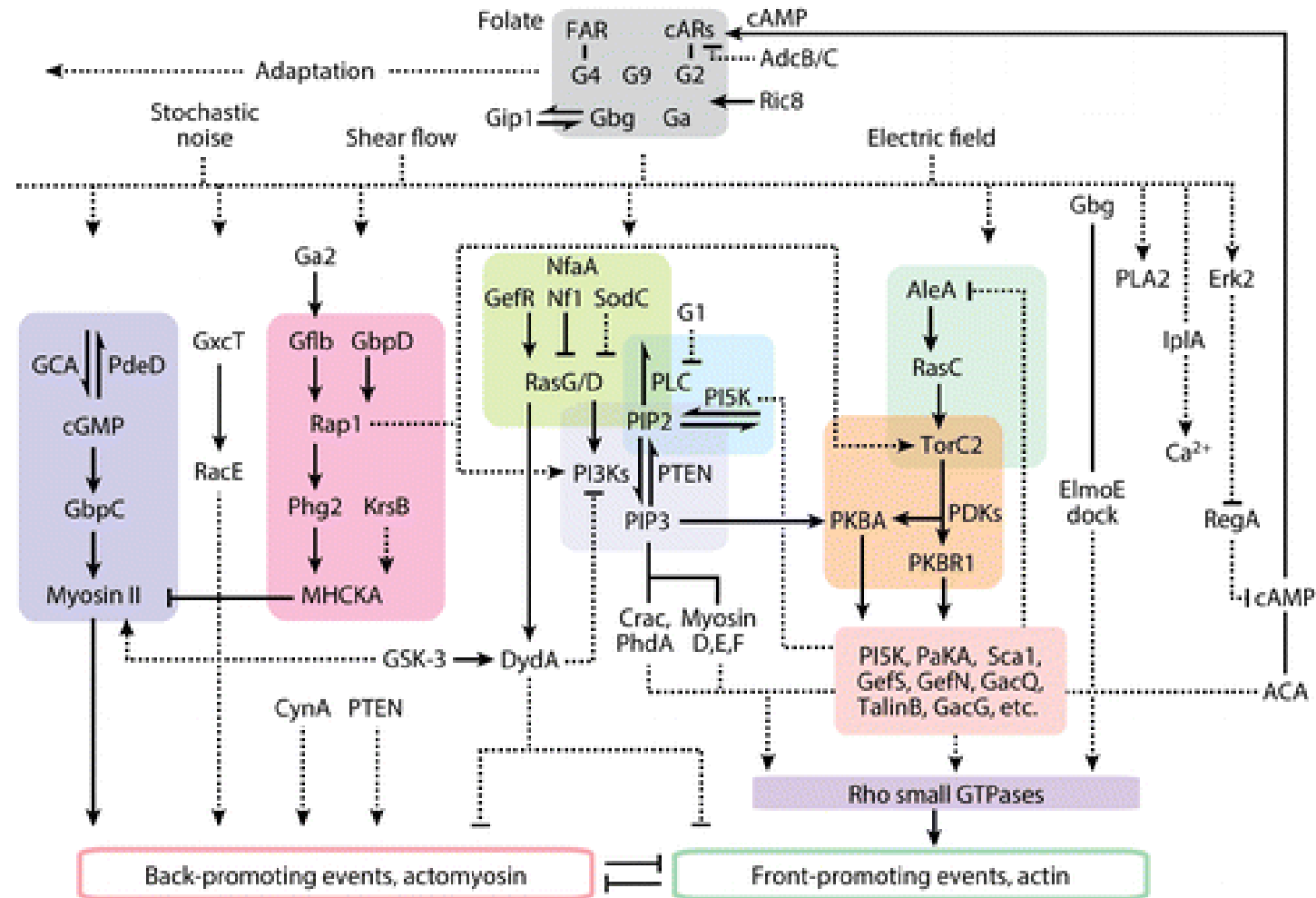
AR Devreotes PN, et al. 2017.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33:103–25

# INICIACE BUNĚČNÉ MIGRACE

- Směrové vnímání - Directional sensing
  - Nejlépe prostudován na hlence (*Dictyostelium discoideum*)
    - Jednoduchá kultivace, genové manipulace.
    - Robustní chemotaxe vůči cAMP.

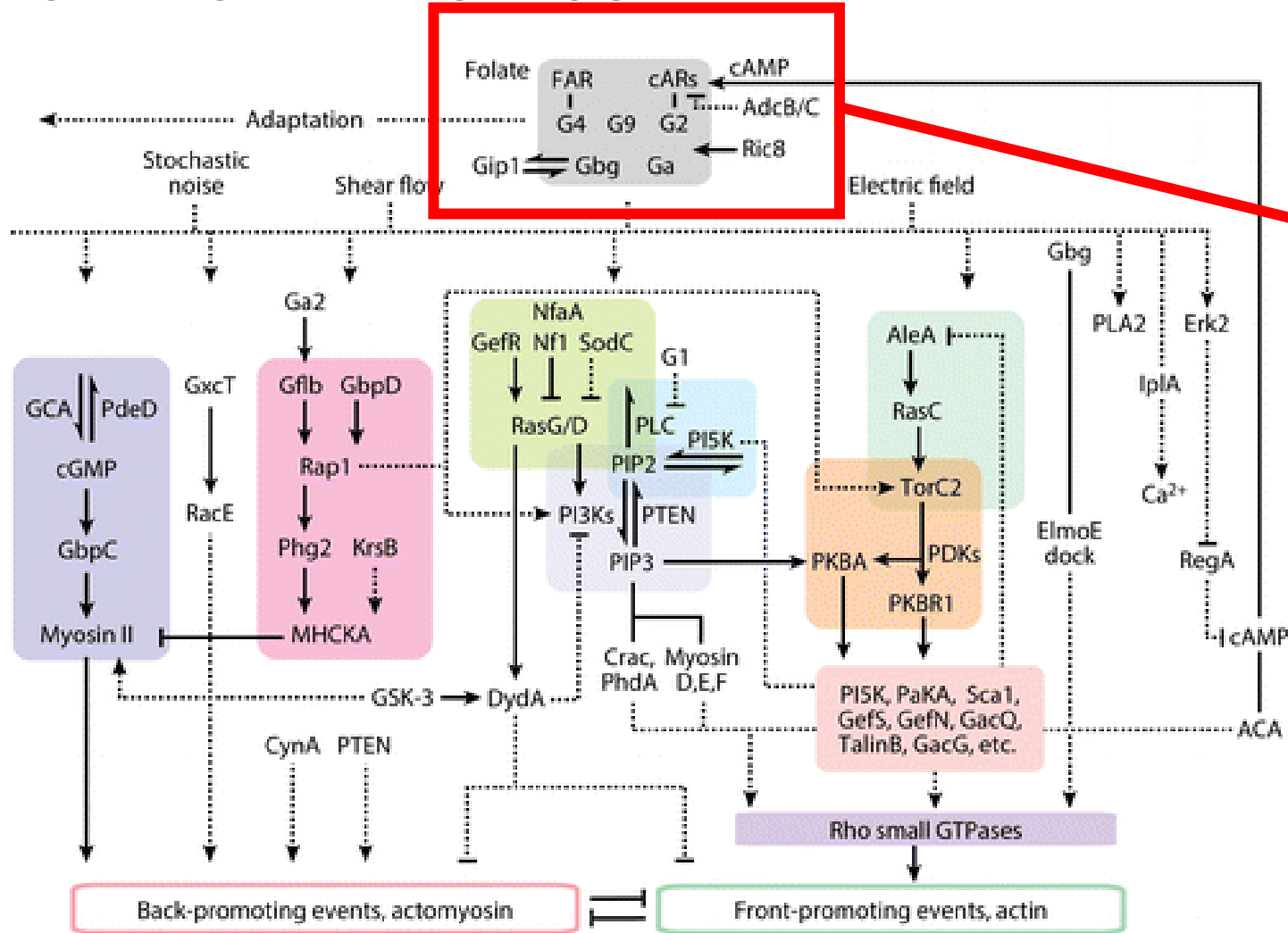


# PŘEHLED SIGNÁLNÍCH DRAH ŘÍDÍCÍCH INICIÁLNÍ PROCESY V CHEMOTAXI DICTYOSTELIA



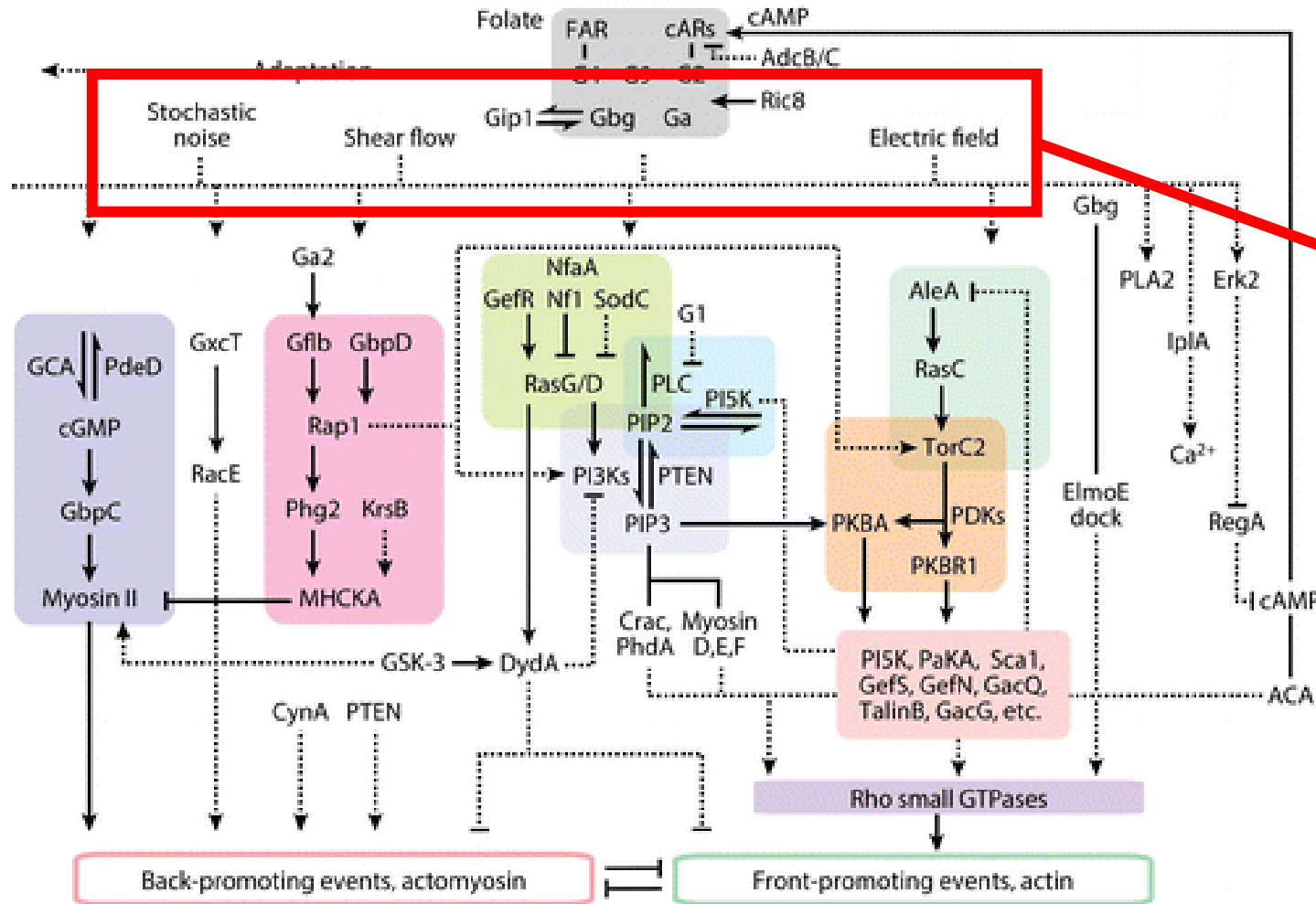


# PŘEHLED SIGNÁLNÍCH DRAH ŘÍDÍCÍCH INICIÁLNÍ PROCESY V CHEMOTAXI DICTYOSTELIA



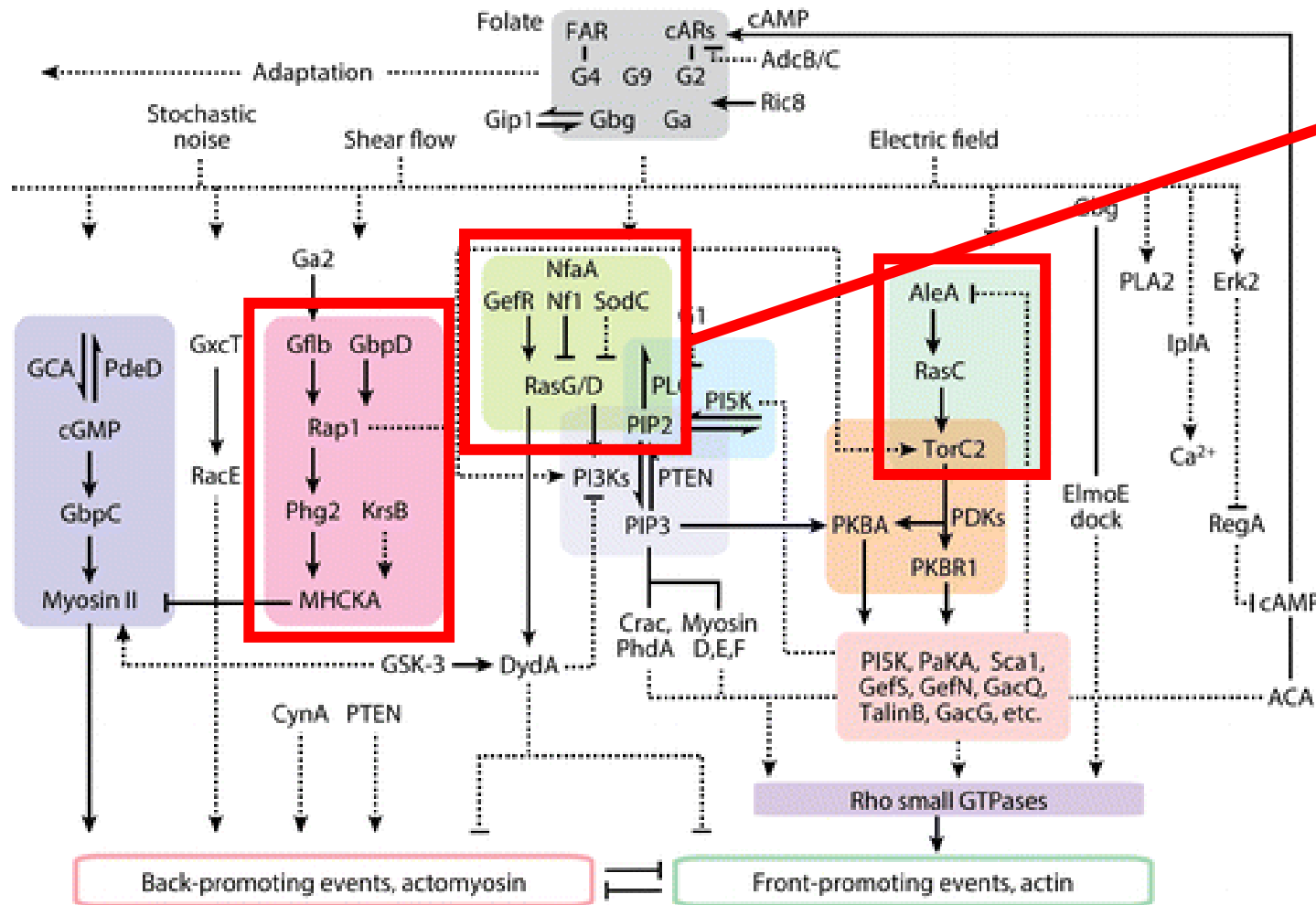
1a. cAMP je zachyceno jedním ze specifických GPCR, následuje celá řada downstreamových mechanismů, které svou integrací vytváří migrační fenotyp (obdoba chemotaxe u leukocytů – zde také specifické chemokinové GPCRs).

# PŘEHLED SIGNÁLNÍCH DRAH ŘÍDÍCÍCH INICIÁLNÍ PROCESY V CHEMOTAXI DICTYOSTELIA



1b. Buňky však nemusí být indukovány striktně jen specifickými chemokiny. Symetrii mohou porušit i fyzikální faktory, v některých případech stačí i sebemenší vzruch k polarizaci buňky (stochastic noise) – v takovém případě se buňky pohybují náhodně bez potřeby vnějšího směrování (kineze vs. taxe).

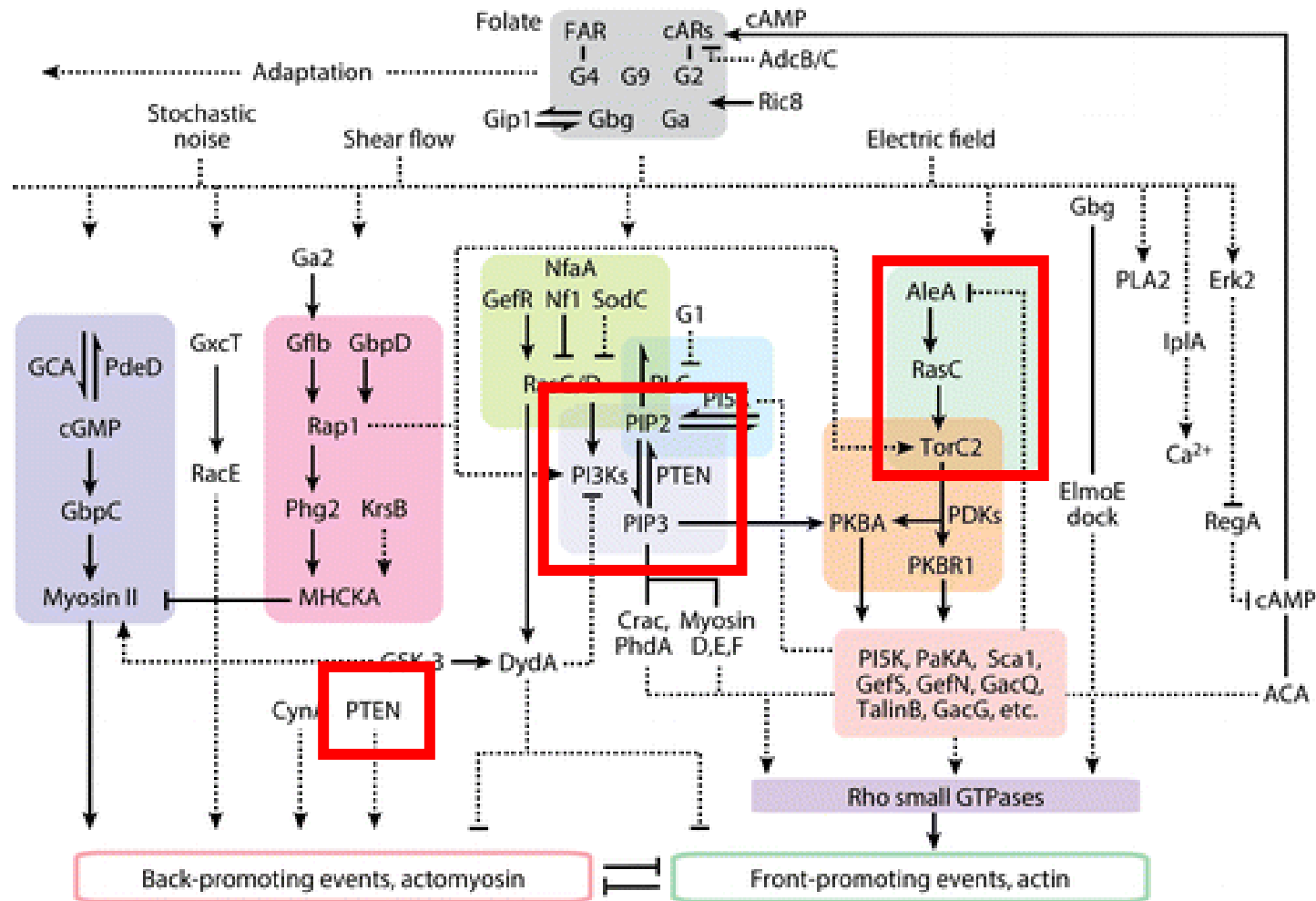
# PŘEHLED SIGNÁLNÍCH DRAH ŘÍDÍCÍCH INICIÁLNÍ PROCESY V CHEMOTAXI DICTYOSTELIA



2. Následuje aktivace druhých poslů, velmi důležitá je role malých GTPáz z rodiny Ras. Řada z nich je polarizována i v leukocytech (např. **Rap1**)

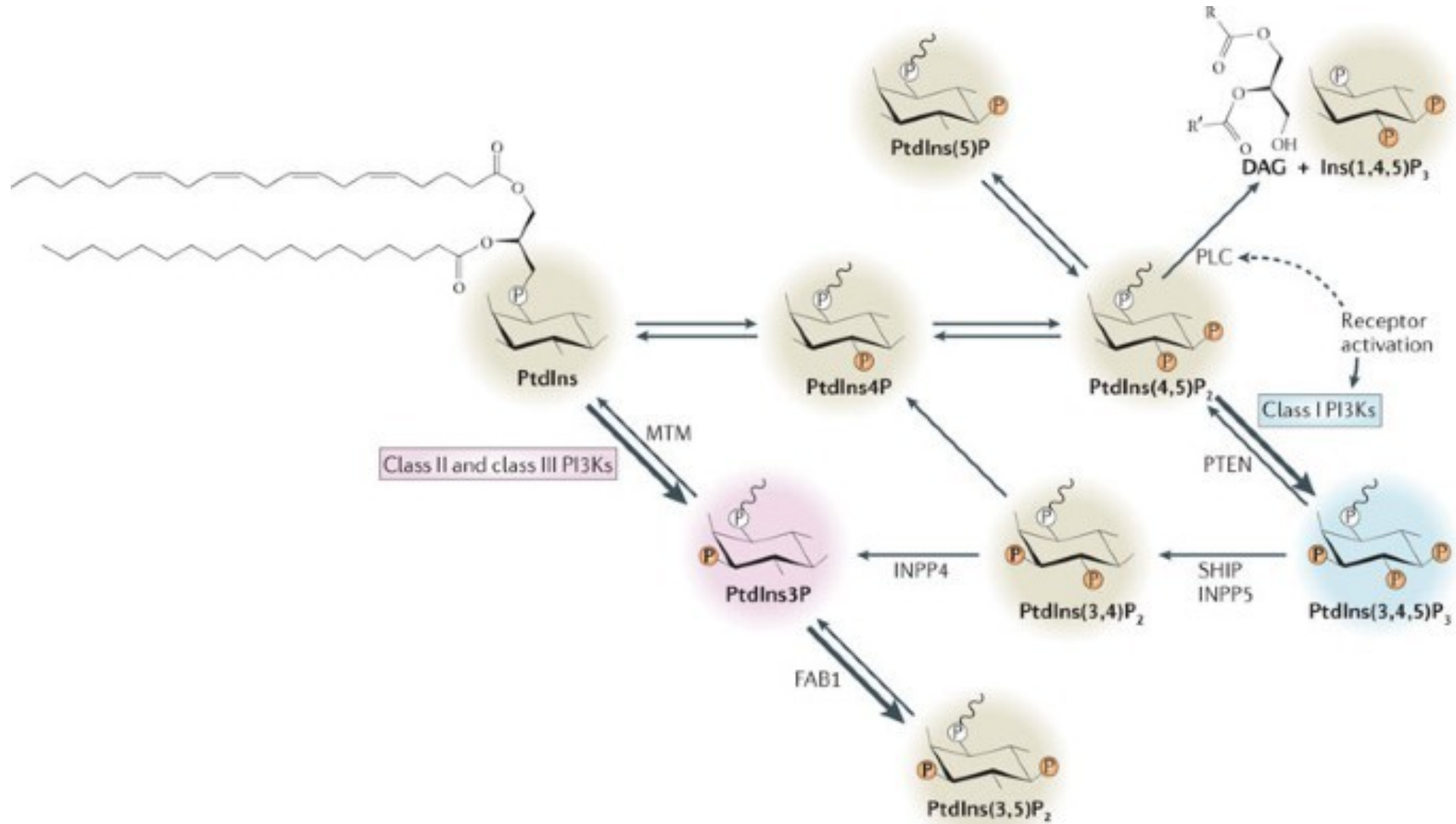


# PŘEHLED SIGNÁLNÍCH DRAH ŘÍDÍCÍCH INICIÁLNÍ PROCESY V CHEMOTAXI DICTYOSTELIA



3. Centrální roli v iniciaci migrační polarity má PI3K signalizace. PI3K se uplatňuje v tzv. modelu **lokální excitace – globální inhibice**.

# Fosfoinositoly:



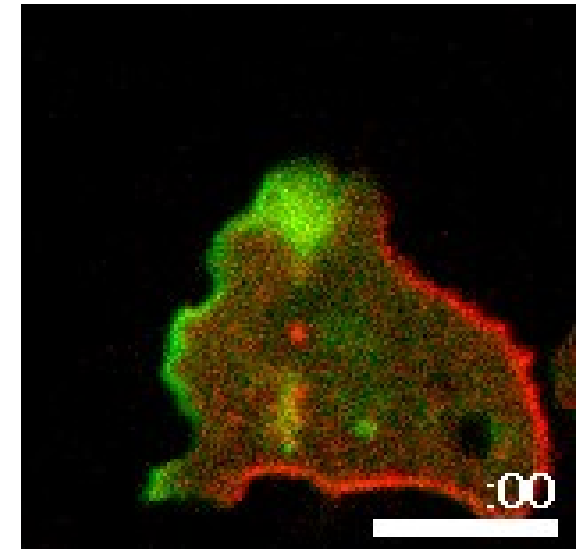
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

kyselina fosfatidová = glycerol-3-fosforečná kyselina

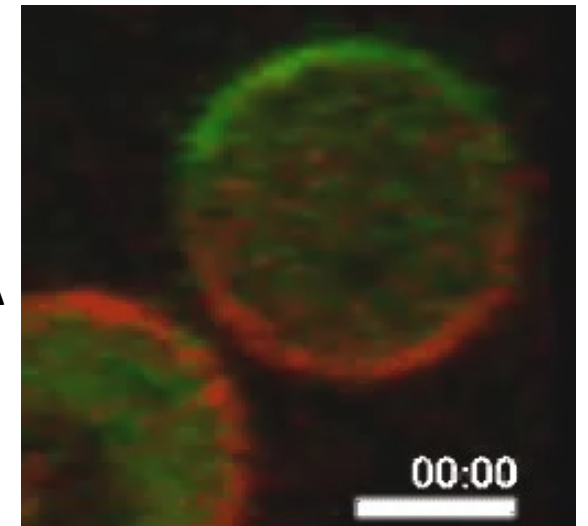
# POLARITA FOSFOINOSITOLŮ U DICTYOSTELIUM

- PI3K signalizace
  - Lokálně aktivovaná PI3K fosforyluje na buněčné membráně fosfatidylinositoldifosfát (PIP2) na trifosfát (PIP3)
  - PIP3 se na vnitřní straně b. membrány akumuluje a umožňuje navázání dalších specifických proteinů do této části membrány → polarizace
    - Některé proteiny obsahují domény, které specificky rozeznávají určitý PIP. Např. plekstrin-homology (PH) domény aj. Tyto domény je možné využít k detekci jednotlivých PIPů
    - Aby PIP3 nepokryl celý povrch buňky, je potřeba tzv. globální inhibitor. Tím je fosfatáza PTEN, která je bazálně přítomná v buňce a konvertuje PIP3 zpět na PIP2.
- Kombinací lokální aktivity PI3K a globální inhibice PTEN vzniká zárodek buněčné polarity.
- Deaktivací PTEN vzniká více konkurenčních protruzí, což zamezuje migraci.
- U vyšších živočichů to funguje principiálně podobně, avšak tvorba membránových domén podléhá komplexnější regulaci (např. deaktivace samotného PTEN nestačí k disruptci polarity).

PH-Akt  
PTEN



+ Latrunculin A

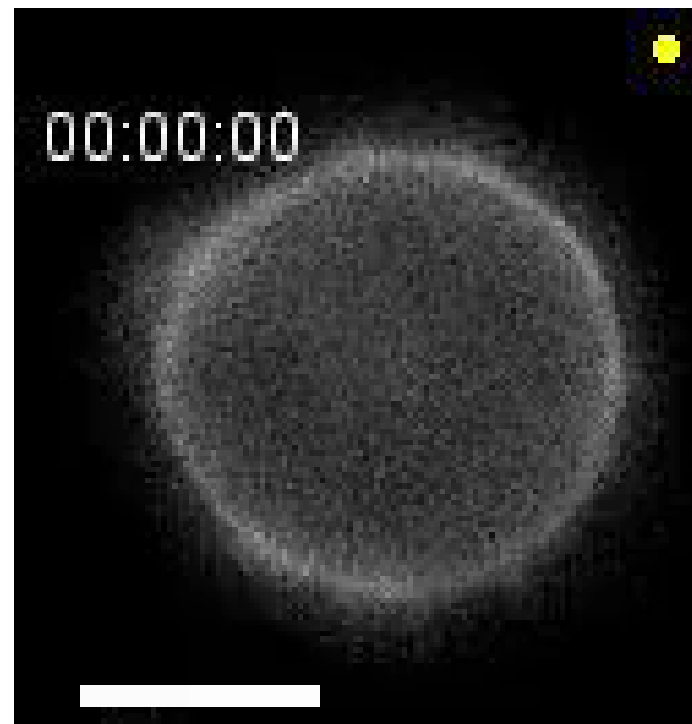
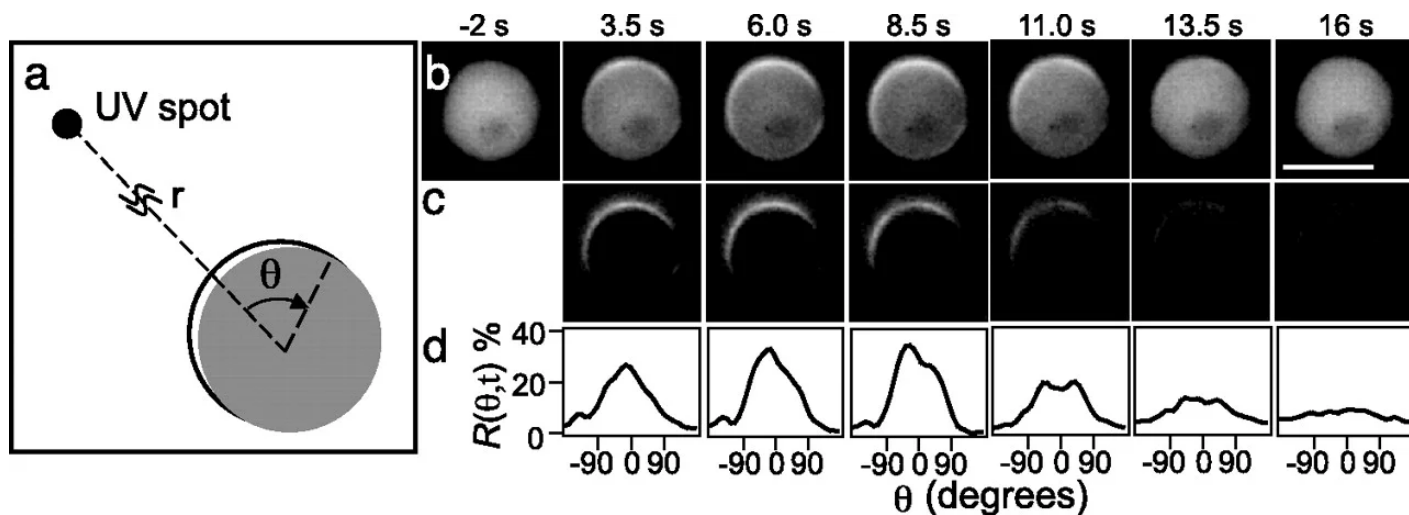




# NEZÁVISLOST PIP POLARITY NA AKTINOVÉM CYTOSKELETU

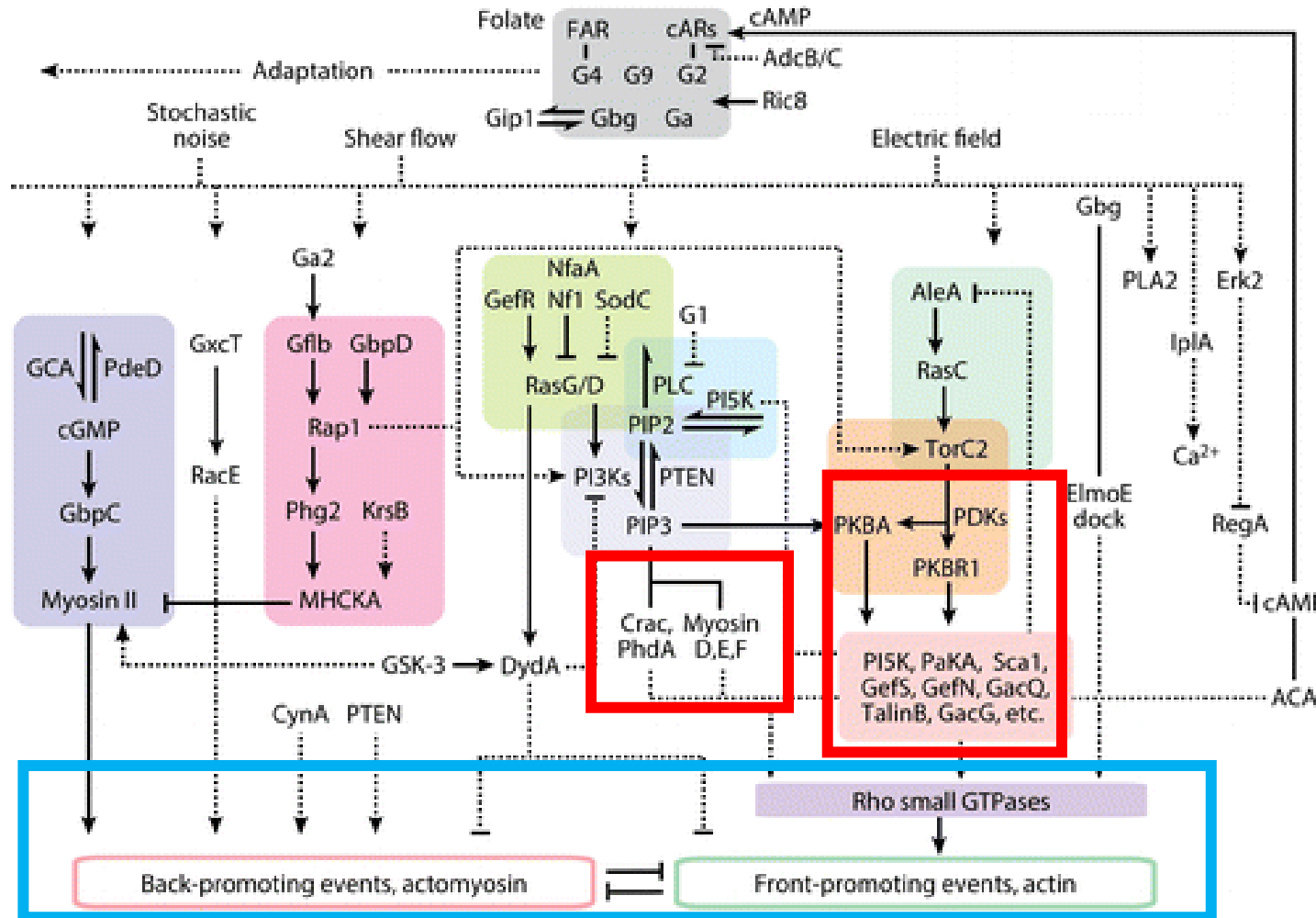
Lokální stimulací signalizace v buňkách ošetřených latrunculinem, lze pozorovat směrovanou polarizaci jednotlivých polarizačních komponent, která je nezávislá na aktinovém kortexu (předchází jeho funkční přestavbě).

Protein CRAC (váže specificky PIP3 pomocí PH domény)



Protein CynA (váže specificky PIP2)

# PŘEHLED SIGNÁLNÍCH DRAH ŘÍDÍCÍCH INICIÁLNÍ PROCESY V CHEMOTAXI DICTYOSTELIA

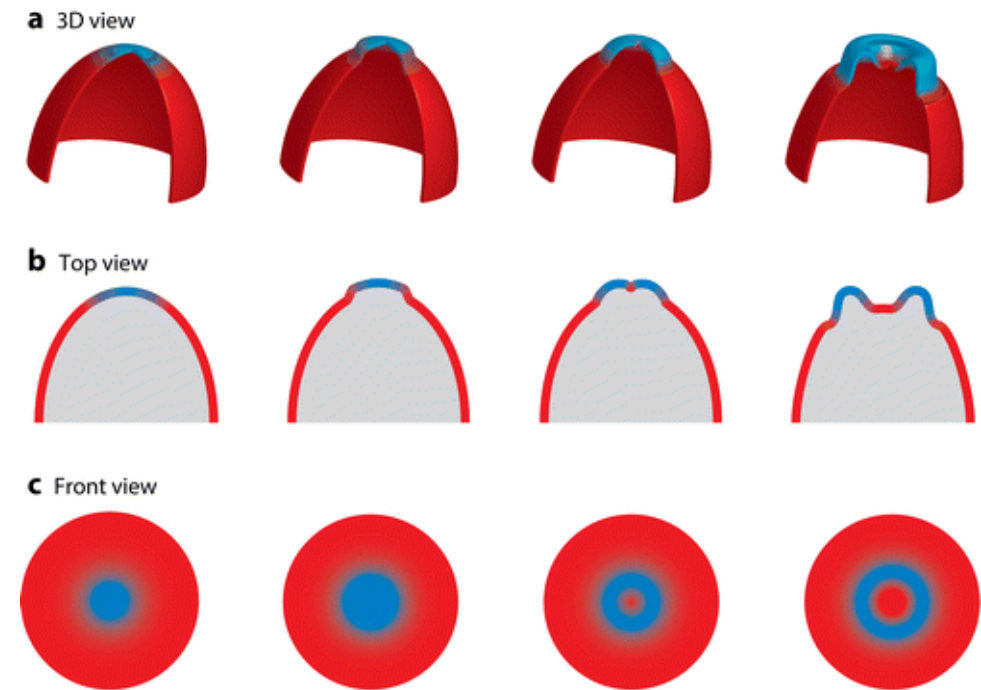


4. Fosfatidylinositolová polarita umožňuje lokalizaci dalších signálních molekul na membránu pomocí specifických domén. Např. PKB (Akt), GEFů a GAPů.

5. Polarizovaná aktivita GEFů a GAPů umožňuje polarizovanou aktivitu malých GTPáz z rodiny Rho: RhoA, Rac1 a Cdc42 – klíčových regulátorů veškerých polaritních a migračních procesů.

## STEJNÉ SIGNALIZACE/RŮZNÉ PROTRUZE

- Pokud jsou téměř totožné signalizace zapojené v migraci buněk napříč eukaryoty, jak je možné, že vidíme takovou diverzitu v morfologii a dynamice buněčných protruzí?
- Je to právě komplexitou zpětných vazeb mezi signálními drahami a cytoskeletem. Signální dráhy jako PI3K a aktinový cytoskelet představují tzv. excitabilní síť.
- Signál se buňkou šíří jako vlna, různé receptory však nemusí vytvořit stejně silný impulz. Stejně tak nemusí být počáteční nastavení buňky stejně permissivní (vlna rychleji zaniká). Profil vlny může být rovněž různý.



Devreotes PN, et al. 2017.  
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 33:103–25



# Migrace imunitních buněk

# JAK BUŇKA URČÍ SMĚR?

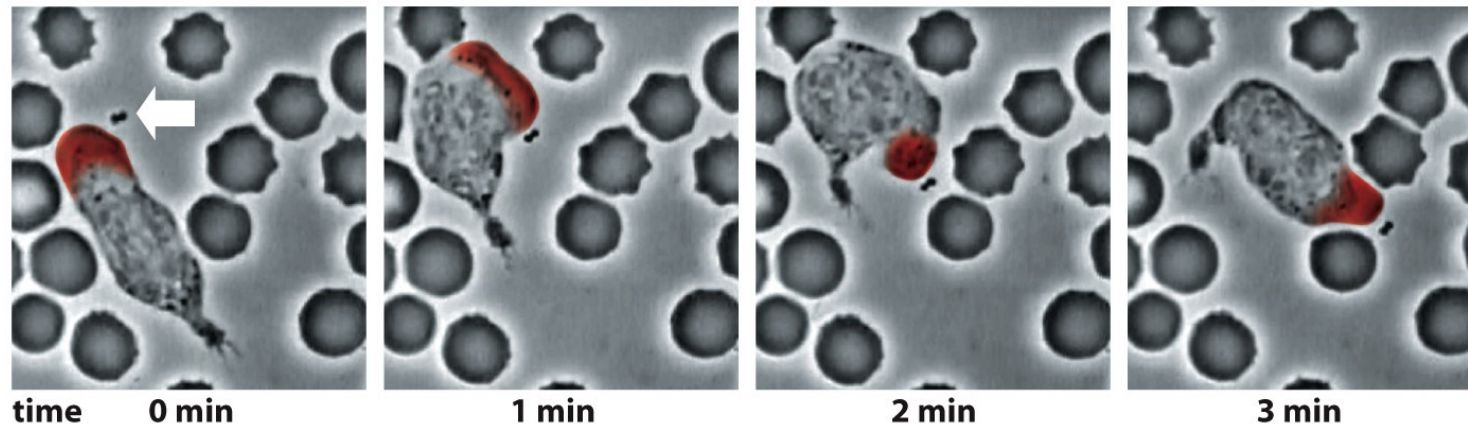


Figure 16-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

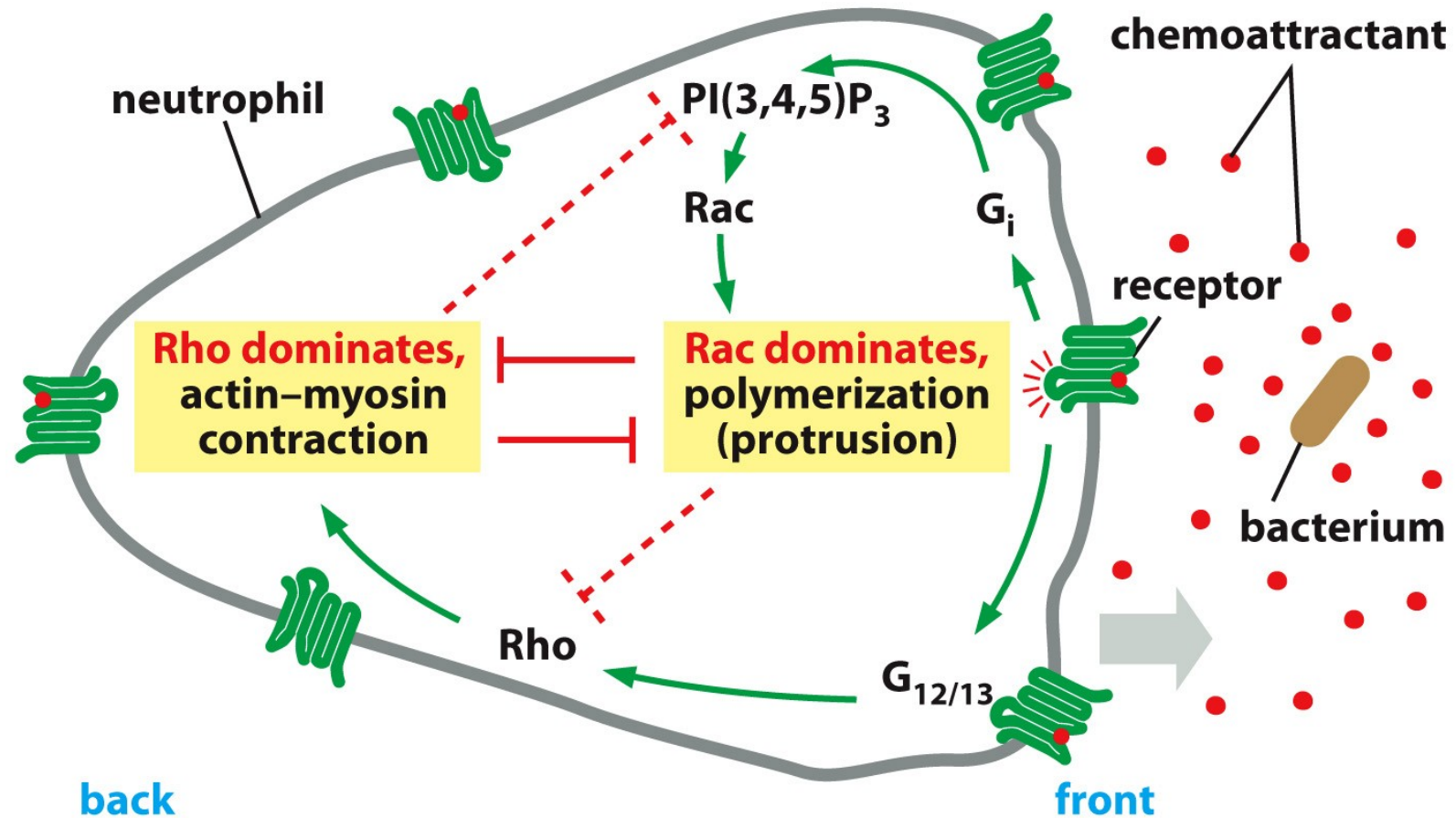



Figure 16-86b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



# MODEL: LYMFODNÍ BUŇKY

- T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK buňky (plus jejich prekurzory)
- Co mají lymfoidní buňky společného?
  - Migrační fenotyp
  - Schopnost vytvářet specifickou interakci (synapsi) s cílovou buňkou, zahrnující endo/exocytózu cílových molekul.

# MIGRAČNÍ FENOTYP LYMFOIDNÍCH BUNĚK

- Leading edge
  - Chemokinové receptory
  - Podjednotky integrinu LFA1
- Buněčné jádro zabírá většinu cytoplazmy buňky a je stejně jako u DC používáno k mechanickému prohledávání cesty.
- Uropod (trailing edge)
  - IgCAMs – ICAM1, VCAM-1
  - CD44, CD43

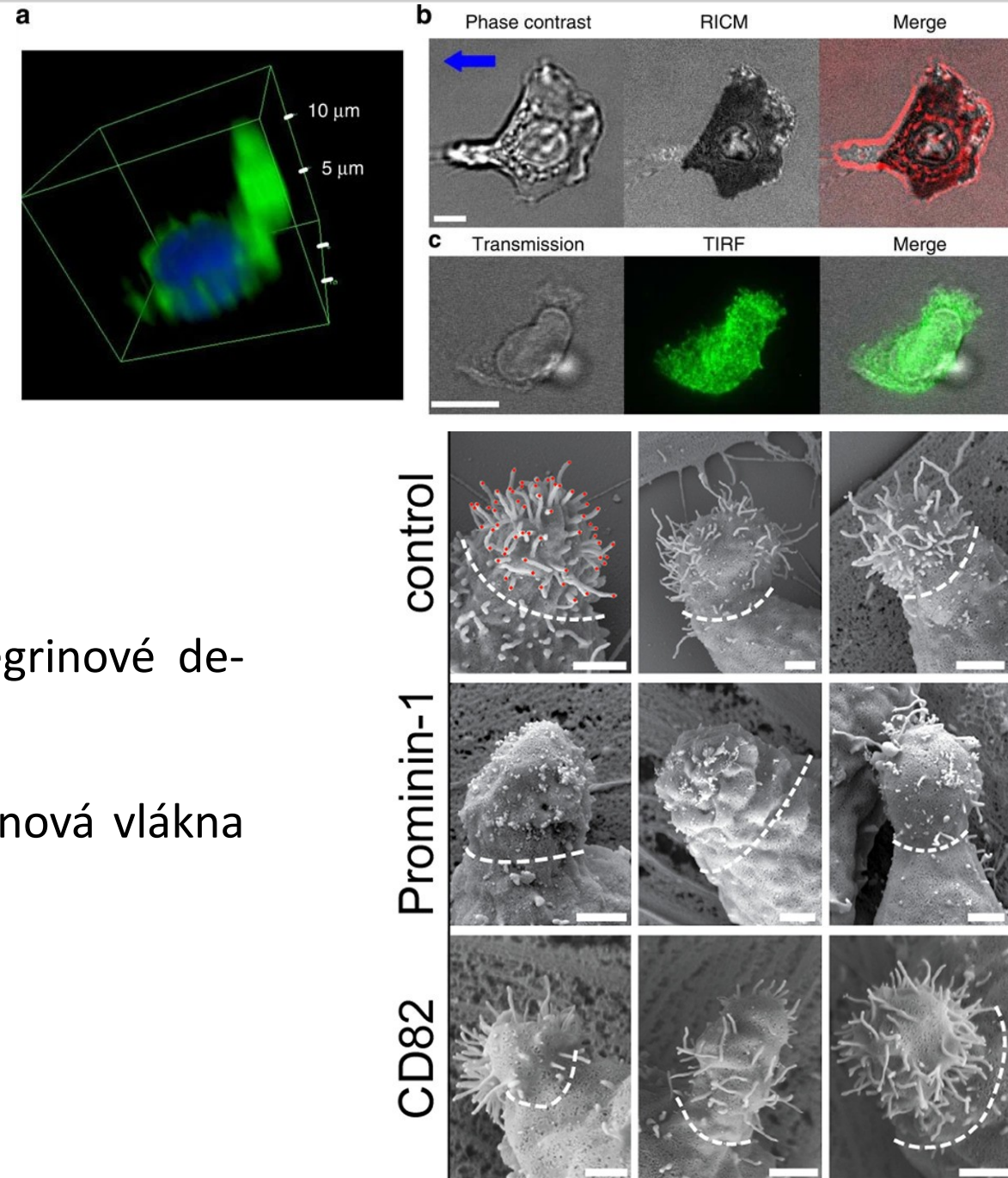
propojeno s aktinovým cytoskeletem pomocí ERM proteinů
- Centrosom je orientován dozadu, spolu s ním i Golgiho aparát a endocytární aktivita

# UROPOD

- Striktně jedině u leukocytů
- CD44 and ERM proteiny jsou markery
- ICAM1-3 lokalizované molekuly
- Microvilli, mezibuněčné kontakty
- Neadherentní, **NEJEDNÁ** se o oblast integrinové adheze
- Vysoký obsah RhoA, ale žádná aktomyozinová vlákna (endocytóza?)

<https://www.nature.com/articles/ncomms6213>

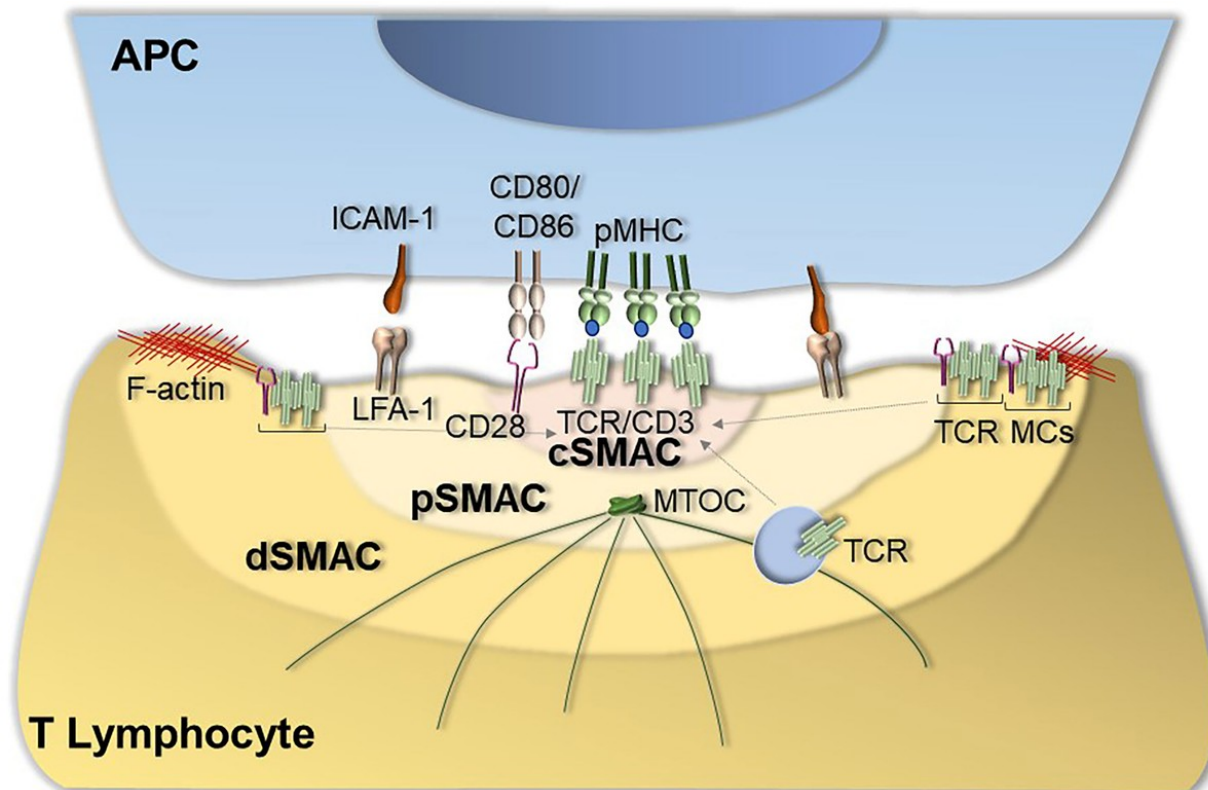
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tra.12618>





# IMUNOLOGICKÁ SYNAPSE A REPOLARIZACE LYMFODINÍCH BUNĚK

- Imunologická synapse, také nazývaná imunosynapse, je speciální druh kontaktního místa, které vzniká během imunitní reakce, zejména při interakci mezi T-lymfocyty (T-buňky) a antigen-prezentujícími buňkami (APC), jako jsou dendritické buňky nebo makrofágy.
- Tato struktura je klíčovým prvkem komunikace mezi různými buňkami imunitního systému a je důležitá pro účinnou imunitní odpověď.



# IMUNOLOGICKÁ SYNAPSE A REPOLARIZACE LYMFOIDNÍCH BUNĚK

- PI3K, tvorba kontraktilního aktinového prstence
- Repolarizace endocytického aparátu
- Fokusace MTOC do místa extrakce antigenu nebo sekrece killer molekul
- Změna pozice organel (Golgi, jádro)

