

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 9.3.2011

# Cytoskelet, buněčné interakce a extracelulární matrix

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

## Program přednášky:

### 1. Cytoskelet

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

### 2. Mezibuněčné interakce a spoje

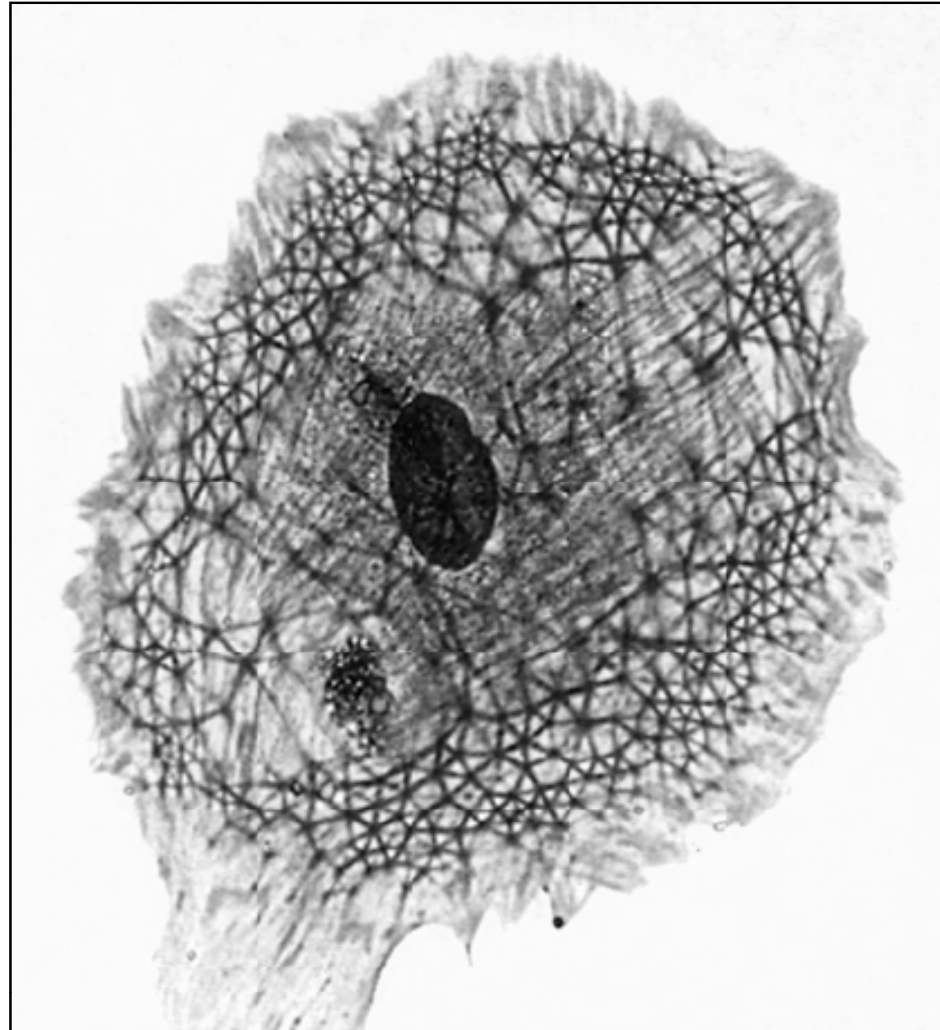
- medicínské aspekty – poruchy interakcí a spojů

### 3. Extracelulární matrix (ECM)

- medicínské aspekty – poruchy ECM

# CYTOSKELET:

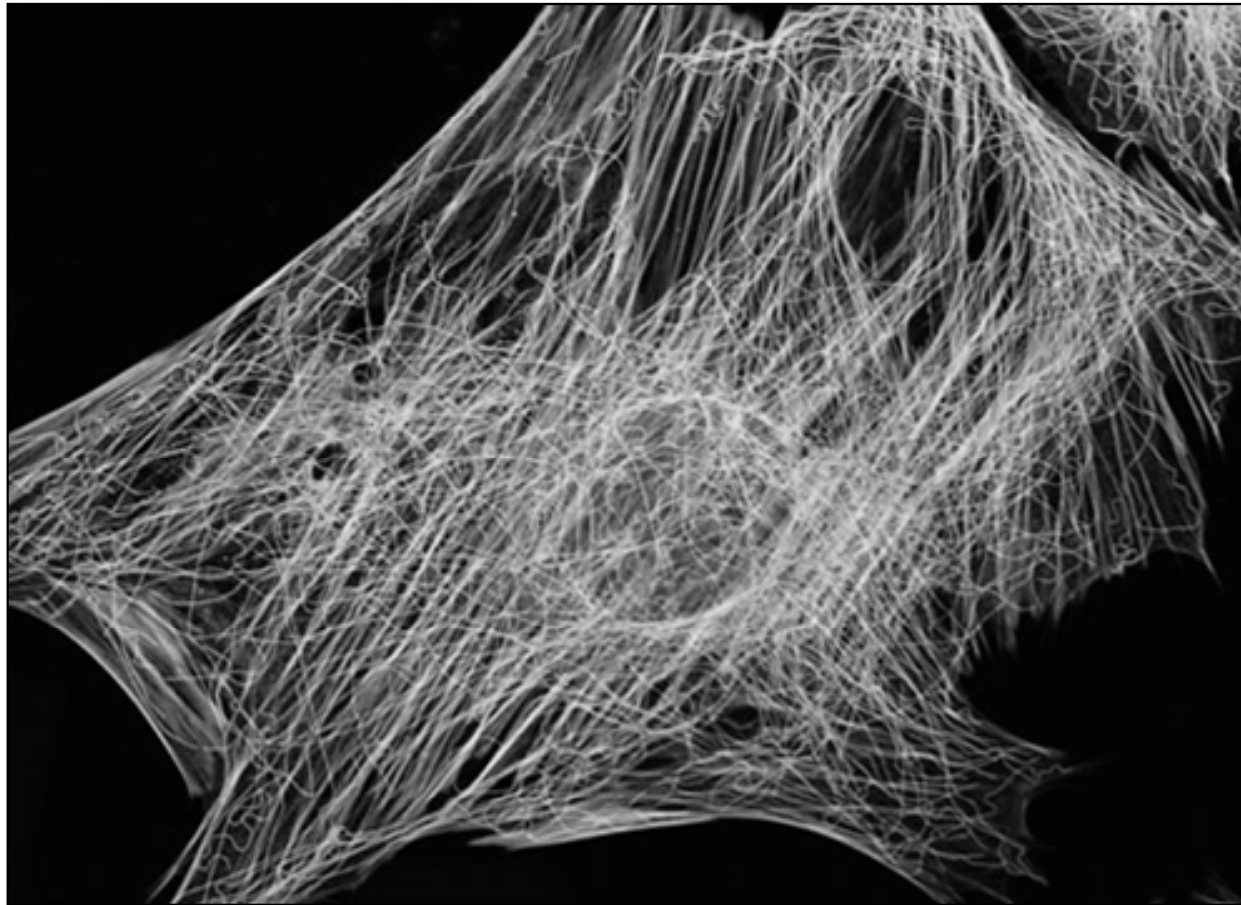
medicínské aspekty (diagnostika, poruchy)  
cytoskeletální toxiny (aplikace)



---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.





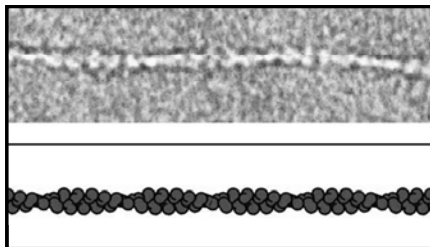
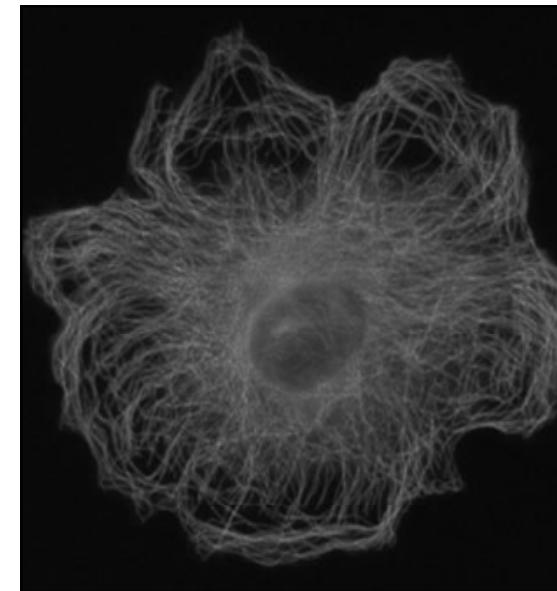
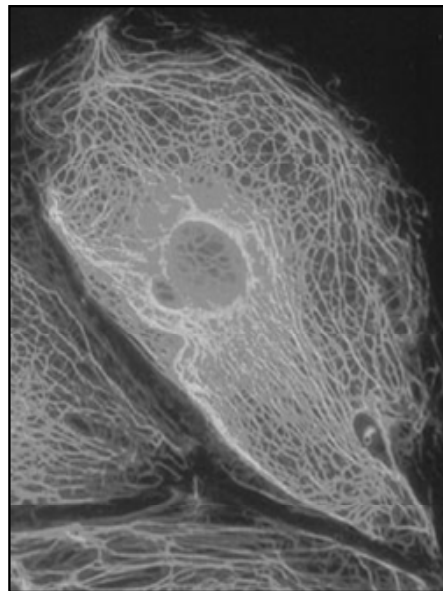
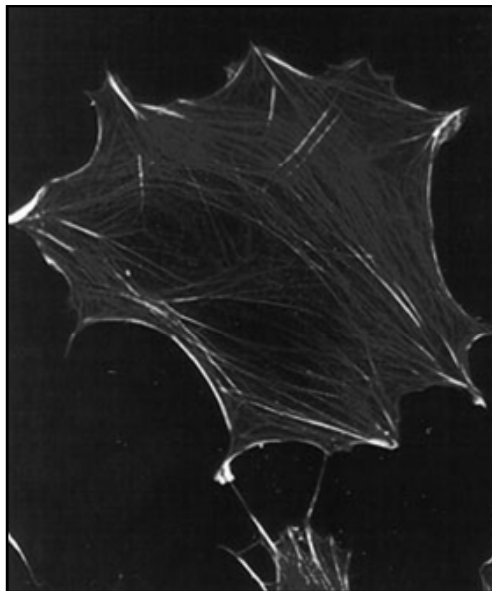
$\alpha$ -tubulin, F-aktin, DNA

---

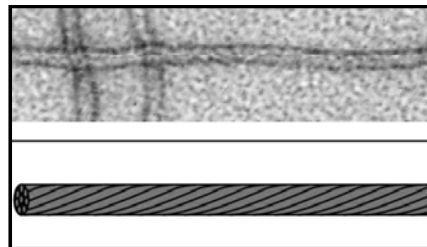
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

## Funkce cytoskeletu

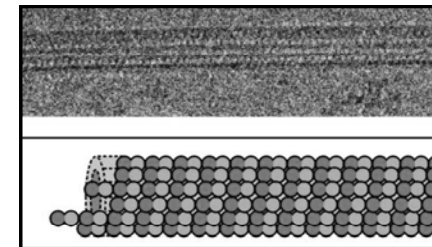
- morfologické / strukturální  
tvar buněk včetně cytoplazmatických protruzí,  
odolnost vůči vnějším mechanickým vlivům,  
vnitřní organizace buňky
- pohybové  
intracelulární transport, pohyb chromosomů v  
anafázi, pohyb buněk po substrátu, pohyb  
buněk pomocí kinocilií, svalová kontrakce



aktinová  
filamenta - AF  
(7 nm)



intermediární  
filamenta - IF  
(10 nm)

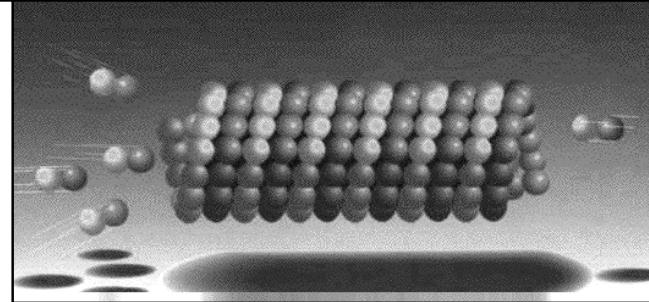


mikrotubuly - MT  
(25 nm)

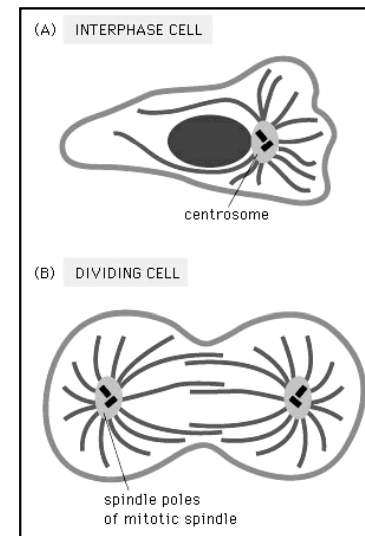
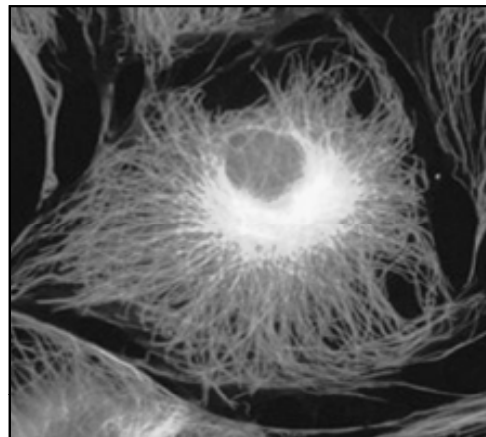
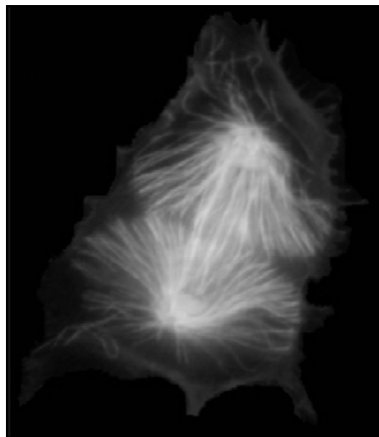
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

# MIKROTUBULY (MT)



- tubulin:  
v MT heterodimer:  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky  
 $\gamma$ -tubulin (pouze v MTOC)
- MTOC = mikrotubuly organizující centrum  
(centrosom, bazální tělíska)



## Typy mikrotubulárních struktur v živočišných buňkách a jejich funkce:

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

## Asociované proteiny (s MT) a jejich poruchy:

### Nemotorové AP:

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

### Motorové AP:

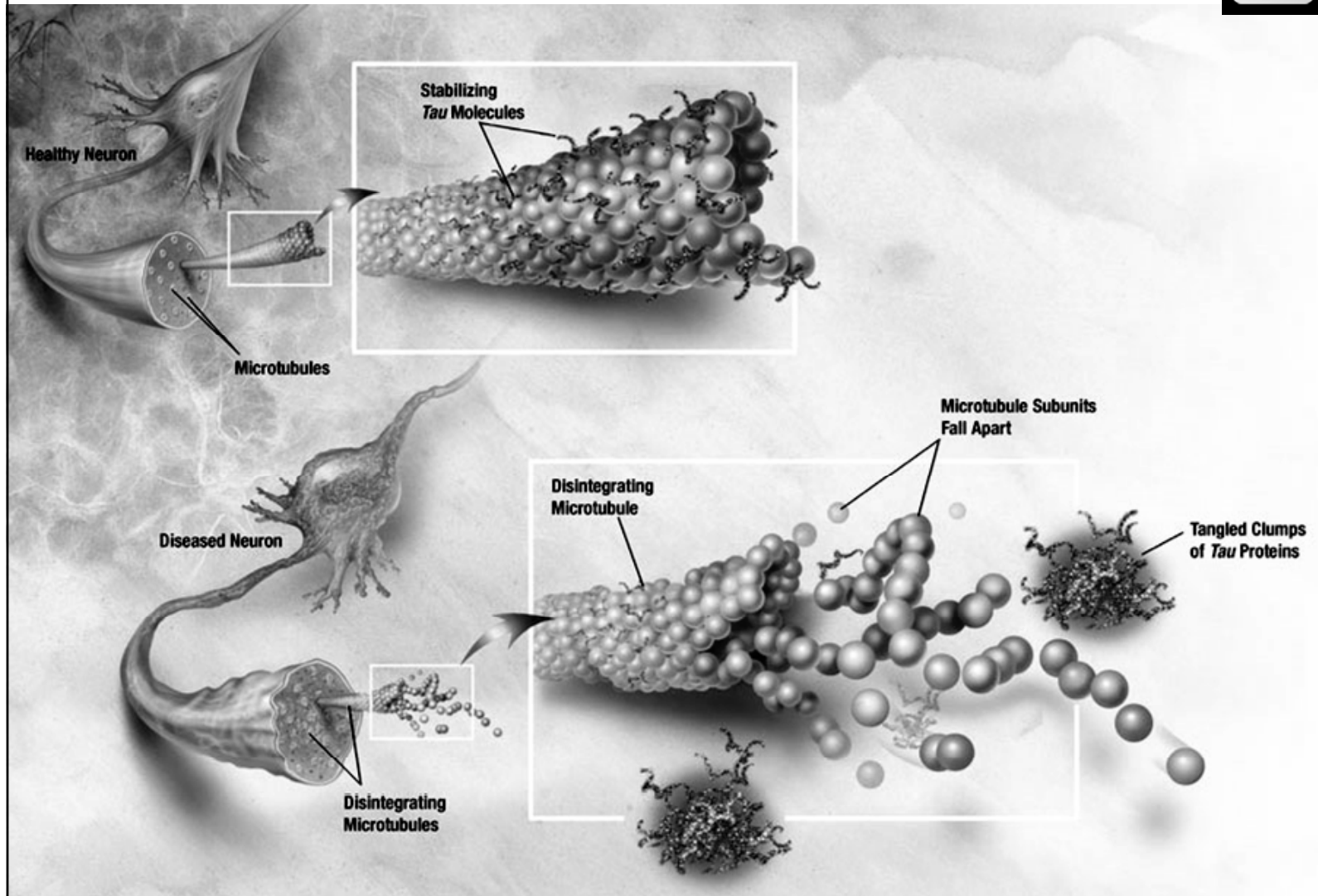
- ATP-ázová aktivita
- dyneiny (pohyb od + konce k – konci)
- kinesiny (pohyb od – konce k + konci)



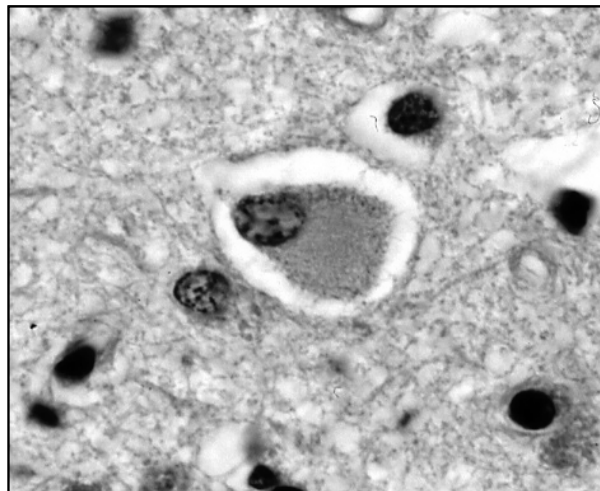
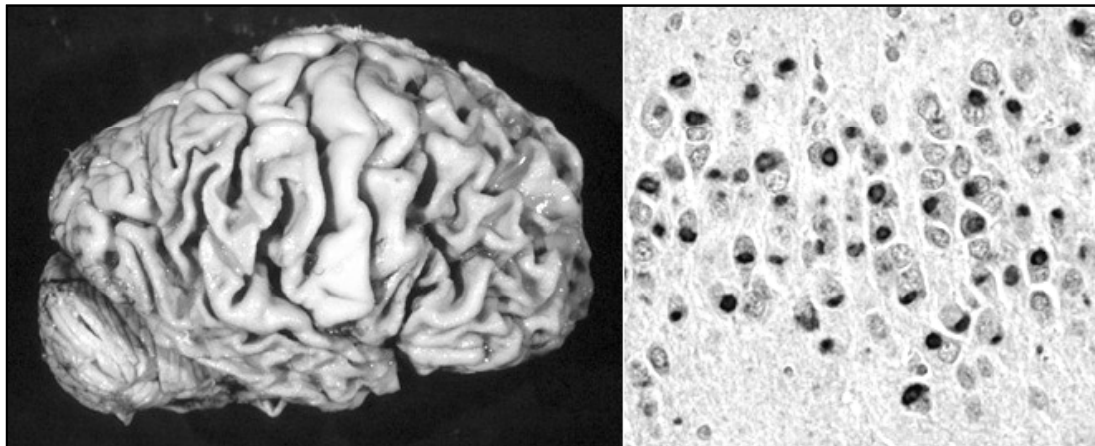
## Tauopatie

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

# Tauopathie







## Pick's Disease

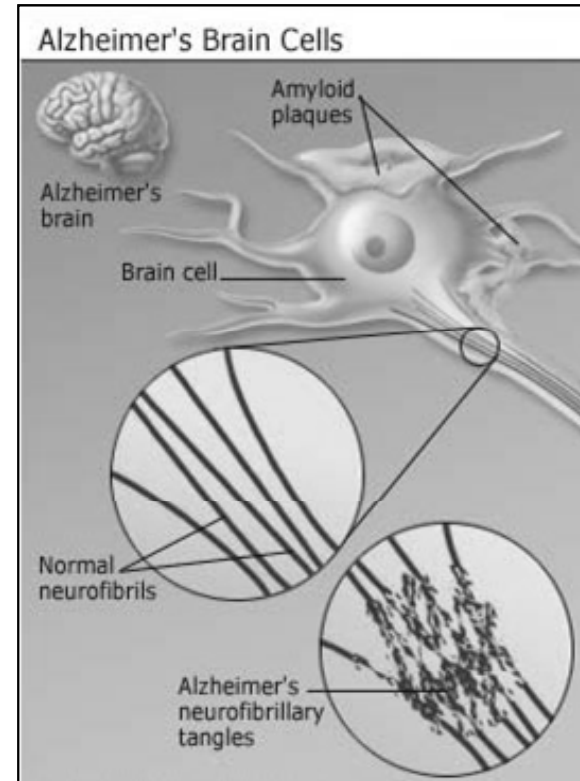
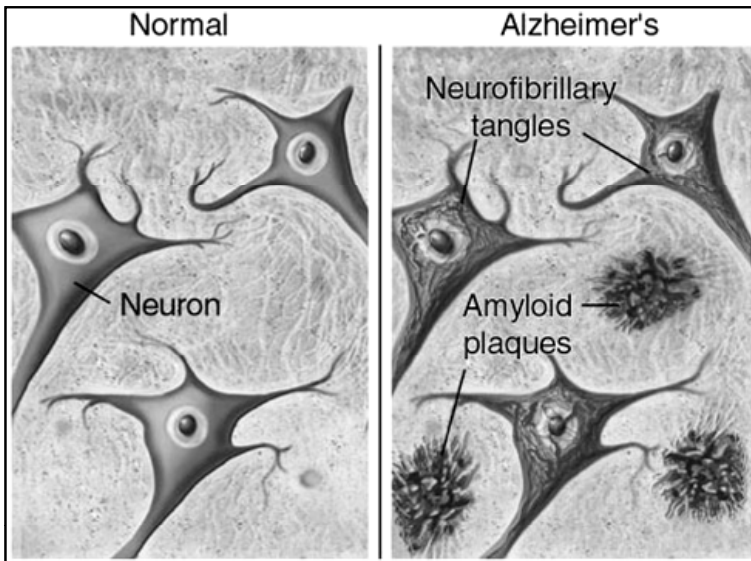
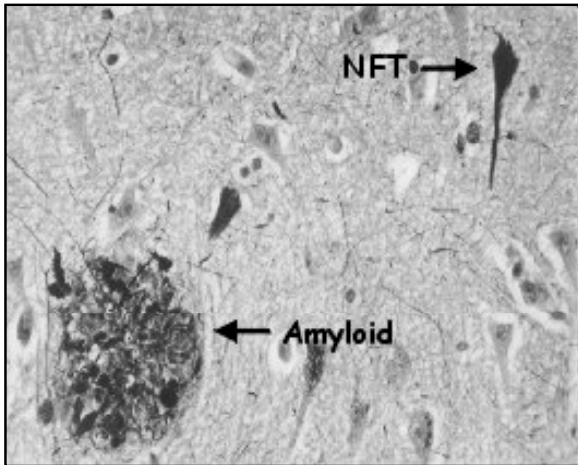
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



## Alzheimerova choroba

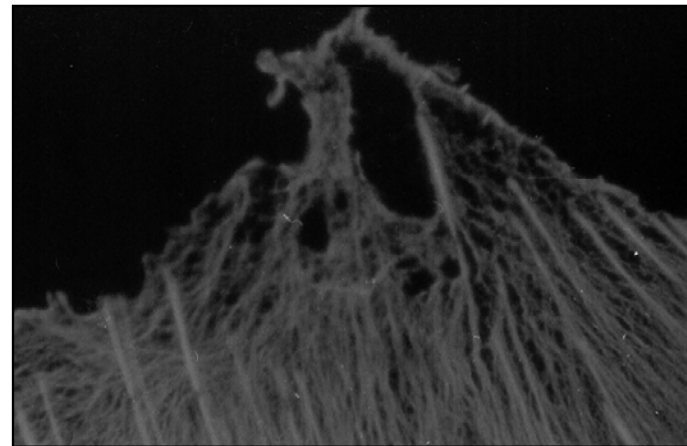
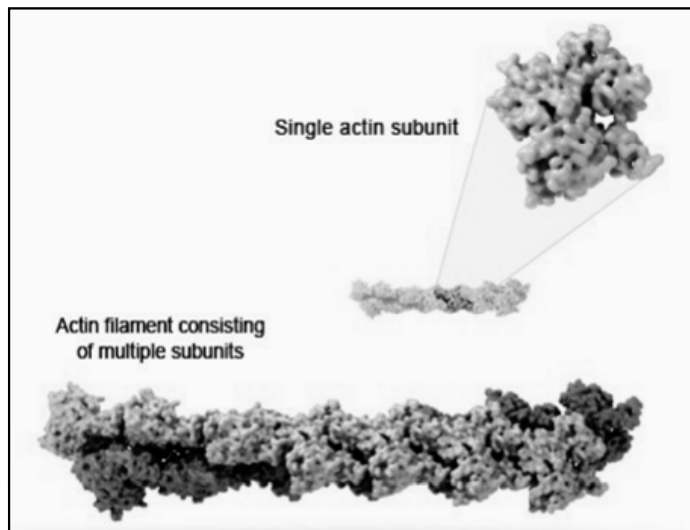
- jeden z typů stařecké demence
- 7-10% nad 65 let, 40% nad 80 let
- ztráta paměti (nejprve krátkodobá), dezorientace (prostorová, časová), halucinace, upoutání na lůžko, smrt
- histologická diagnostika post mortem:  
senilní plaky ( $\beta$ -amyloid) - extracelulárně  
neurofibrilární vřeténka (forforylovaný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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

# AKTINOVÁ FILAMENTA (AF)

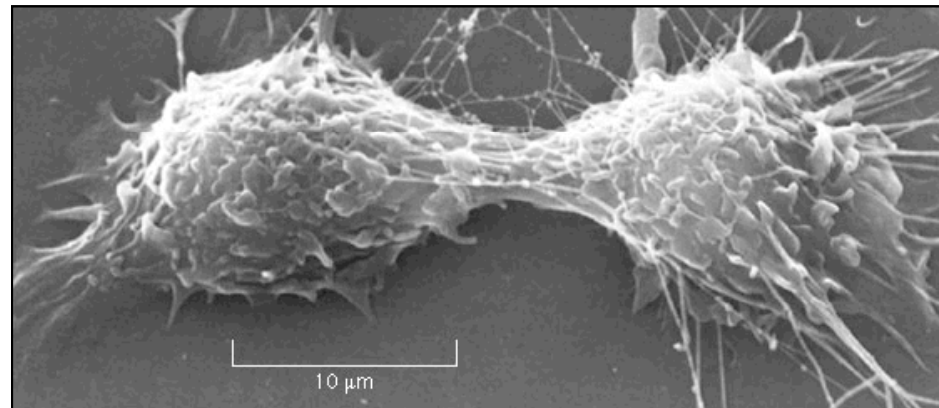
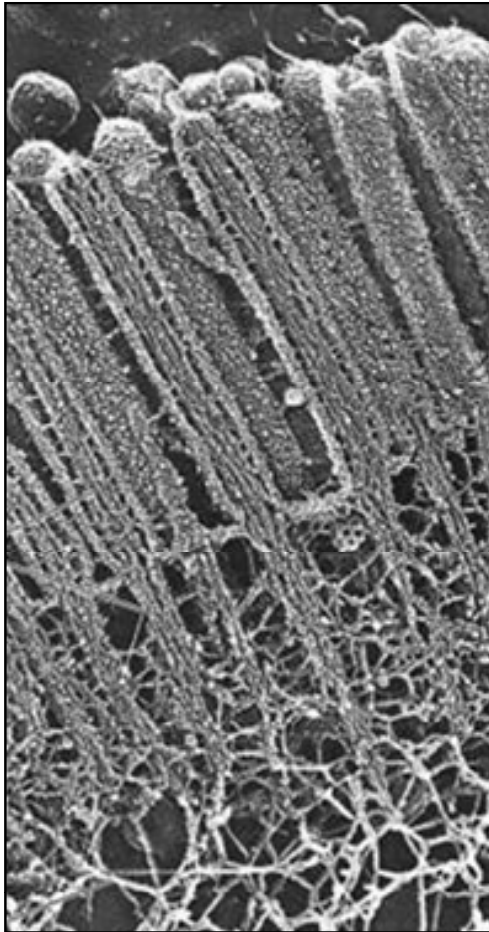
- G-aktin (globulární) → F-aktin (fibrilární)
- AF tenčí, pružnější, kratší (ve srovnání s MT)
- celková délka AF v buňce ~30x větší (ve srovnání s MT)



## Typy aktinových struktur v živočišných buňkách

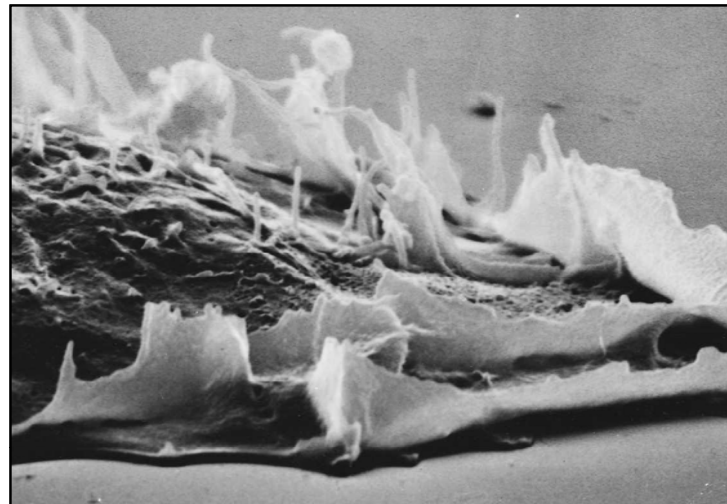
- síť aktinových filament v cytoplazmě
- membránový skelet (buněčný kortex)
- stresová vlákna
- formování cytoplazmatických protruzí:
  - microvilli
  - lamellipodia, filopodia
- kontraktilní prstenec (ring)

microvilli



kontraktilní ring

lamellipodia  
filopodia



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

## Funkce aktinových filament

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

## Nemotorové asociované proteiny:

→ polymerace a prostorové uspořádání AF

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



## Motorové asociované proteiny:

→ pohybové funkce AF

- myosiny
  - konvenční (typ II)  
cytokineze, svalová kontrakce
  - nekonvenční (typ I, III až XV)
    - pohyb membránových vezikul v blízkosti plazmatické membrány
    - tvorba vnitřní struktury protruzí plazmatické membrány
- tropomyosin, troponin



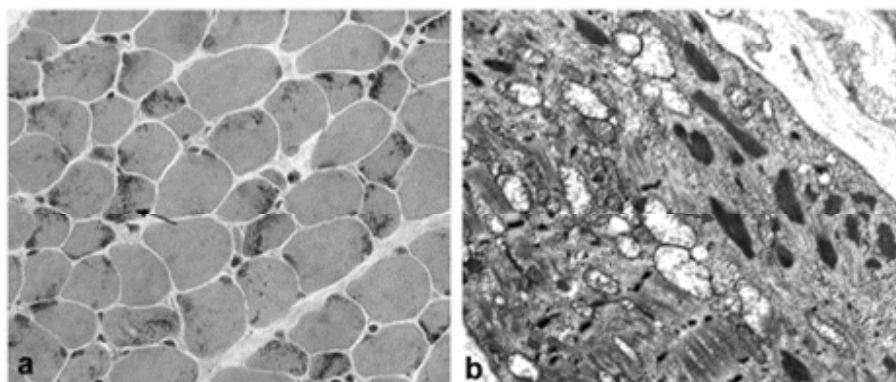
## Změny AF a AP jako příčina onemocnění

### Změny exprese isoformem aktinu

- kardiomyocyty u pacientů se srdečními příhodami (patologická exprese  $\alpha$ -skeletálního aktinu)

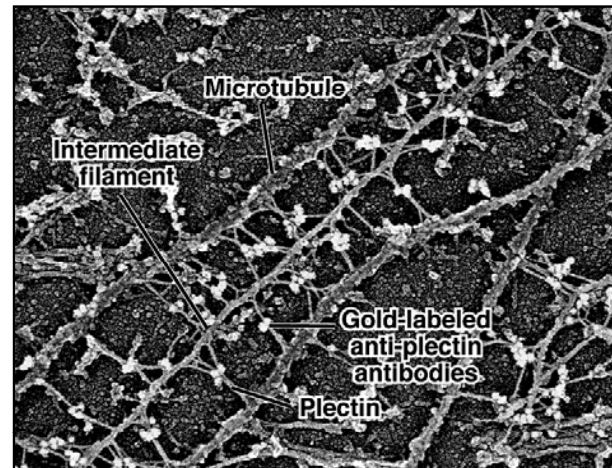
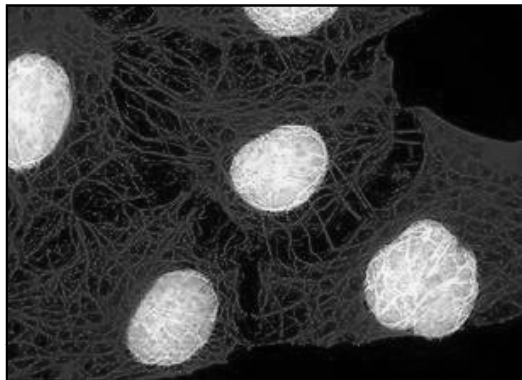
### Mutace v genech pro aktin i AP

- např. nemaline myopatie



## INTERMEDIÁRNÍ FILAMENTA (IF)

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



## Třídy intermediárních filament

### (I) a (II) keratiny

- epiteliální buňky
- AP: filagrin, plectin, dermoplakin

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

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

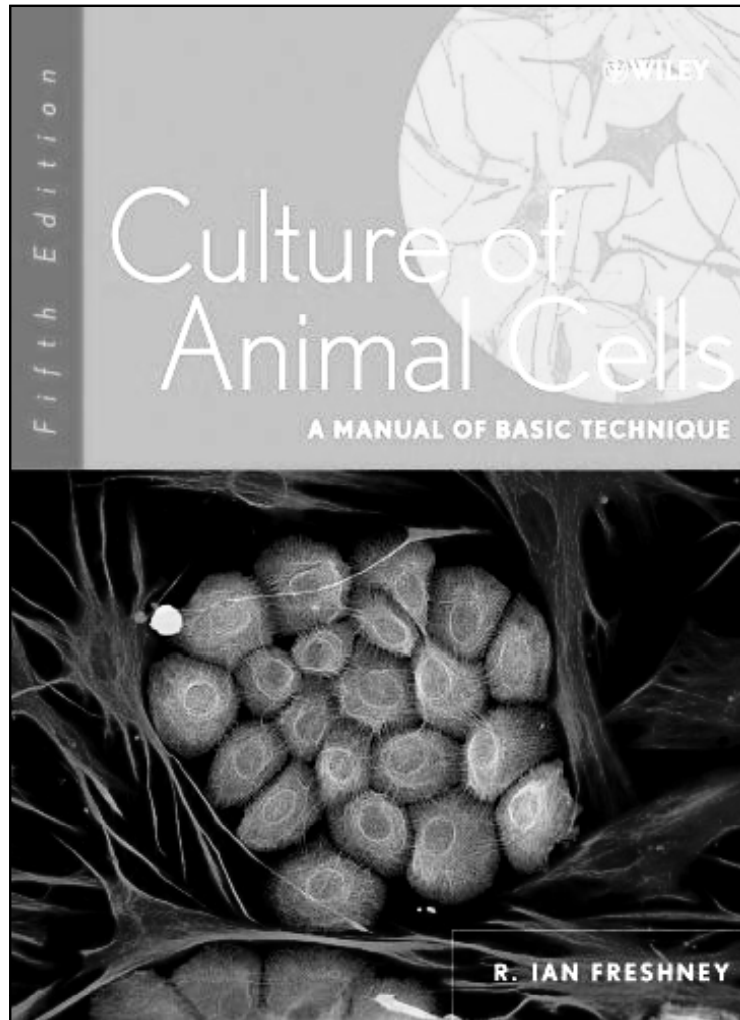
### (IV) neurofilamenta, $\alpha$ -internexin

- neurony
- AP: plectin

### (V) jaderné laminy

### (VI) nestin

- neuronální kmenové buňky, nádorově transformované buňky, endotelie

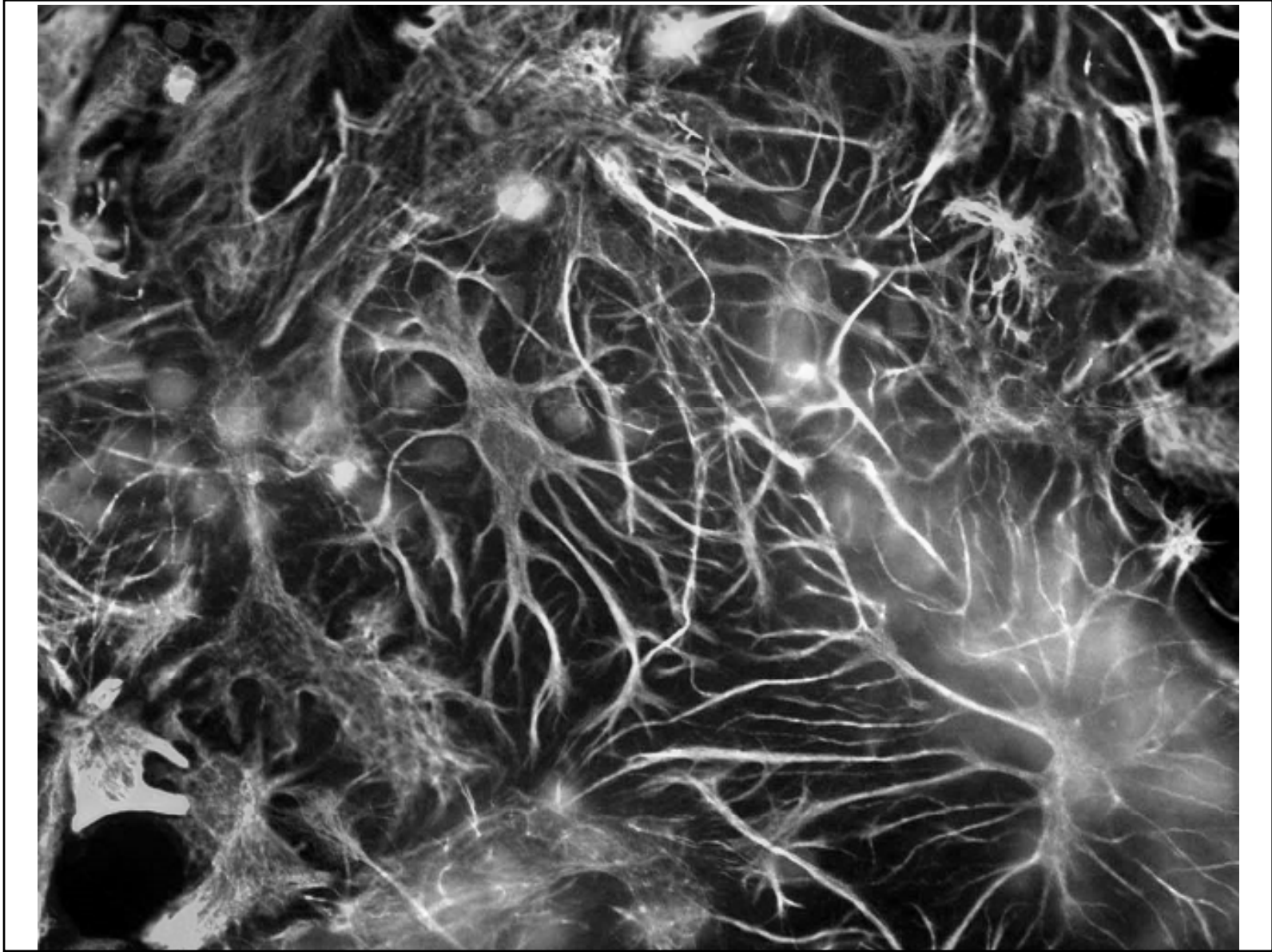


vimentin / DNA  
(fibroblasty)

cytokeratin / DNA  
(epitelie)

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



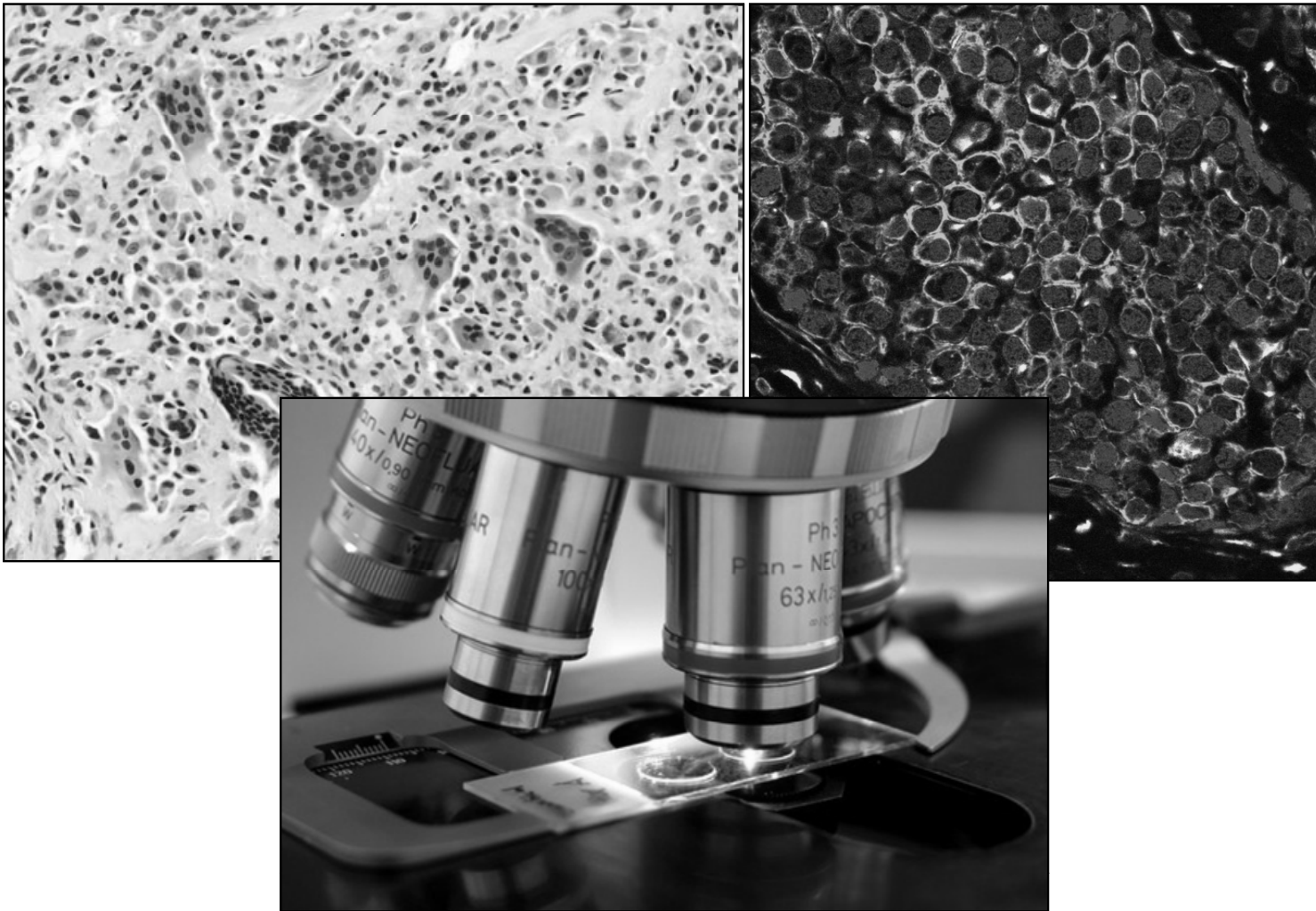




---

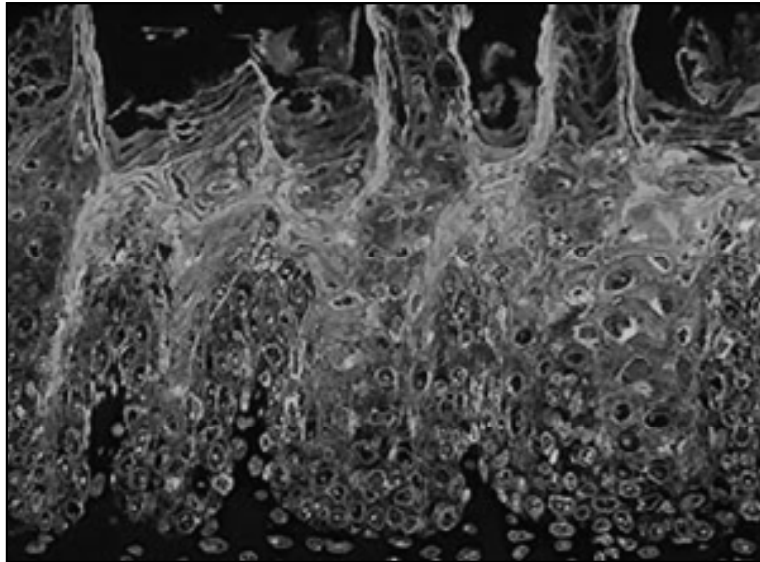
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



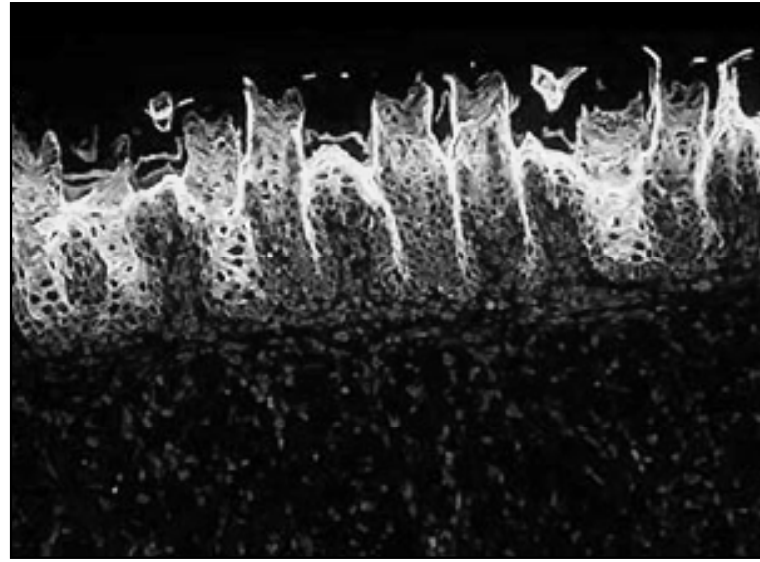


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

## Řez jazykem krysy

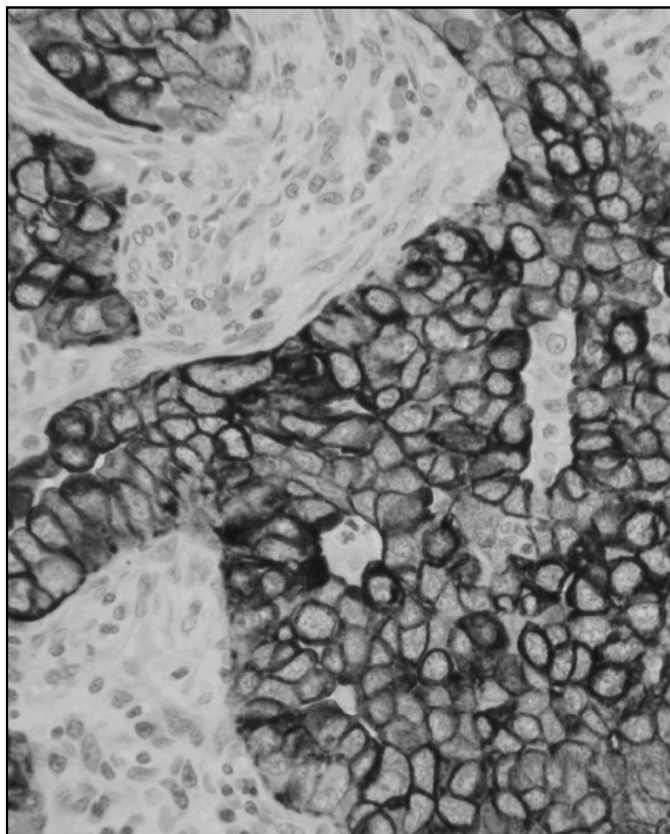


cytokeratin / DNA

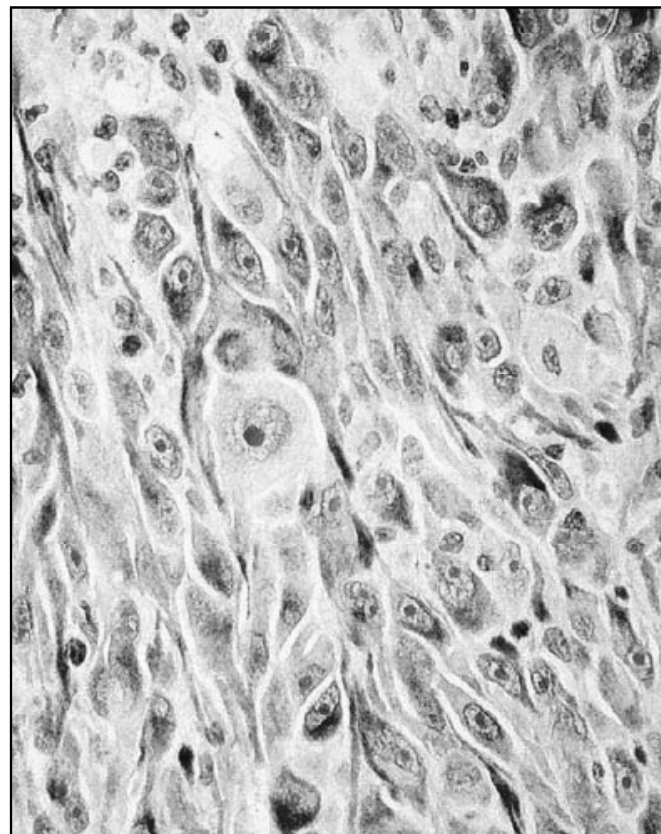


cytokeratin / vimentin / DNA

## Imunohistochemická detekce proteinů IF



cytokeratin



vimentin

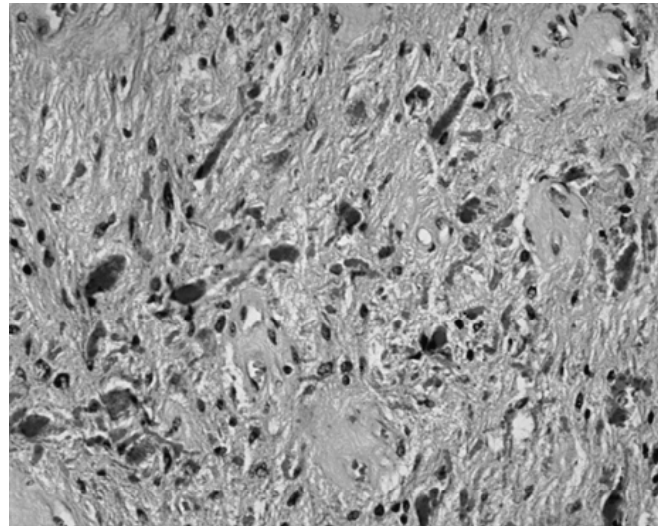
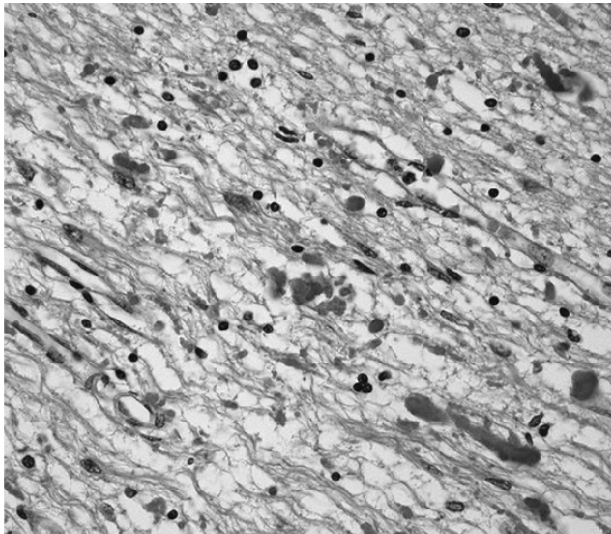
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



## Alexandrova choroba (Alexander disease)

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



## CYTOSKELETÁLNÍ TOXINY

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



*Vinca rosea* /  
*Catharanthus roseus*  
(barvínek růžový)

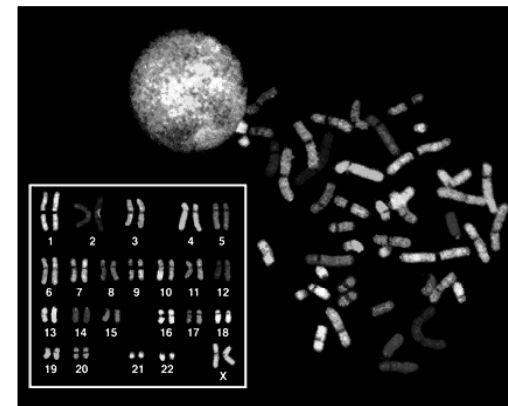
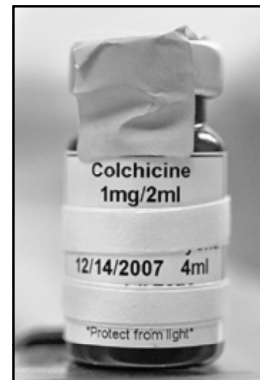
## Mikrotubulární toxiny - inhibitory polymerace

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



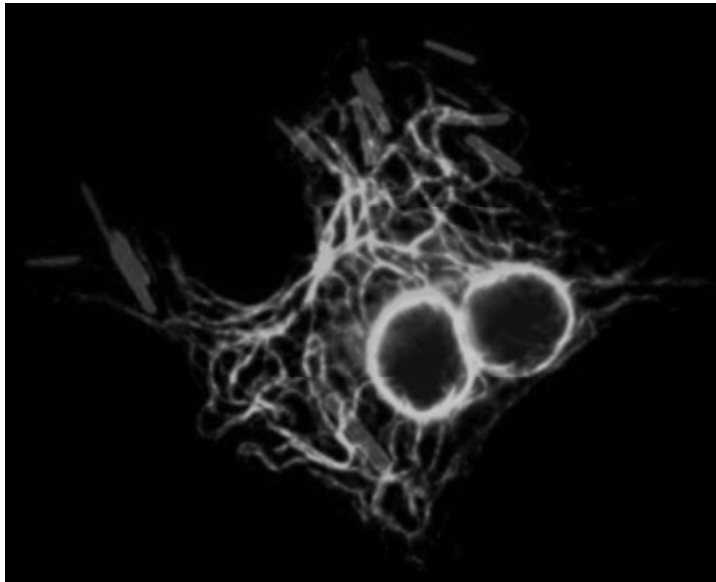
## Mikrotubulární toxiny - inhibitory polymerace

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

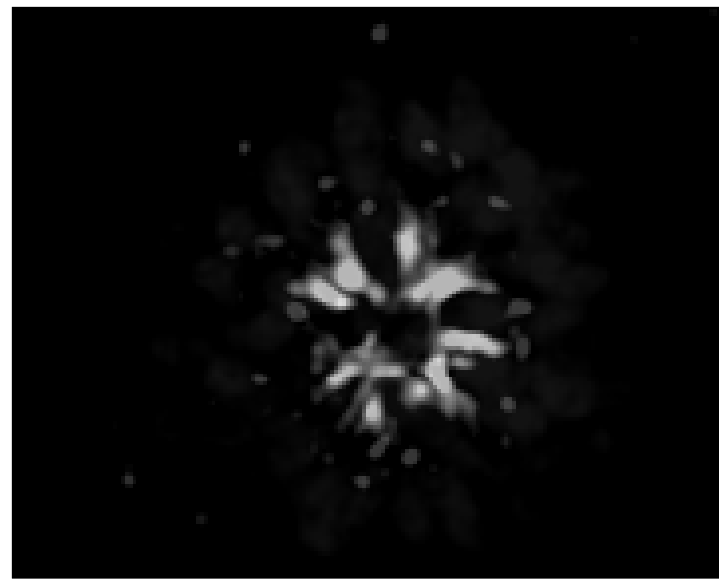


## Poruchy sítě MT po působení vinblastinu

$\alpha$ -tubulin / DNA



linie 3T3  
(myš - kožní vazivo)

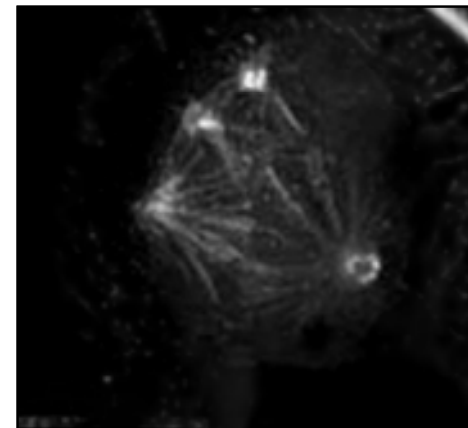


linie MDCK  
(pes - ledviny)



## Mikrotubulární toxiny - inhibitory depolymerace

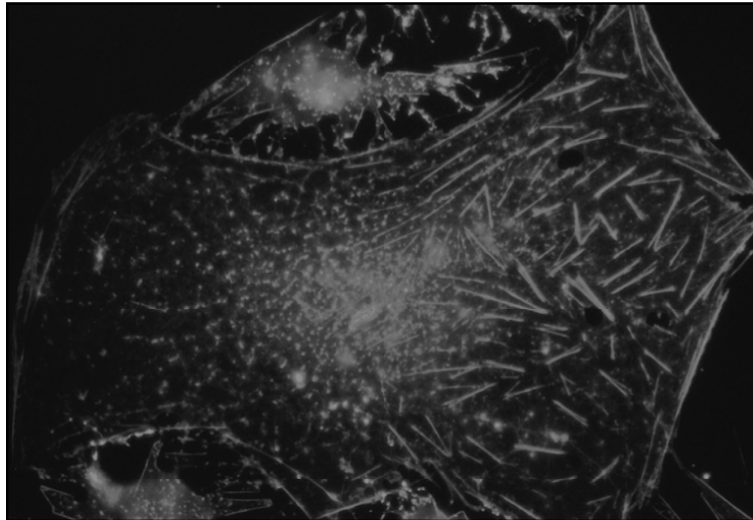
- paclitaxel (*Taxus baccata*), docetaxel
- mechanismus:  
stabilizace mikrotubulů
- využití:  
chemoterapie - Taxol, Taxotere



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

## Toxiny aktinových filament - inhibitory polymerace

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

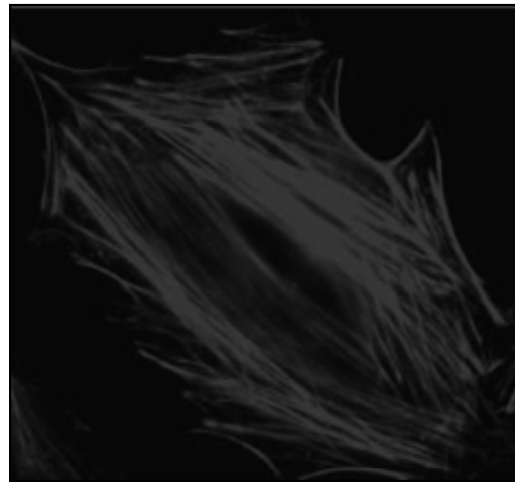


Lidský kožní fibroblast  
cytochalasin

F-aktin

## Toxiny aktinových filament - inhibitory depolymerace

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



F-aktin:  
phalloidin -  
rhodamin

# MEZIBUNĚČNÉ INTERAKCE A SPOJE:

medicínské aspekty - poruchy interakcí a spojů

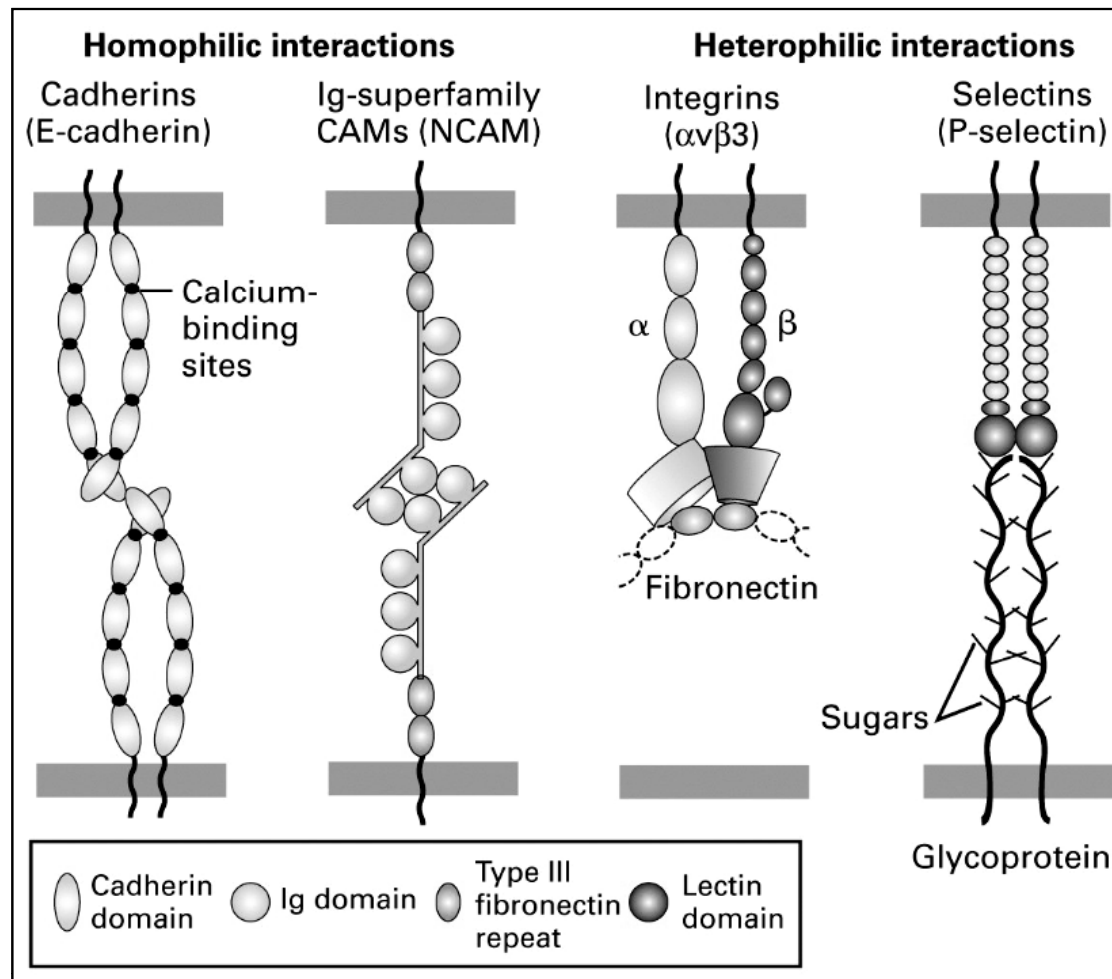
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

## MEZIBUNĚČNÉ INTERAKCE

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

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



## Integriny

- hlavní komponenta interakcí buněk s ECM
- dimery:  $\alpha$  (18 typů) a  $\beta$  (8 typů) podjednotka

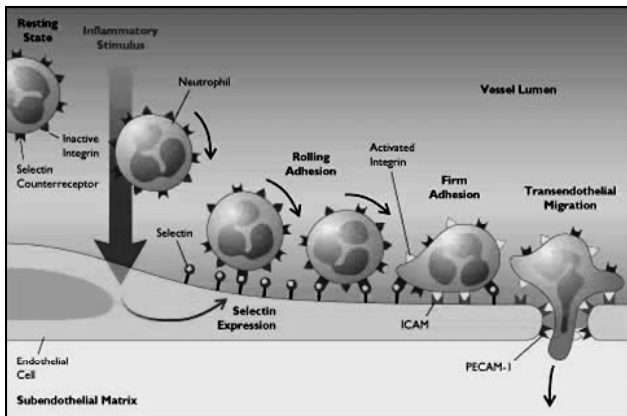
## Funkce:

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

## Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD)

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

## Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD)



## Canine Leukocyte Adhesion Deficiency (CLAD)

- irský setr
- mutační analýza
- genetické testování



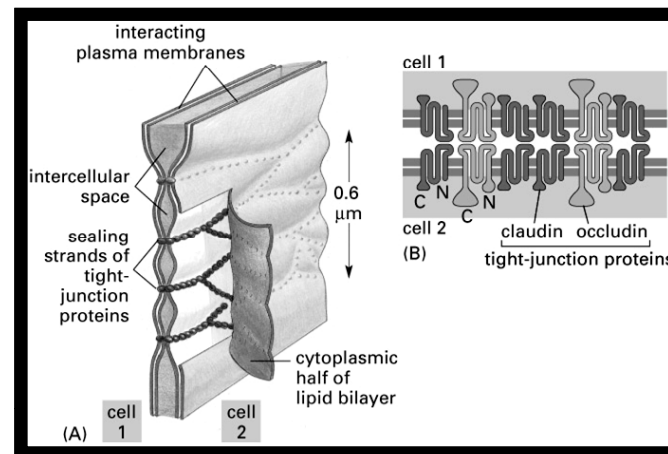
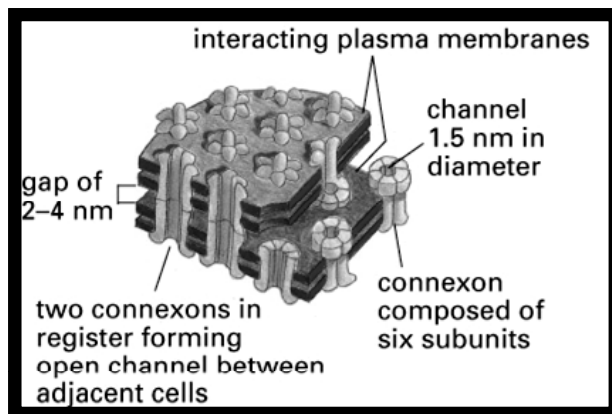


## MEZIBUNĚČNÉ SPOJE A ADHEZE

Gap junctions = „kanálky“ umožňující průchod vody a malých rozpustných molekul = o průměru 1,5 nm: konexin (6 molekul) → konexon

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

- claudin, occludin, JAMs (junction adhesion molecules)

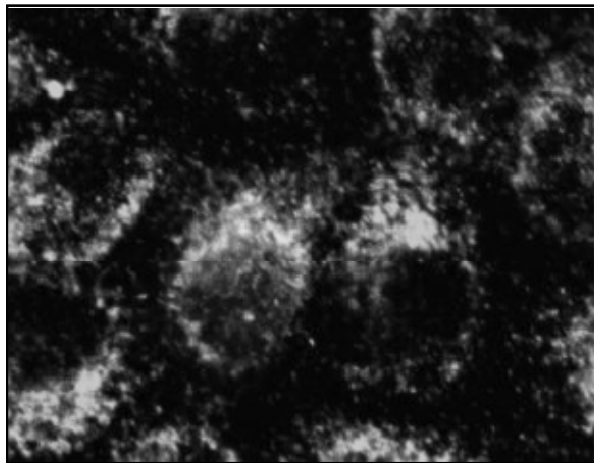


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



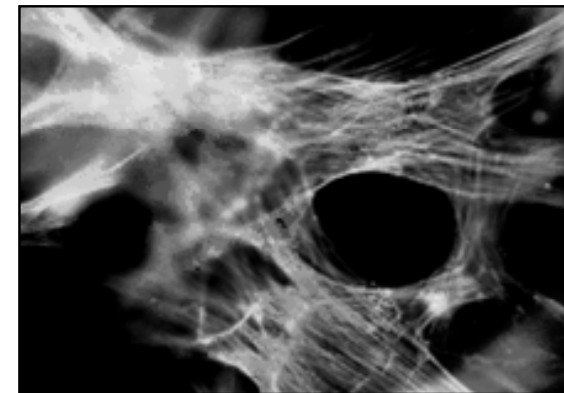
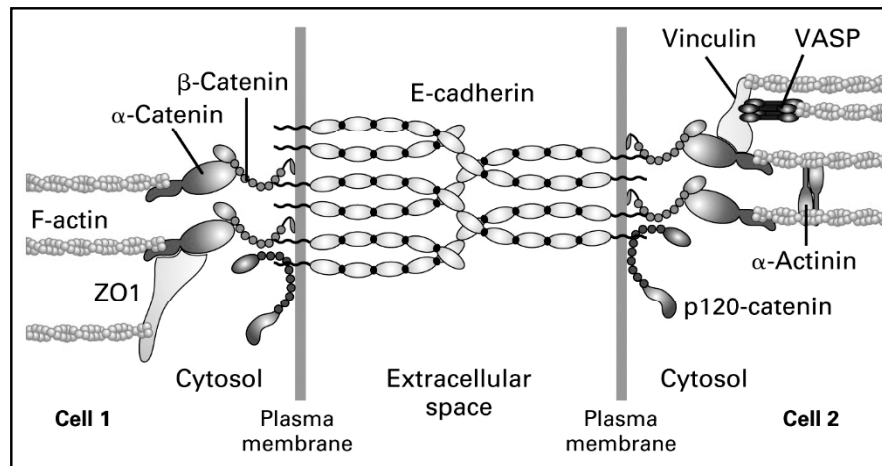
## Hypomagnesemie (dědičná varianta)

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



## Adherentní spoje

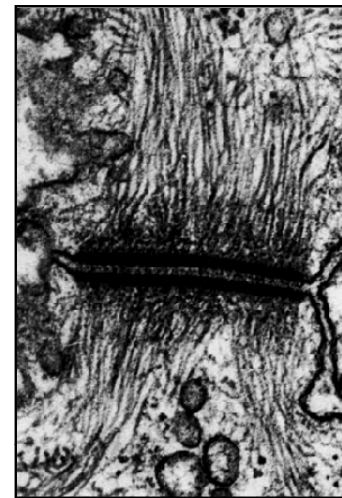
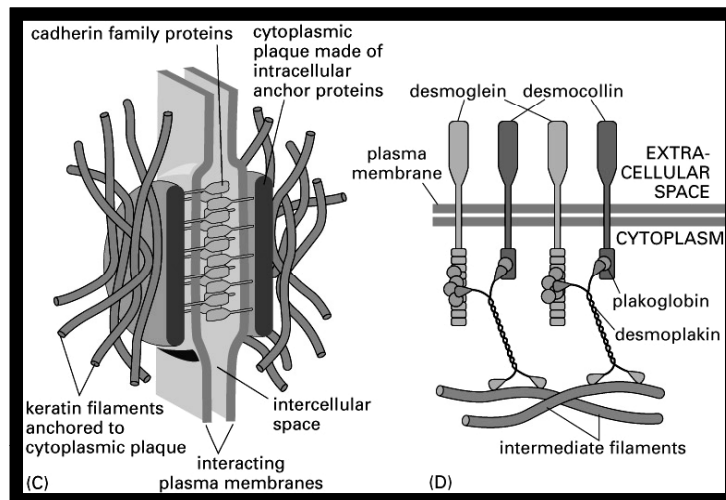
- vazba na aktinová filamenta (AF) → propojení AF v sousedních buňkách prostřednictvím CAMs
- kadherin –  $\alpha$ -katenin –  $\beta$ -katenin – AF
- místa lokalizace: cytoplazmatické plaky (vnitřní strana plazmatické membrány)



aktin /  $\beta$ -katenin

## Desmosomy

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

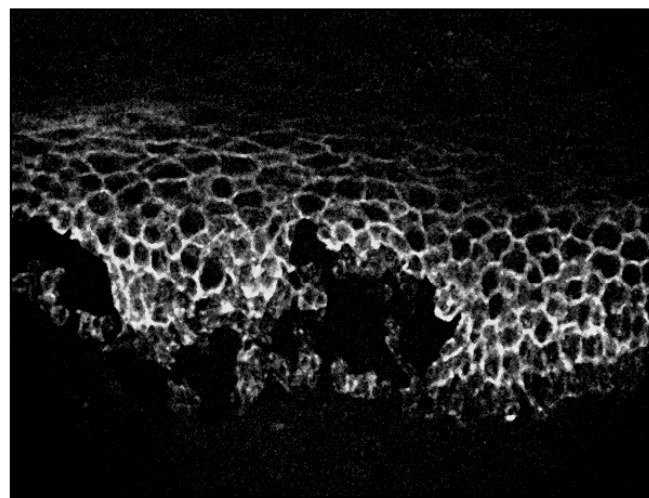
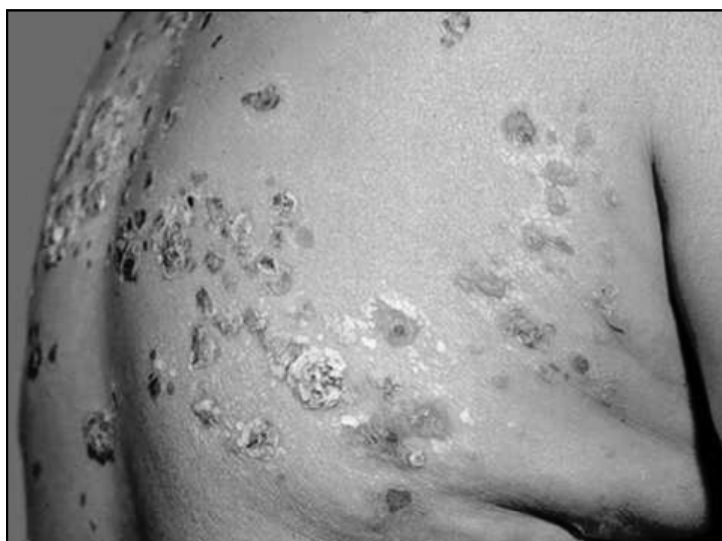


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



## Pemphigus vulgaris

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

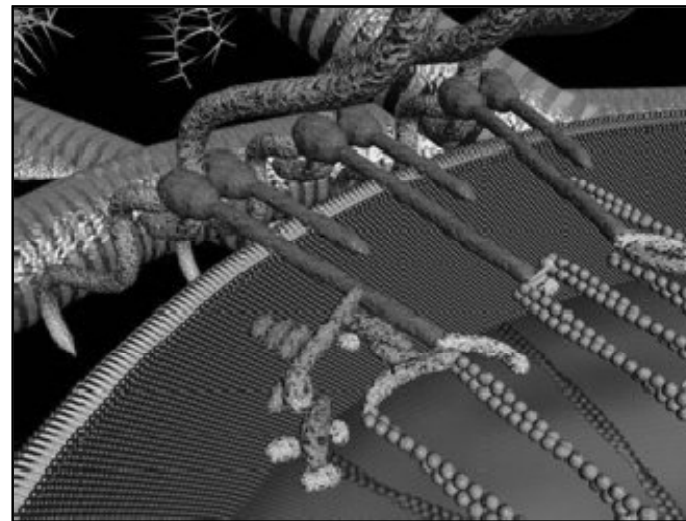
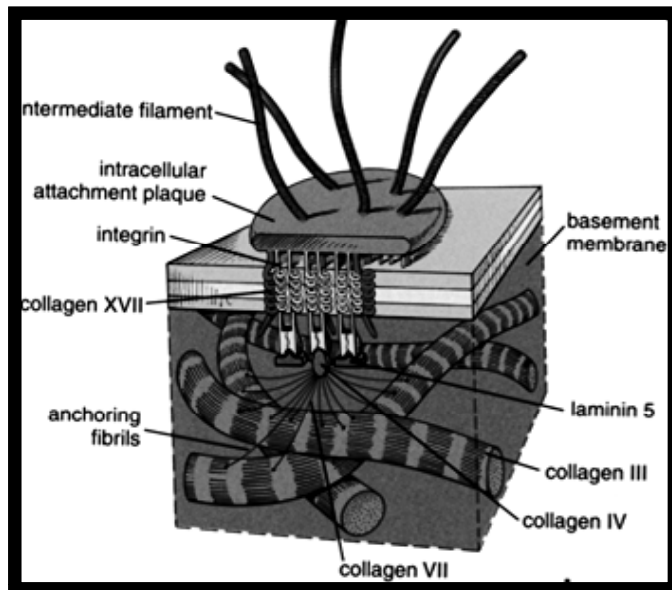


anti-IgG

## INTERAKCE MEZI BUŇKAMI A SUBSTRÁTEM / ECM

Hemidesmosomy = připojení IF k ECM prostřednictvím CAMs

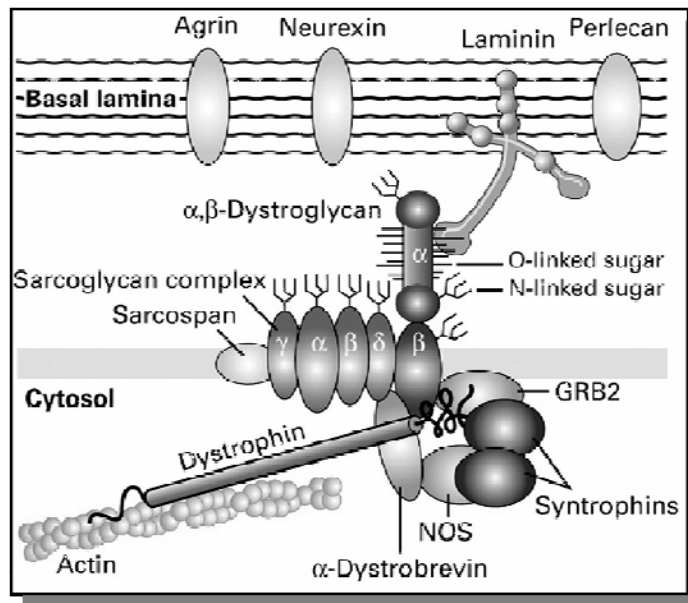
Fokální adheze = připojení AF k ECM prostřednictvím CAMs





## Muskulární dystrofie

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.

# EXTRACELULÁRNÍ MATRIX (ECM):

medicínské aspekty - poruchy ECM

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



## Extracelulární matrix (ECM)

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

### Funkce ECM:

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

## Složení ECM

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

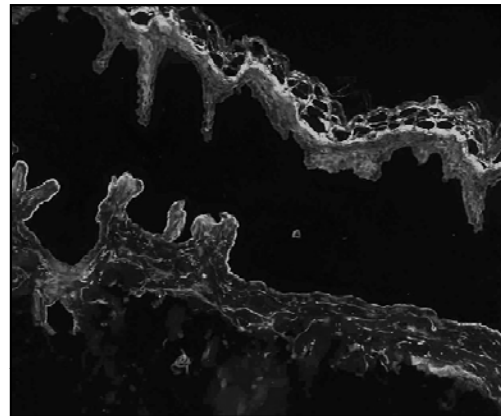


## Poruchy syntézy kolagenu

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



OI



EB



## MĚSÍČNÍ NÁKLADY PRO DĚTI S EB:

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



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

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

[www.debra.cz](http://www.debra.cz)



Vítejte na stránkách DebRA ČR,

občanské sdružení, které zapojuje lidi s vzácnou vrozenou vadou kůže epidermolysis bullosa do aktivního a plnohodnotného života.

Patronka DebRA ČR Jitka Čvančarová

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

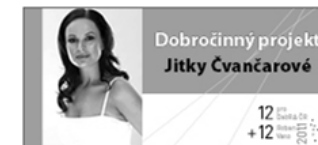
*Alena Čvančarová*



### Novinky

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

### Projekt 12 plus 12



### Media o projektu

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

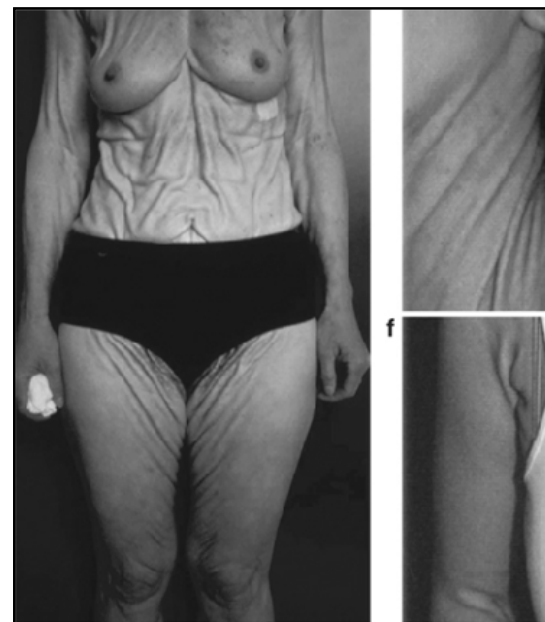


## Poruchy elastických vláken

- Marfanův syndrom  
AD mutace v genu pro fibrillin 1  
postižení kostry, CVS, kůže, očí
- cutis laxa  
AD mutace v genu pro elastin  
nedostatečná pružnost tkání



MS

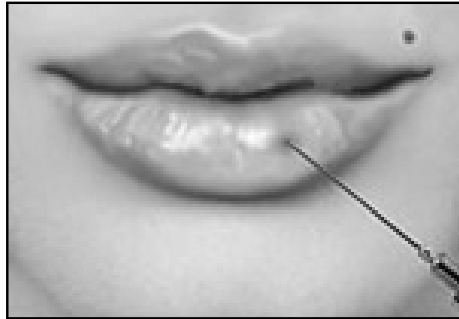


CL



---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 03 / 9.3.



"SO, HOW DID THE COLLAGEN TREATMENT GO, DEAR?"

