

Celični stiki

Vrsta povezave:

- celica-celica
- celica-matriks

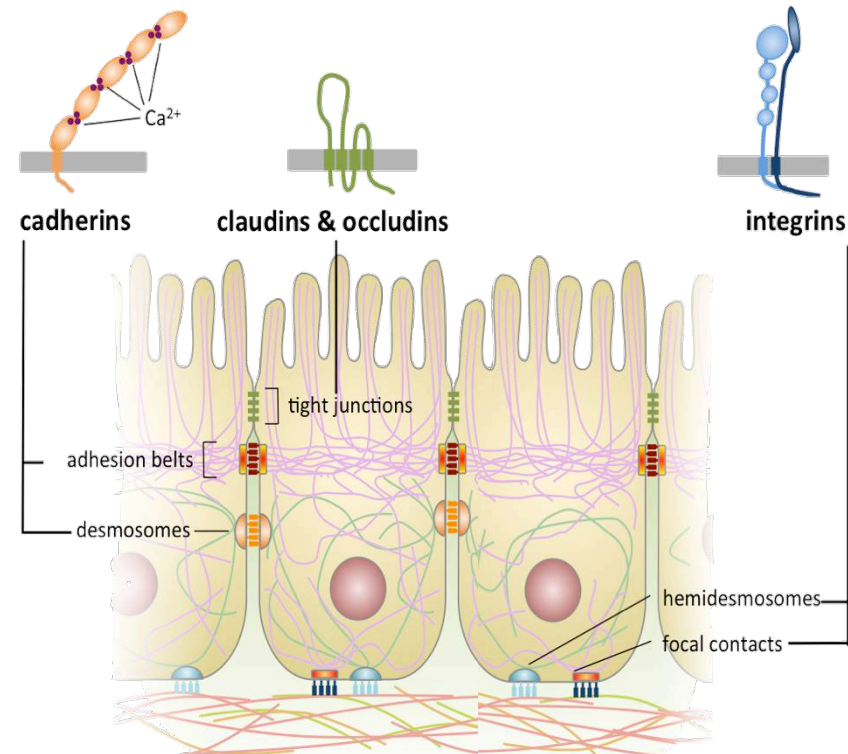
Povezava in adhezija omogoča:

- zvezo med celico in skupnostjo
- kompartmentizacijo
- prepoznavanje in signalizacijo
- proliferacija, diferenciacija, migracija
- delitev mehanskih obremenitev

Tri funkcionalne oblike celičnih stikov.

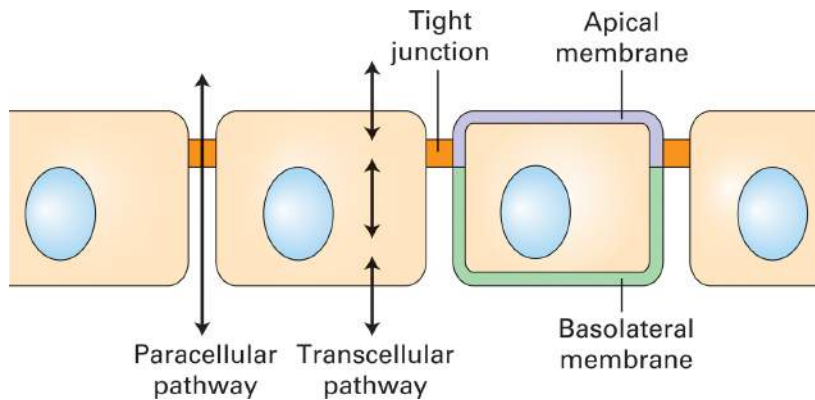
Celični stiki

- **tesni stiki** (*occluding junctions*)
neprepustni sloj
- **sidrni stiki** (*anchoring junctions*)
mehanska povezava med sosednjimi celicami ali med celicami in ECM.
 - **pritrditvena mesta aktinskih filamentov**
 - *adherentne povezave celica-celica* (adhezijski pasovi)
 - *adherentne povezave celica-matriks* (fokalni stiki)
 - **pritrditvena mesta inetrmediarnih filamentov**
 - *stiki celica-celica* (dezmosom)
 - *stiki celica-matriks* (hemidezmosom)
- **komunikacijski stiki** (*communication junctions*) namenjeni prevajanju kemičnih in električnih signalov
 - **presledkovni stiki** (*gap junctions*)
 - **kemične sinapse**



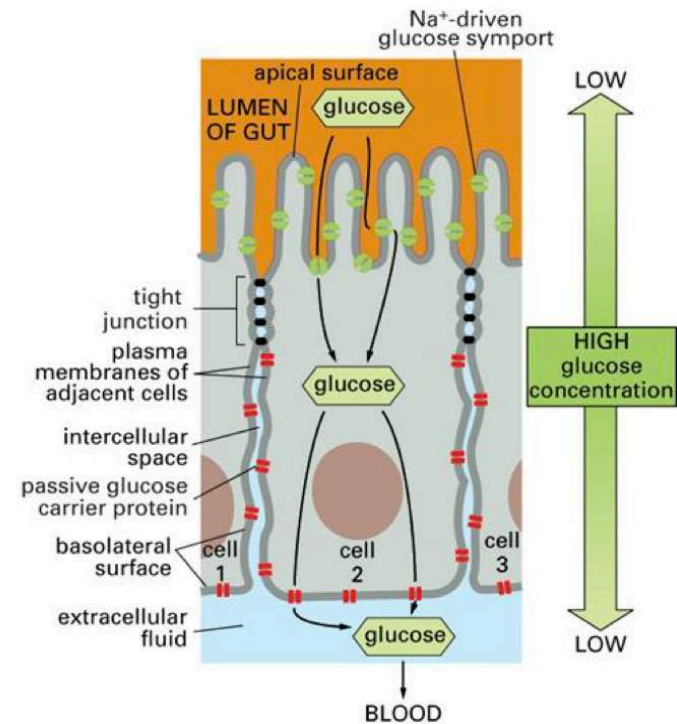
1. Tesni stiki

- Epitelijske in endotelijske → **selektivno prepustne** bariere
- Celice so med seboj **zatesnjene**.



Primer GIT:

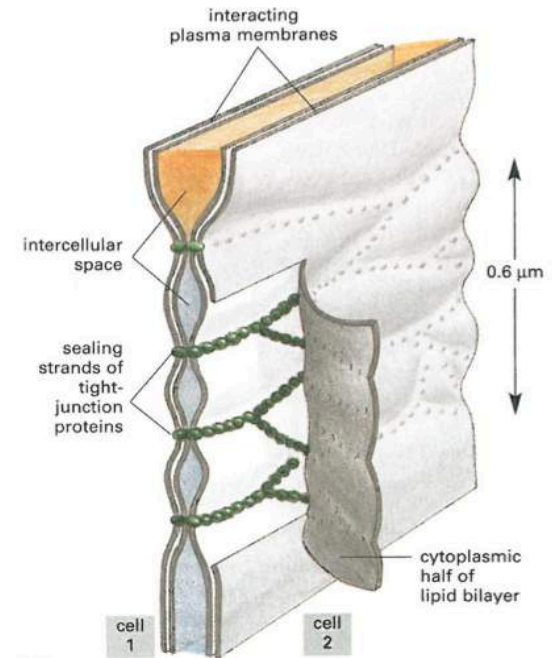
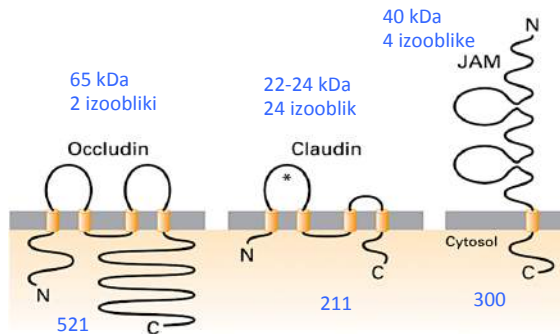
- prenos glukoze v celico
(Na^+ glukozni simport/apikalno)
- difuzija Na^+ iz celice
(olajšana difuzija preko transporterjev/bazolateralno)



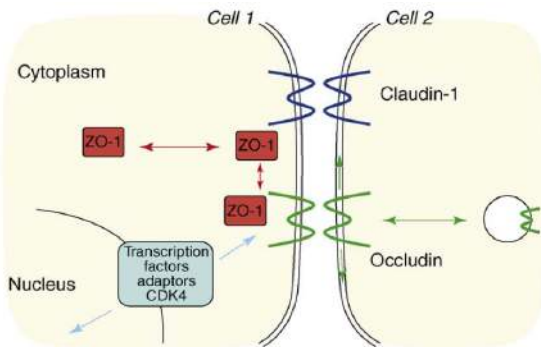
1. Tesni stiki

Stik vzdržuje vrsta TM proteinov (homofilna adhezija)

- kladin, okludin, tricelulin
- JAM (junctional adhesion proteins)

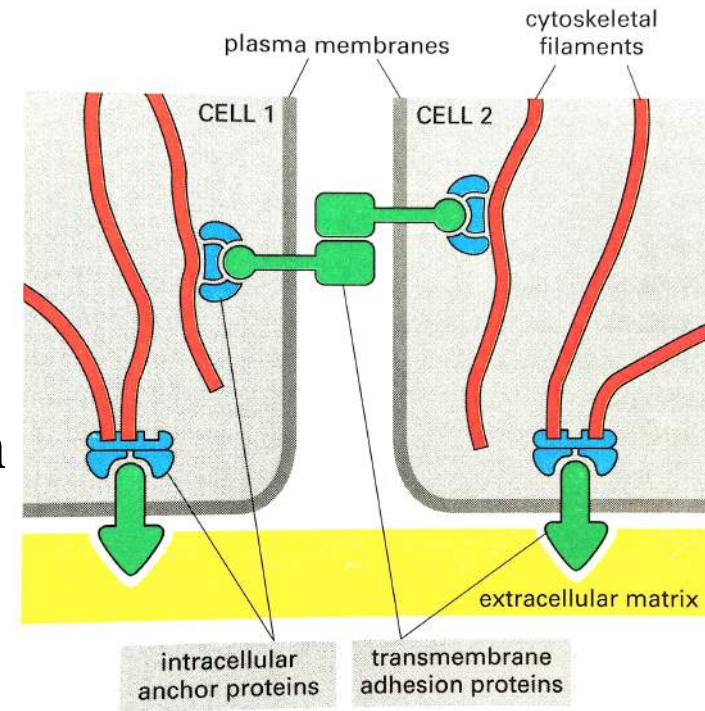


- ZO1, -2, -3 proteini (ZO: zonula occludens) (PDZ, SH3 domene)



2. Sidrni stiki

- Kompleks dveh tipov proteinov:
 - Intracelularni **sidrni proteini** (plaki) vezani na aktin ali intermediarni filament
 - **TM adhezijski protein** z ic delom na sidrni kompleks in z ec domeno na ECM ali na drug TM adhezijski protein.

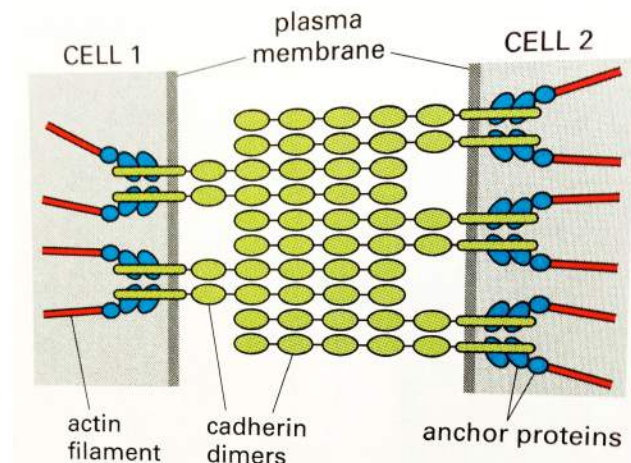
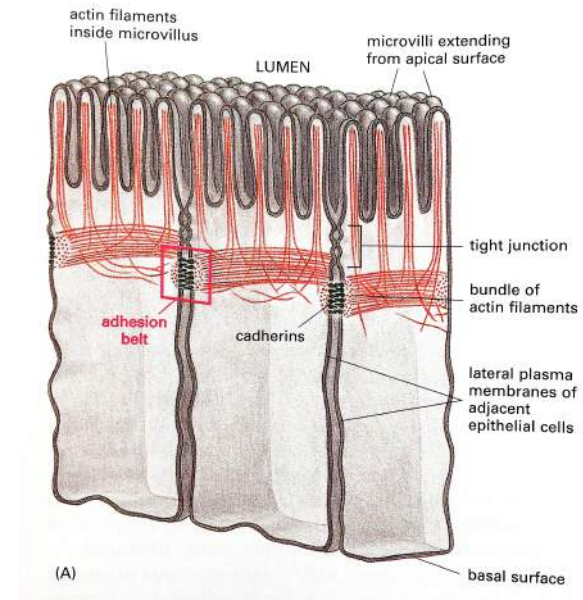


- Dve različni funkcionalni obliki sidrnih stikov:
 - adherentne povezave in dezmosomi (celica-celica, kadherini)
 - fokalne povezave in hemidezmosomi (celica-ECM, integrini)

2. Sidrni stiki:

Celica-celica: adherentna povezava

- epiteljske celice
- adhezijski pasovi
- aktinska vlakna
- sidrni proteini
 - catenin
 - vinkulin
 - α -aktinin
- kadherin
- transcelularna mreža



2. Sidrni stiki:

Celica-celica: **dezmosomi**

- epiteljske celice
- oblika gumba
- intermediarni filament

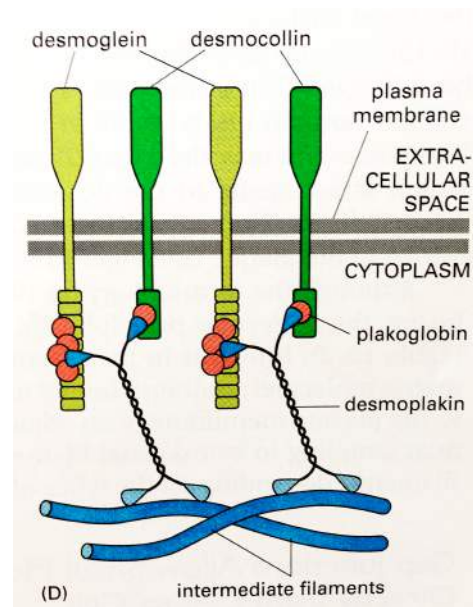
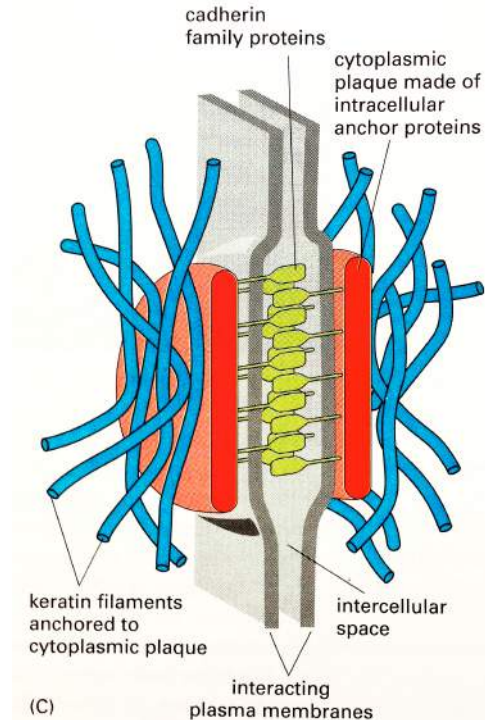
Povezovalci citoskeleta in TM adhezijskega proteina:

- plakoglobin
- desmoplakin

Adhezijski proteini (kadherini):

- desmoglein
- desmokolin

Avtoimunsko obolenje *pempighus*



2. Sidrni stiki:

Celica-celica: **dezmosomi**

- epitelijske celice
- oblika gumba
- intermediarni filament

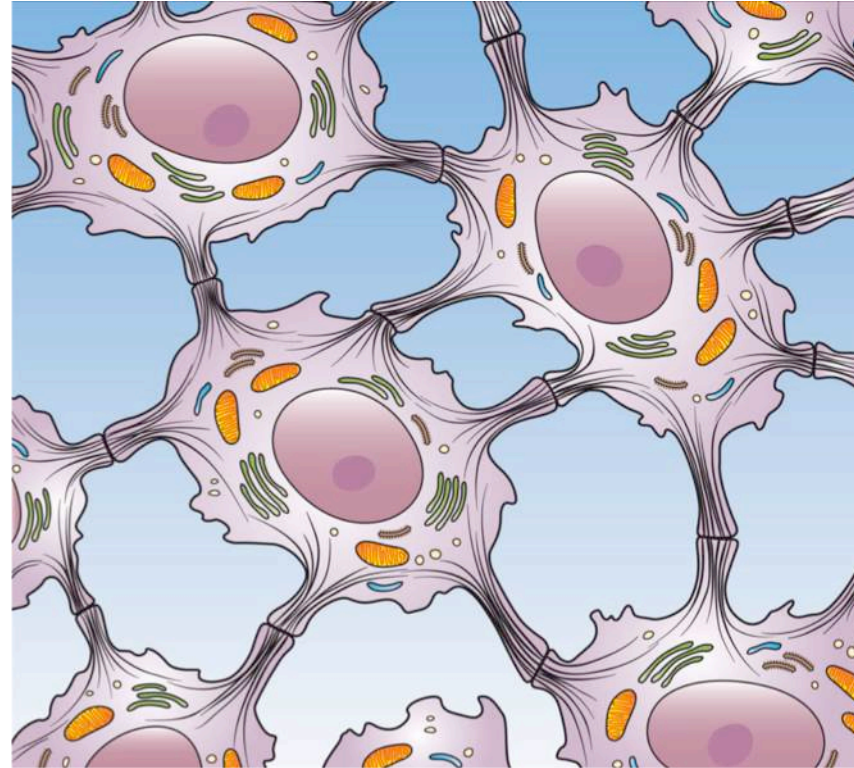
Povezovalci citoskeleta in TM adhezijskega proteina:

- plakoglobin
- desmoplakin

Adhezijski proteini (kadherini):

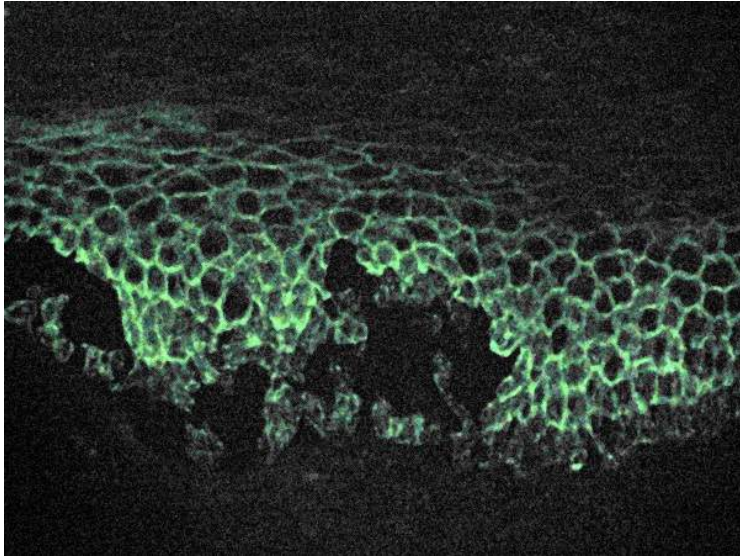
- desmoglein
- desmokolin

Avtoimunsko obolenje *pempighus*



dezmosomski stiki med celicami epidermisa

Pemphigus foliaceus

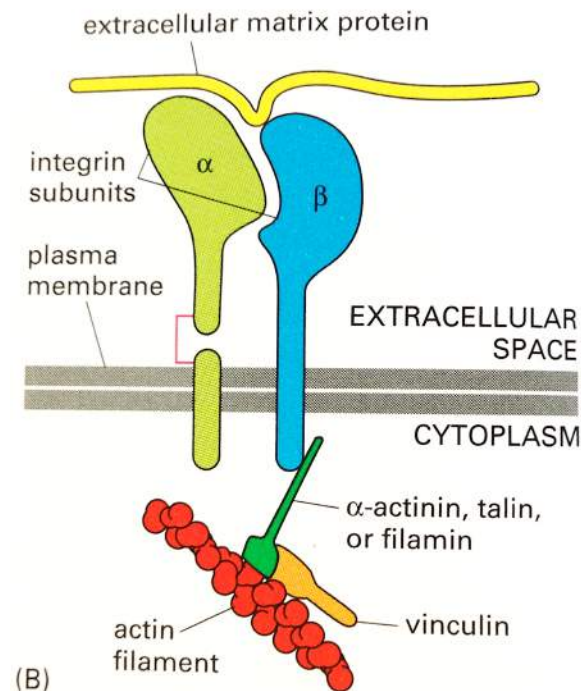


- 9 let razvoja
- zamenjava plazme, kortikosteroidi, rituximab /remisija
- mycophenolate mofetil (imunosupresor), kortikosteroidi

2. Sidrni stiki:

Celica-matriks: **fokalni stiki**

- povezava ECM in citoskeleta (aktin)
- TM protein je integrin
- α -aktinin, filamin, talin, vinkulin
- mišica-vez povezava (*myotendinous junction*)



Celica-matriks: **hemidezmosomi**

- morfološko podobni dezmosomom
- omogočajo natezne lastnosti (gumbki)
- povezujejo bazalno površino epitelijskih celic na bazalno lamino
- intermediarni filament (keratin)
- plektin

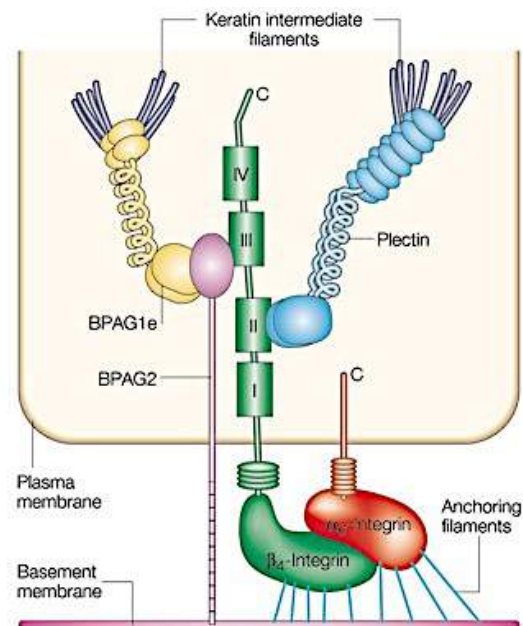


TABLE 19-2 Anchoring Junctions

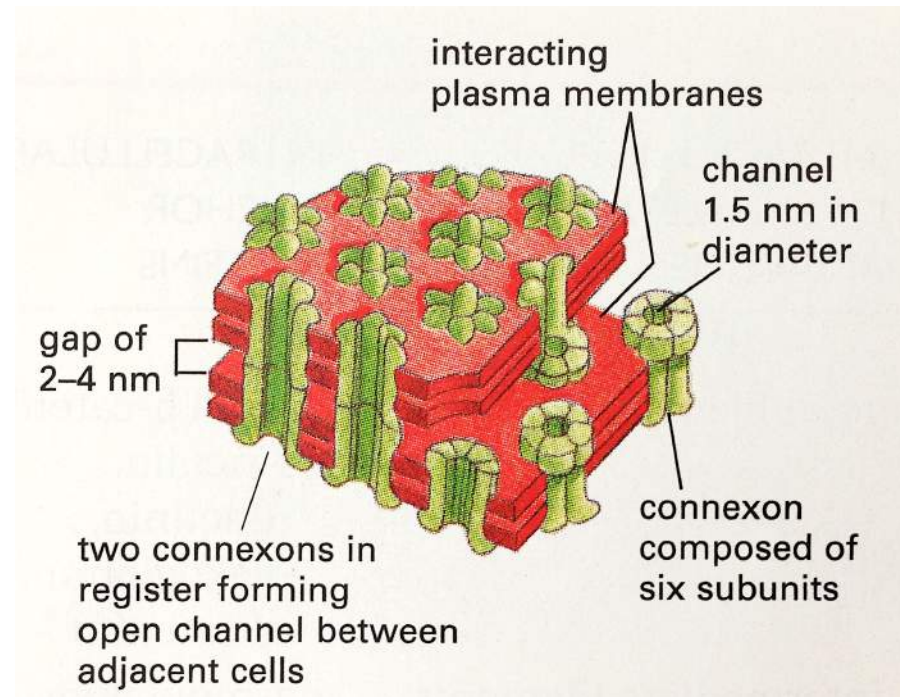
JUNCTION	TRANSMEMBRANE ADHESION PROTEIN	EXTRACELLULAR LIGAND	INTRACELLULAR CYTOSKELETAL ATTACHMENT	INTRACELLULAR ANCHOR PROTEINS
<i>Cell-Cell</i> Adherens junction	cadherin (E-cadherin)	cadherin in neighboring cell	actin filaments	α - and β -catenins, vinculin, α -actinin, plakoglobin (γ -catenin)
Desmosome	cadherin (desmoglein, desmocollin)	desmogleins and desmocollins in neighboring cell	intermediate filaments	desmoplakins, plakoglobin (γ -catenin)
<i>Cell-Matrix</i> Focal adhesion	integrin	extracellular matrix proteins	actin filaments	talin, vinculin, α -actinin, filamin
Hemidesmosome	integrin $\alpha_6\beta_4$, BP180	extracellular matrix proteins	intermediate filaments	plectin, BP230

Presledkovni stiki

3. komunikacijski stiki:

Celica-celica: presledkovni stiki

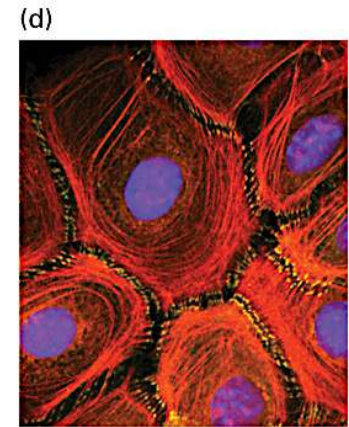
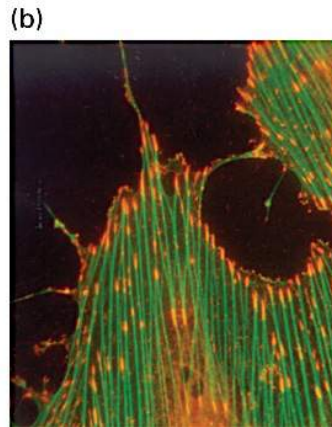
- nimajo jih mišične in krvne celice
- koneksin, konekson
- vrzel 2-4 μm
- določena propustnost
- pH, Ca^{2+}
- akcijski potencial
- jetrne celice/NA
- živčne celice
- peristaltično delovanje srca



Citoskelet

- 3 vrste filamentov
 - mikrofilamenti
 - mikrotubuli
 - intermediarni filamenti
- različne funkcije
 - dinamične mreže
 - snopi
 - strukturna opora
 - filamenti z nateznimi lastnostmi
- veliko število konstruktov

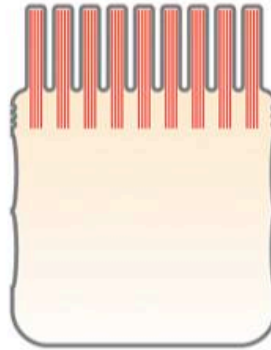
(a) Microfilaments	Microtubules	Intermediate Filaments
Actin binds ATP	$\alpha\beta$ -tubulin binds GTP	IF subunits don't bind a nucleotide
Form rigid gels, networks, and linear bundles	Rigid and not easily bent	Great tensile strength
Regulated assembly from a large number of locations	Regulated assembly from a small number of locations	Assembled onto pre-existing filaments
Highly dynamic	Highly dynamic	Less dynamic
Polarized	Polarized	Unpolarized
Tracks for myosins	Tracks for kinesins and dyneins	No motors
Contractile machinery and network at the cell cortex	Organization and long-range transport of organelles	Cell and tissue integrity



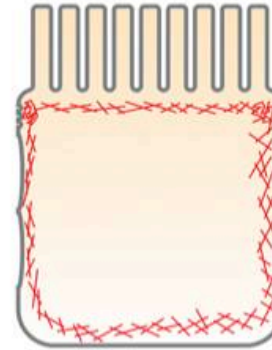
Mikrofilamenti: aktin

- sestavljanje na različne načine
- različne kombinacije v isti celici
- vse povezane s površino celice in zunanostjo

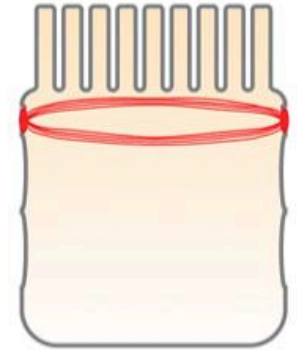
- G-aktin
- F-aktin



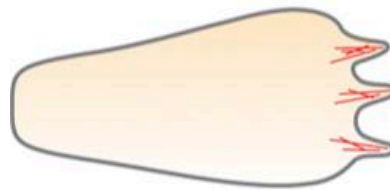
Microvilli



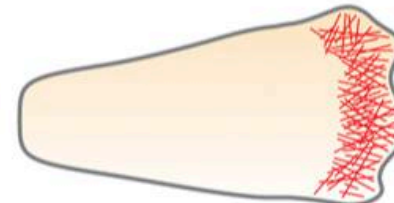
Cell cortex



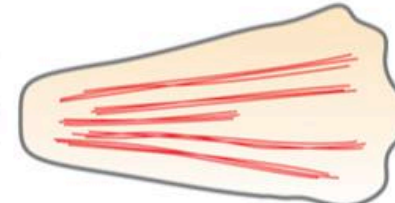
Adherens belt



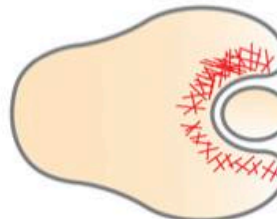
Filopodia



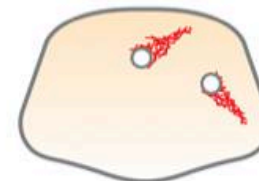
Lamellipodium/
leading edge



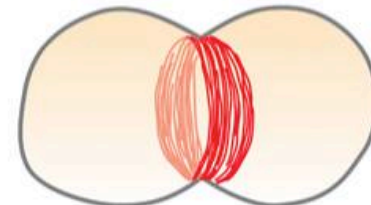
Stress fibers



Phagocytosis



Moving endocytic vesicles



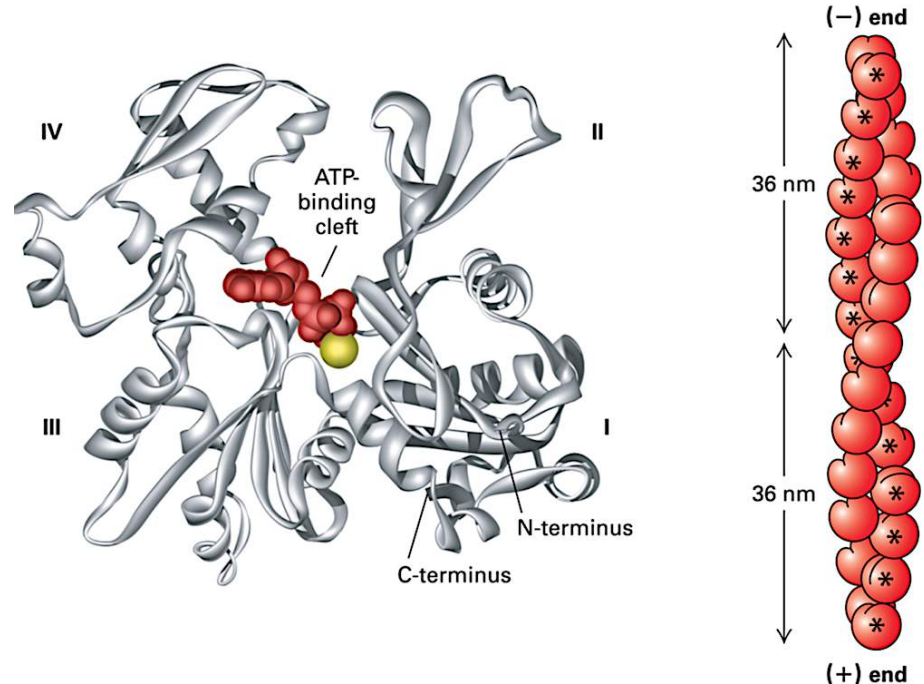
Contractile ring

G- in F-aktin

- G-aktin = globularni monomer
- F-aktin = filamentozni aktin

- 6 aktinskih genov, pri vretenčarjih:
 - 4 α izooblike v m.c.. (v kontraktilnih strukturah)
 - β - aktin v nemišičnih c.
 - γ - aktin v nemišičnih c., stresna vlakna

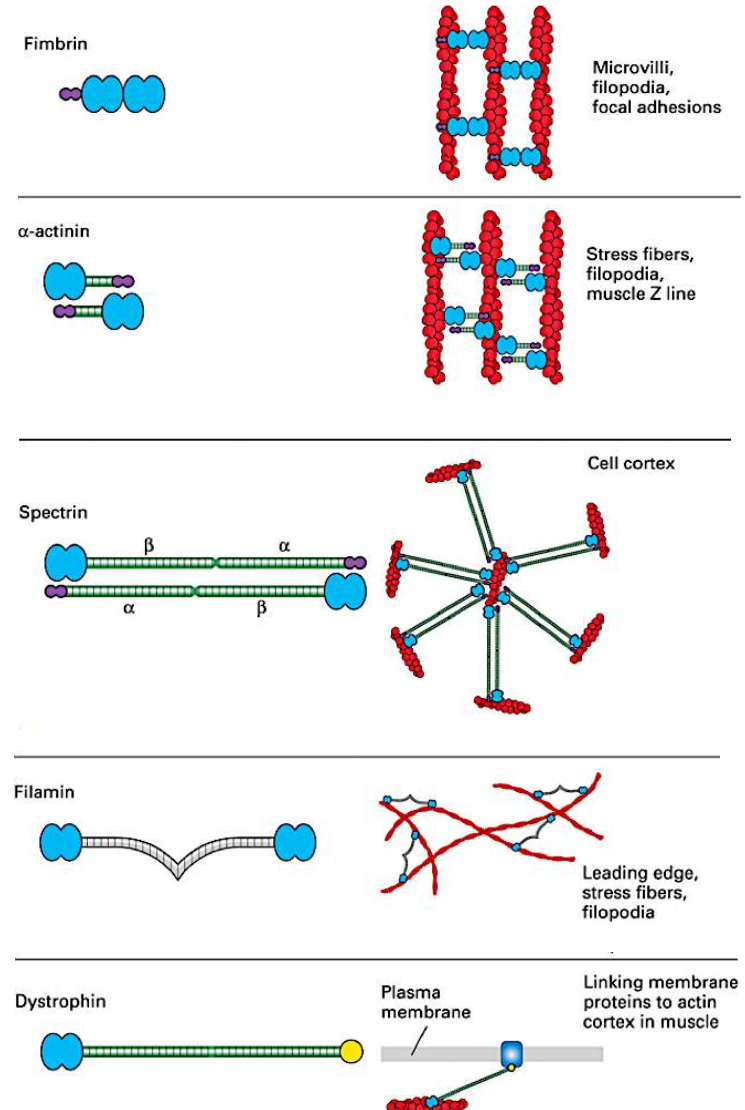
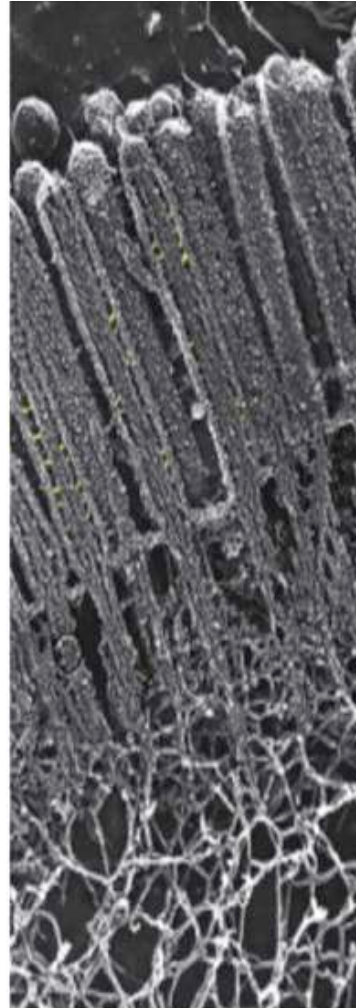
- 10% vseh celičnih komponent
- (do 5% v nemišičnih c.)
- evolucijsko zelo ohranjena



- 45 kDa
- globoka špranja z vezavnim mestom za ATP in Mg^{2+}
- aktinski filament je iz 2 verig, medsebojno ovitih
- strukturna in funkcijska polarnost F-aktina
- (+), kjer se dodaja, (-), kjer laže poteče hidroliza

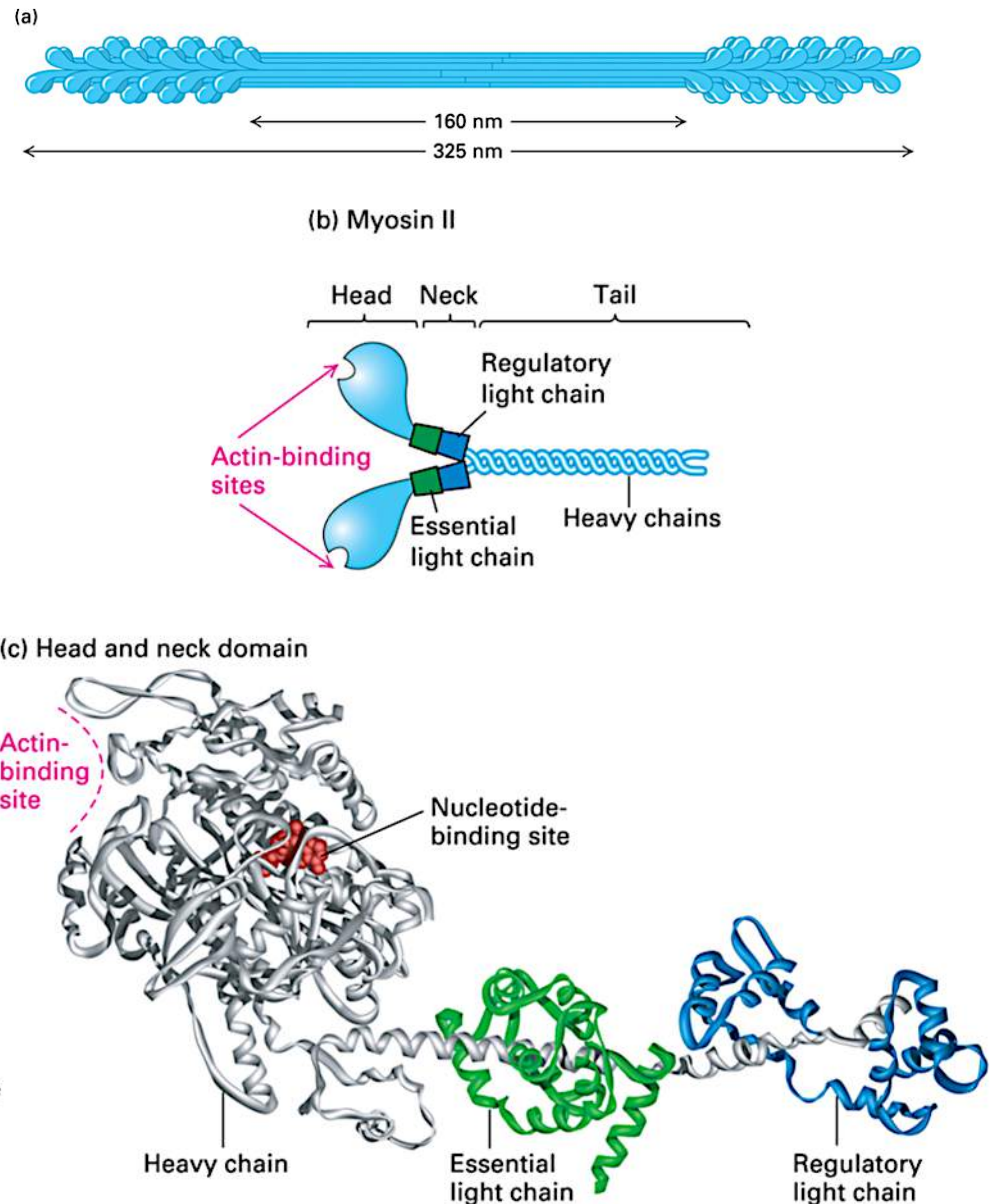
Povezovanje aktinskih filamentov

- različna urejenost aktinskih molekul znotraj iste celice
- različni povezovalci
- različne konstrukcije
- Duchennova mišična distrofija (distrofin)




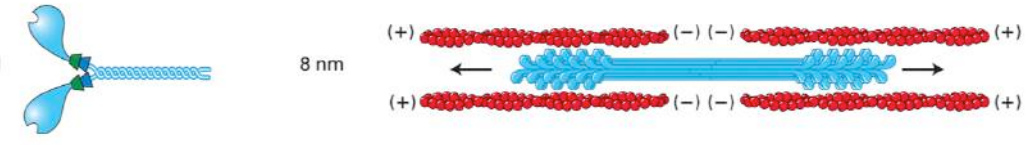

Miozin

- motorni proteini vezani na aktinska vlakna
- pretvorba kemične v mehansko energijo
- hidroliza ATP
- sodelujejo pri:
 - premikanju organelov
 - mišični kontrakciji
 - celični migraciji
- 40 genov za miozin (človek)
- bipolarni filament
- domenska ureditev proteina

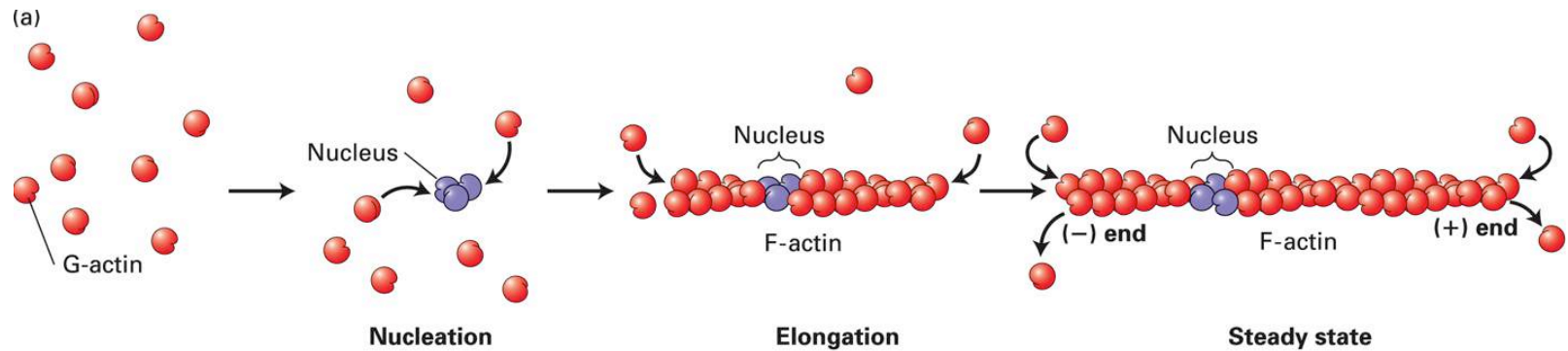


Miozin

- različne strukture miozina
- različne povezave

Class	Step size		Function
I	10-14 nm		Membrane association, endocytosis
II	8 nm		Contraction
V	36 nm		Organelle transport

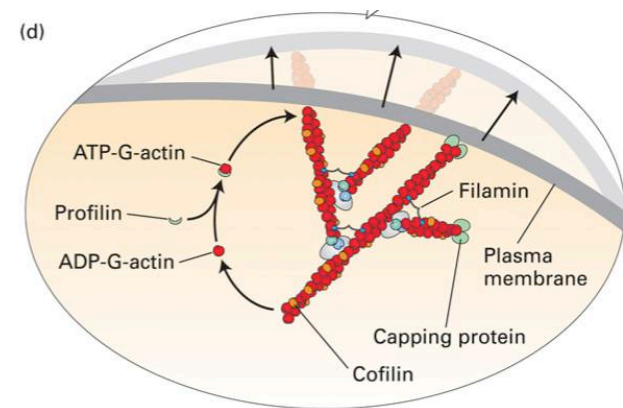
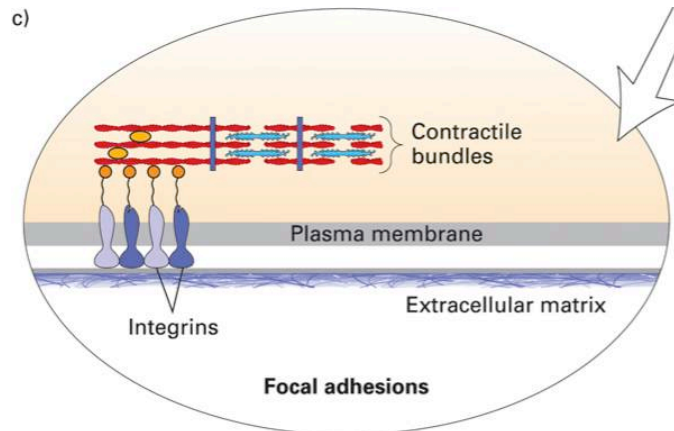
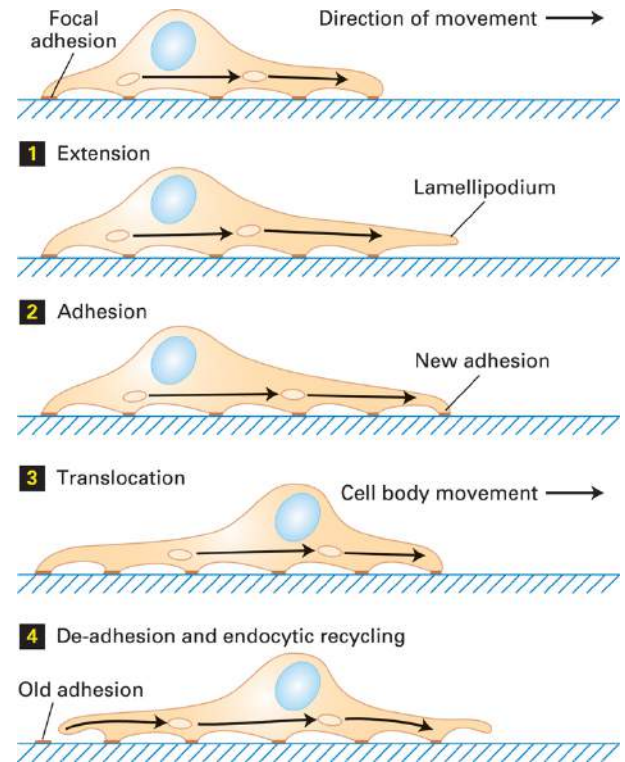
Aktin-polimerizacija



- 3 faze polimerizacije
 - nukleacija
 - dodajanje podenot na oba konca
 - konec-ravnotežje s prostim G-aktinom
- dodajanje je hitrejše na (+) koncu
- disociacija enaka na obeh koncih
- celično premikanje na osnovi polimerizacije aktina

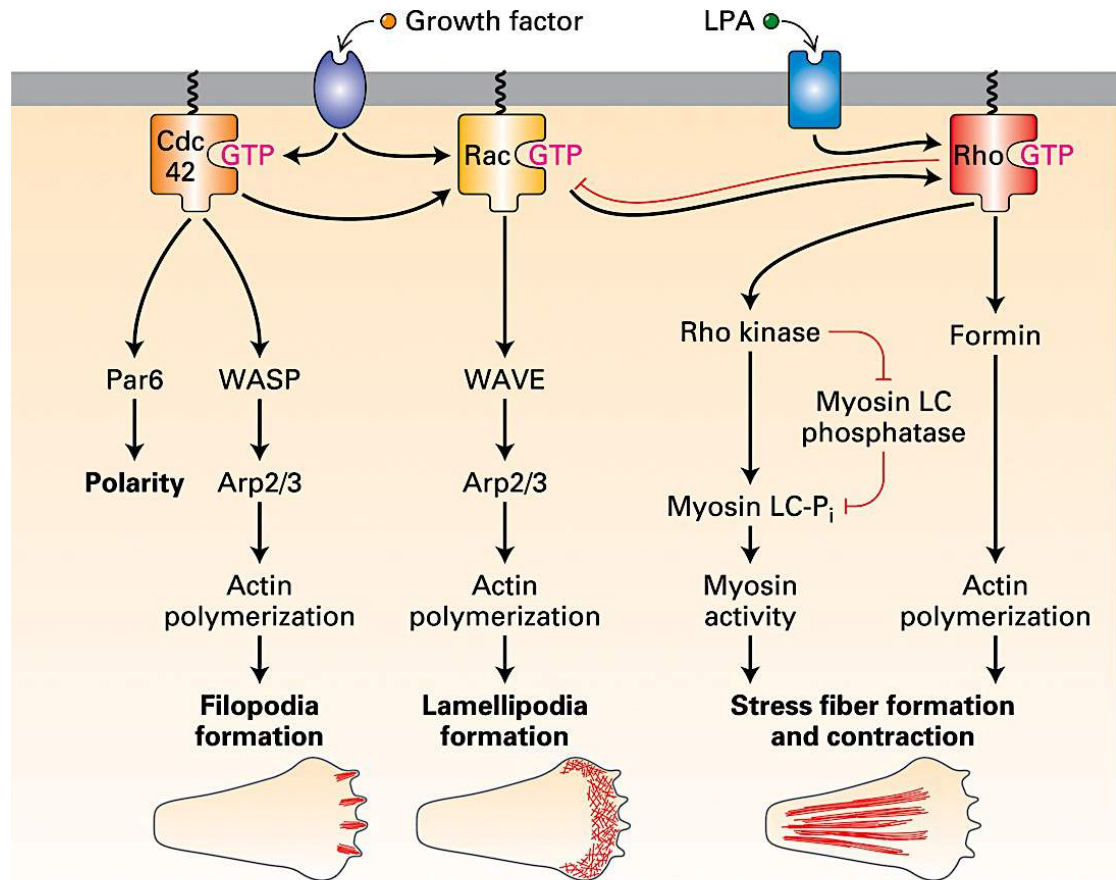
Aktin - celična migracija

- gibanje, kot posledica nastanka lamelipodijev
- lamelipodiji tvorijo fokalne stike
- zadnji del celice se skrči
- vsebina c. se prenese v sprednji del
- vzpostavi se nov adhezijski kontakt, stari popusti (de-adhezija)
- gibanje je rezultat mehanskih sil, ki jih generira citoskelet.
- celice se ne morejo premikati, če so premočno vezane ali sploh niso
- kontraktilna vlakna stisnejo telo celice v smer gibanja
- fokalni stiki
- dinamična aktinska mreža



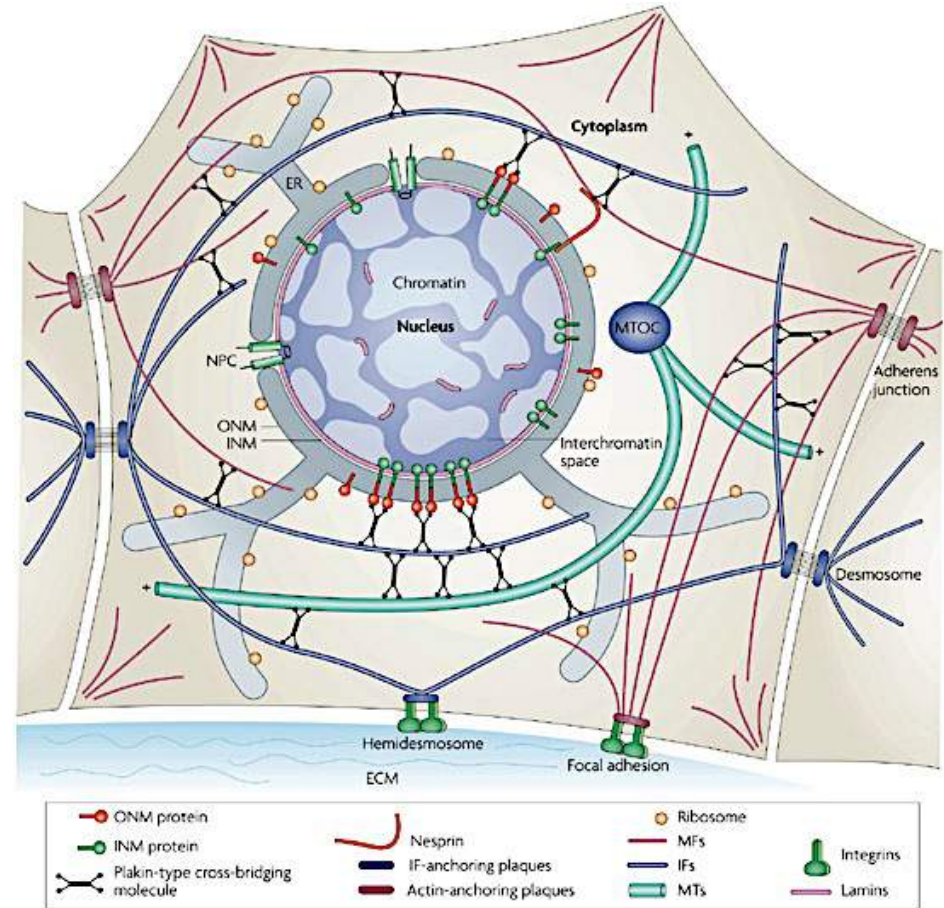
Aktin-celična migracija

- specifični rastni faktorji
- lizofosfatidilna kislina (LPA)
- aktivacija majhnih GTP-proteinov
- specifičen odgovor



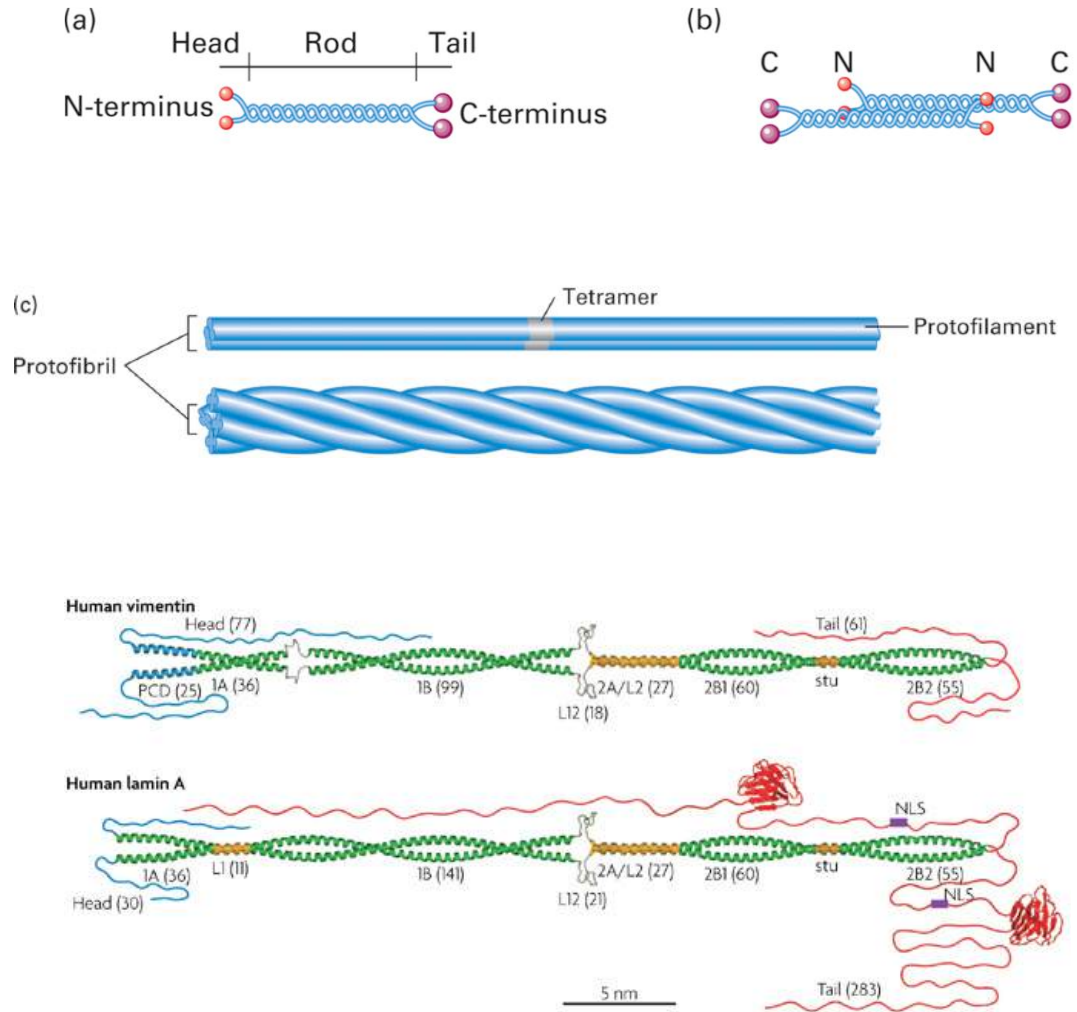
Intermediarni filamenti

- 8-12 nm strukture
- biokemijsko so mnogo bolj heterogeni
- njihovo izražanje je tkivno pogojeno
- imajo veliko natezno trdnost
- nimajo intrinzične polarnosti
- so mnogo bolj stabilne
- značilni za živali
- 40 kliničnih motenj



Intermediarni filamenti

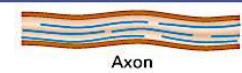
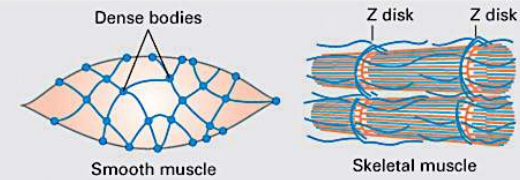
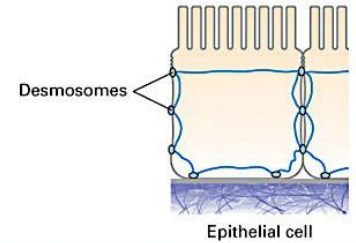
- 70 različnih genov (5 poddružin)
- ohranjeni α -helični del (310 ak)
- N- in C- konca sta globularna in različna
- dimer osnovna gradbena enota
- nadaljna asociacija v tetramer (simetrija)
- ustvarjena simetričnost—zato tudi ni polarnosti)



Keratin

- kisli keratini
- bazični keratini
- dimer iz ene bazične in ene kisle verige
- najbolj raznolika skupina
- trdni keratini
 - lasje in nohti
 - bogati s Cys
- mehki, cito-keratin
 - epiteljske celice
 - citokeratini asocirajo z dezmosomi

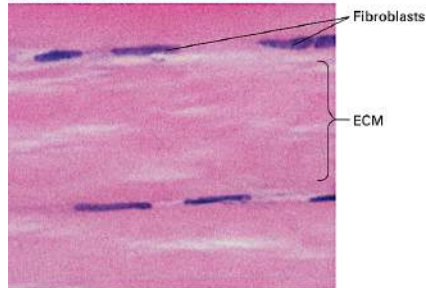
TABLE 18-1 The Major Classes of Intermediate Filaments in Mammals			
Class	Protein	Distribution	Proposed Function
I	Acidic keratins	Epithelial cells	Tissue strength and integrity
II	Basic keratins		
III	Desmin, GFAP, vimentin	Muscle, glial cells, mesenchymal cells	Sarcomere organization, integrity
IV	Neurofilaments (NFL, NFM, and NFH)	Neurons	Axon organization
V	Lamins	Nucleus	Nuclear structure and organization



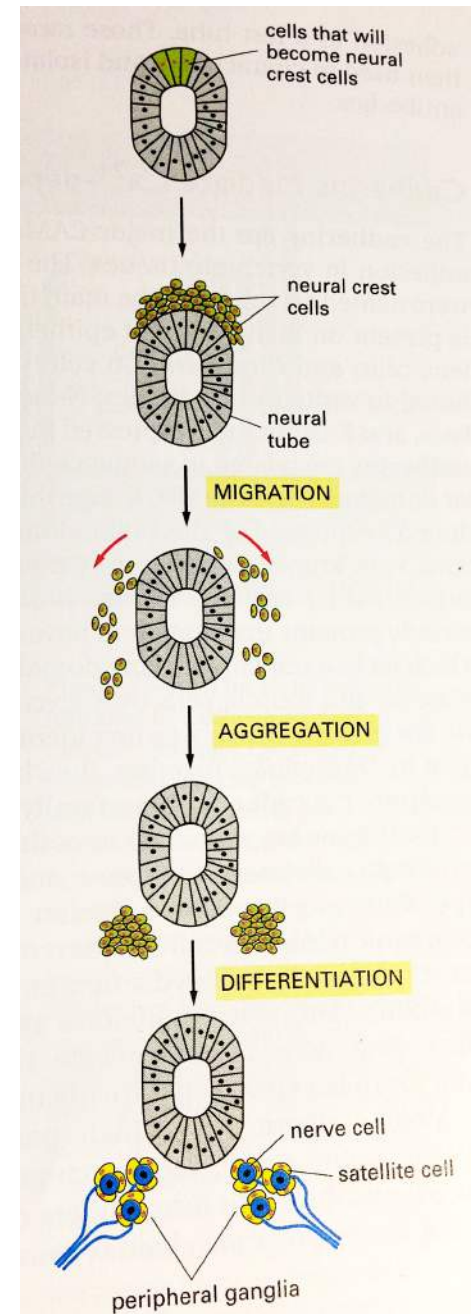
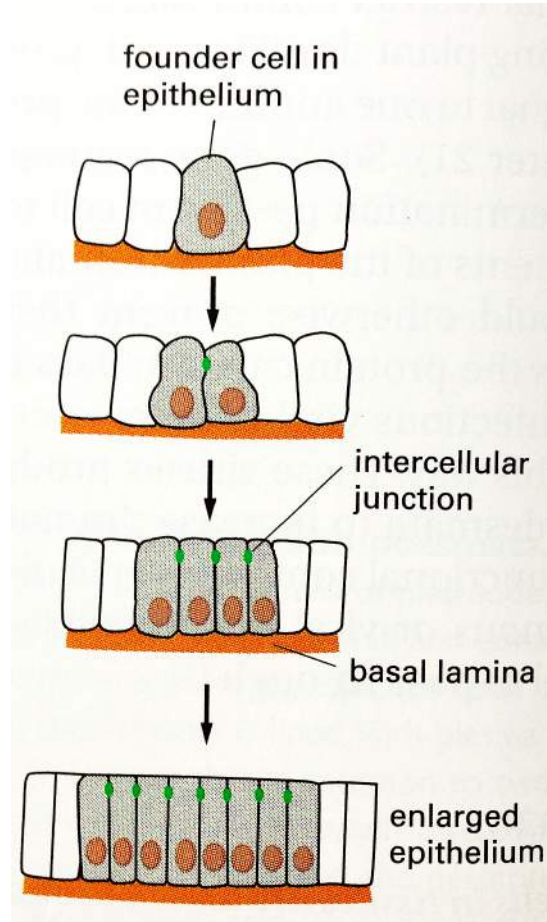
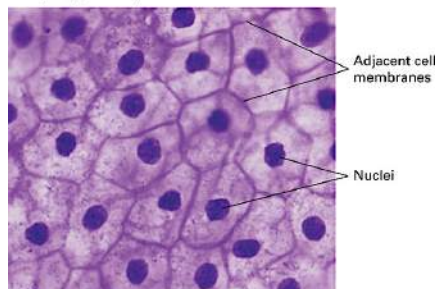
Adhezija celic

- nastanek tkiva preko adhezije celic
- prekursorske celice
- selektivna adhezija

(a) Connective tissue

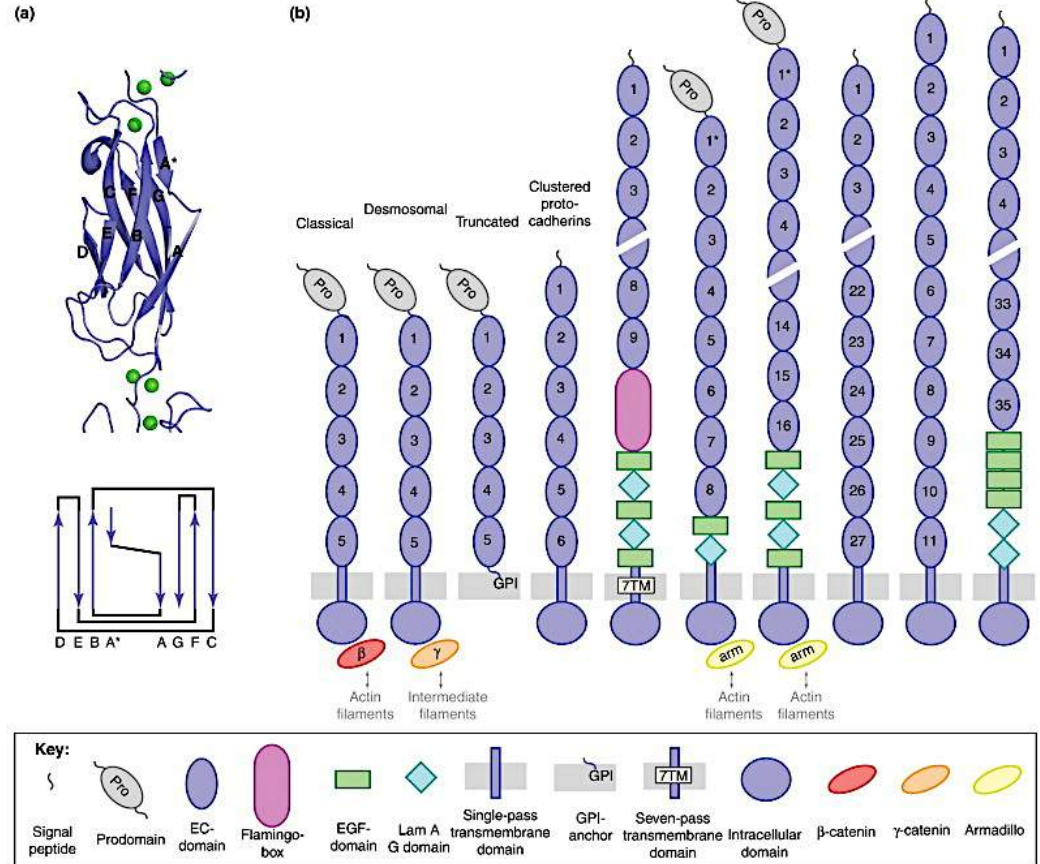


(b) Tightly packed epithelial cells



Kadherini

- glavna skupina CAM
- Ca^{2+}
- 100 različnih
- klasični kadherin
 - kadherin E (epitelij/ tudi v možganih)
 - kadherin N (nerve/ tudi v fibroblastih)
 - kadherin P (placenta)
 - kadherin VE (vascular epithelial)
- EC-, TM-, IC- domena
- ohranjenost strukture
 - Drosophila (8/16 Ig ponovitev in druge domene)
 - desmosomski kadherini (najbolj podobni klasičnim)
 - protokadherini (negativno regulirajo klasično kadherinsko adhezijo)
 - flamingo kadherini (urejajo planarno celično polarnost)



Drosophila
mehanotransdukcija
signalizacija

Klasični kadherin

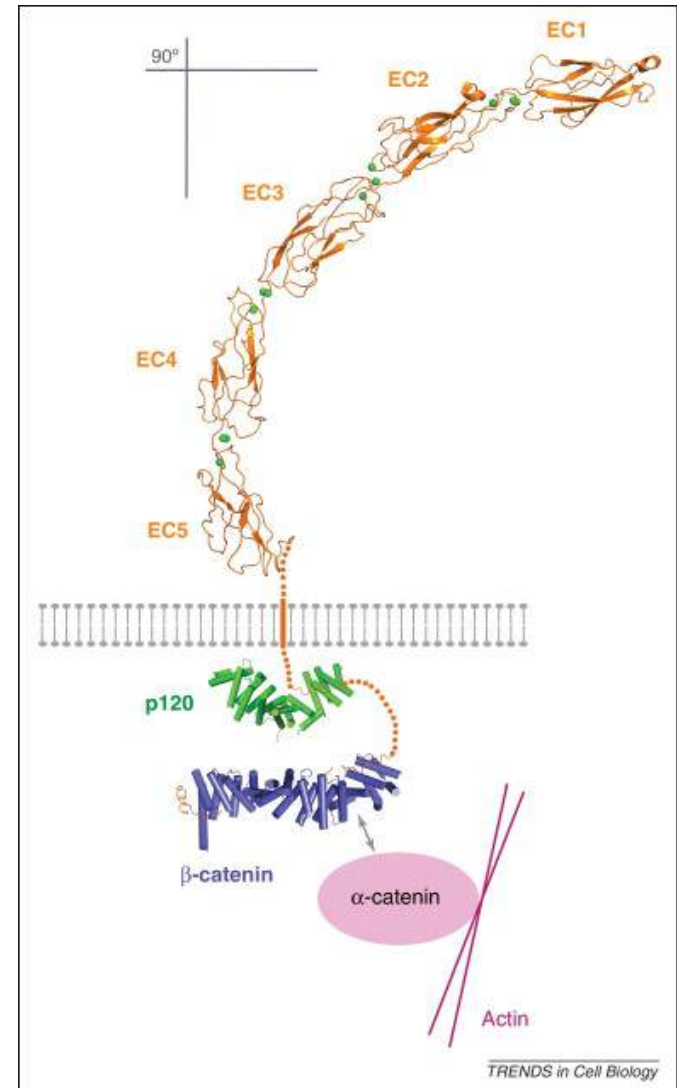
EC domena

- 5 Ig ponovitev (110 ak) s Ca^{2+} vezavnimi mesti
- tvori homofilne interakcije (*trans*→15-30 nm) preko EC1
- močno ohranjeno zaporedje odgovorno za vezavo Ca^{2+}
- Vezava Ca^{2+} ima različne vloge:
 - vzdržuje rigidnost ektodomene z značilno obliko, ki je kritična za trans vezavo (kot 90° med EC1 in EC5)
 - Ca^{2+} strukturno favorizira odpiranje verige

TM ena vijačnica

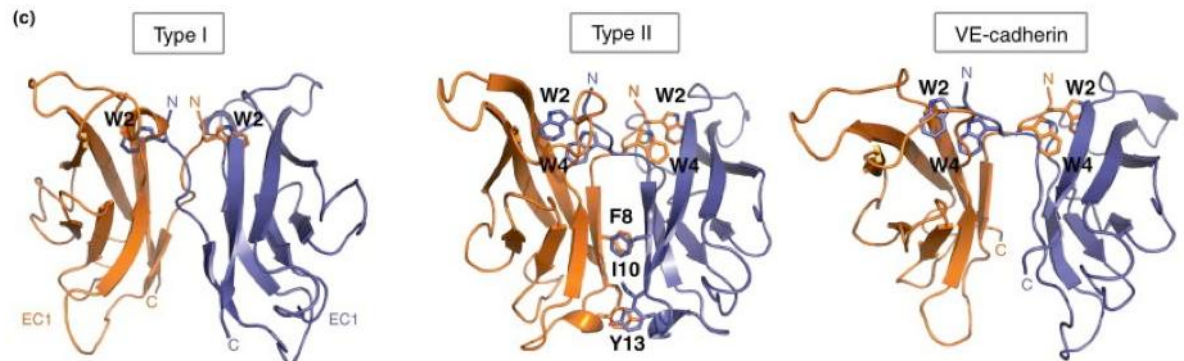
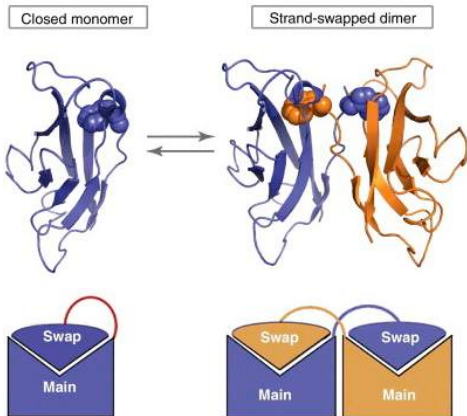
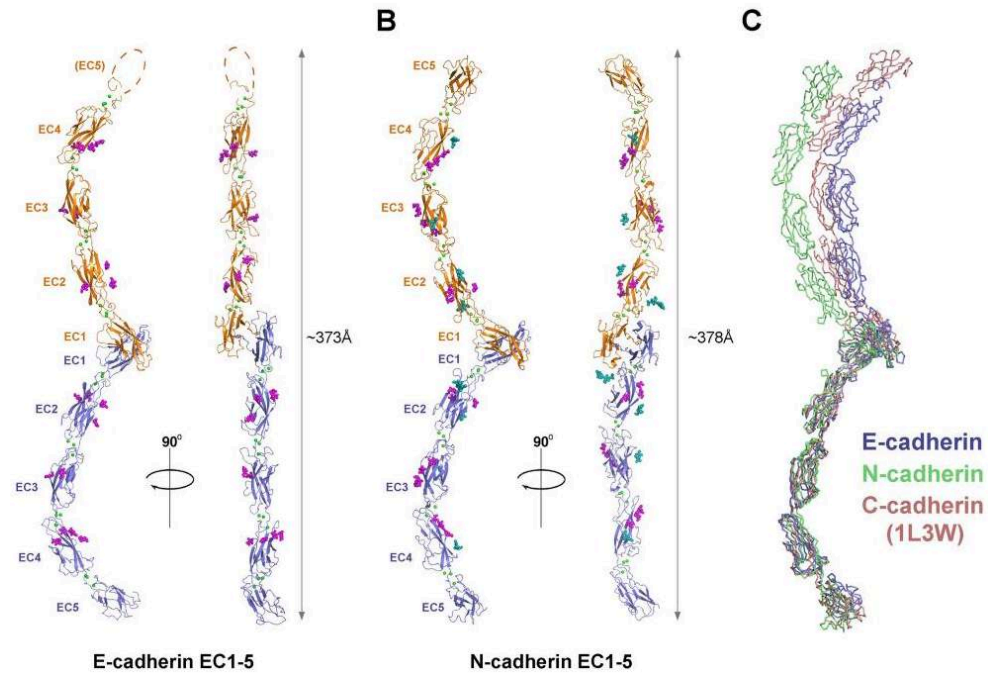
IC domena

- močno ohranjena klasičnih kadherinov
- vezavno mesto **p120** in **β -katenin**
- asociacija z α -kateninom in dalje z aktinskimi filamentami



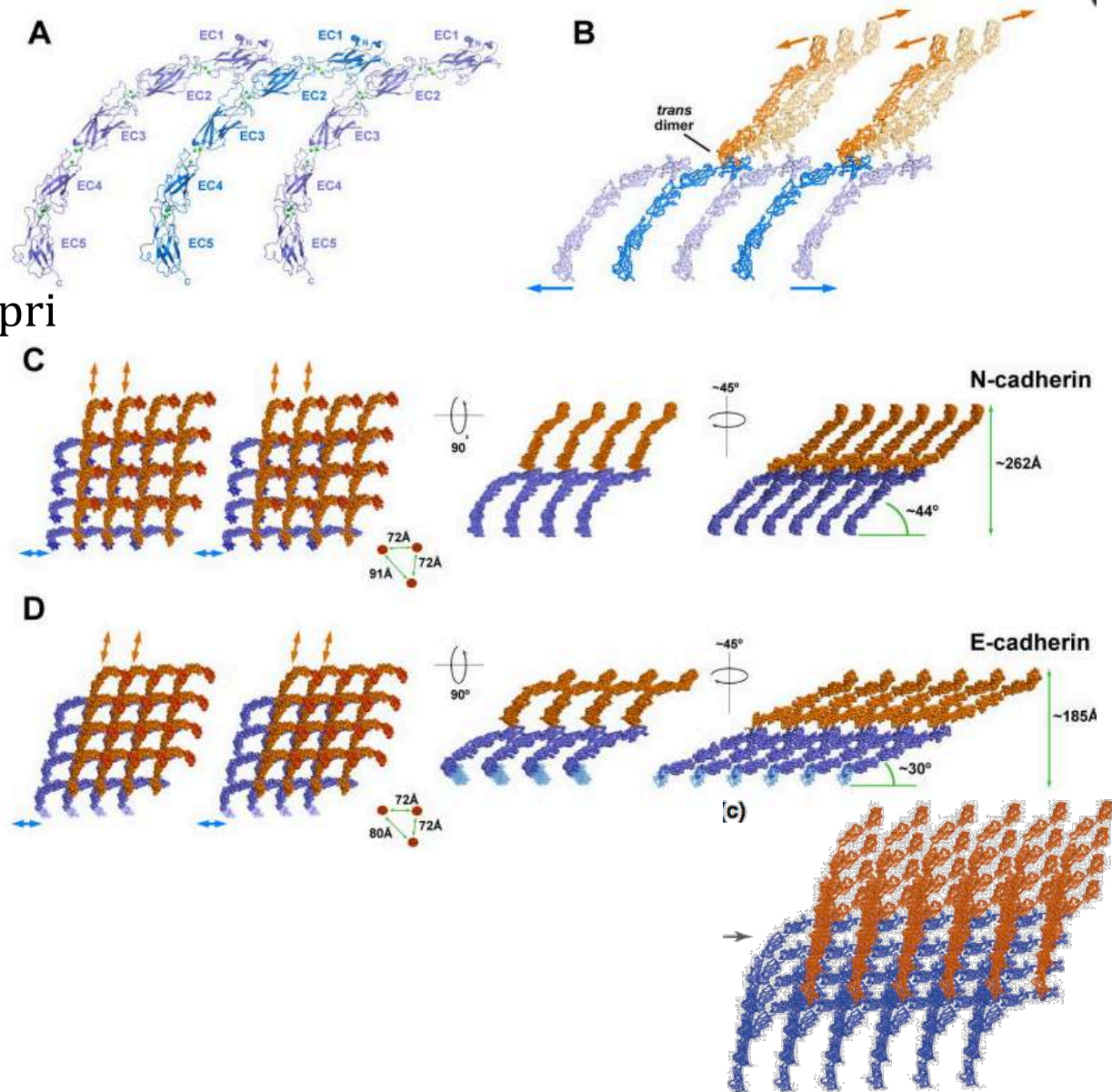
Kadherini: mehanizem adhezivne povezave

- *trans* povezava dveh EC domen EC1 domen
- izmenjava N-končnega dela verige (EC1 domene) z adhezijskim partnerjem
 - tip I: Trp2
 - tip II: Trp2 + Trp4 in še hidrofobne interakcije
 - VE kadherin: Trp2+Trp4
 - tip I in tip II se medsebojno ne izmenjujeta
- heterofilne izmenjave znotraj družine



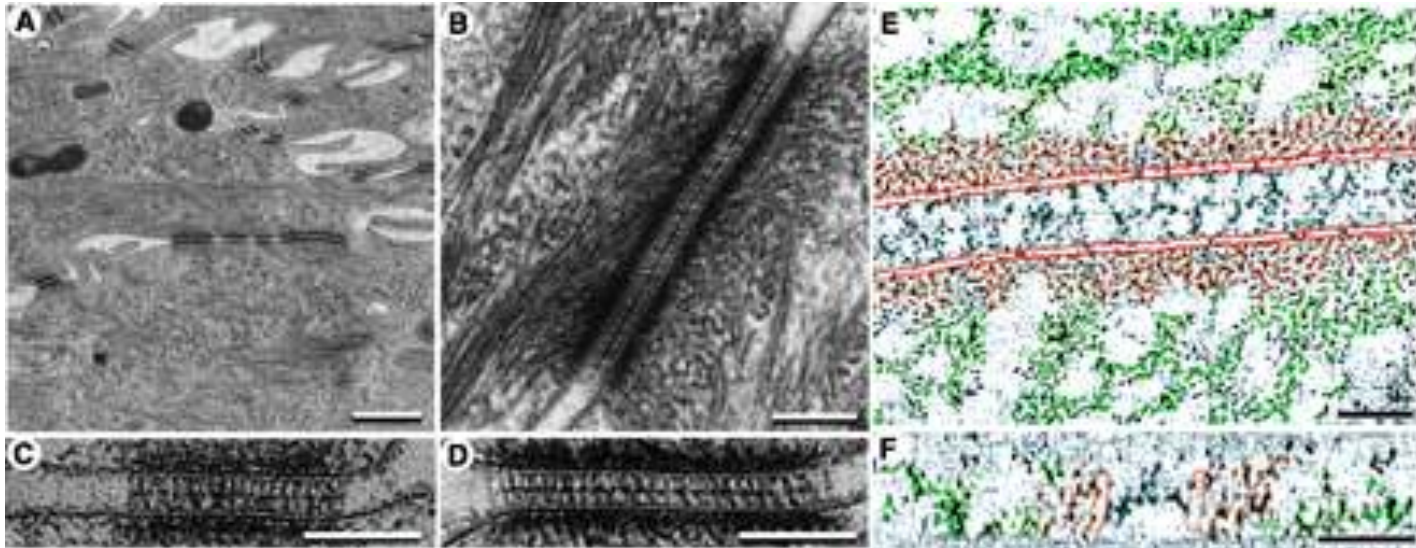
Kadherini: model mreže

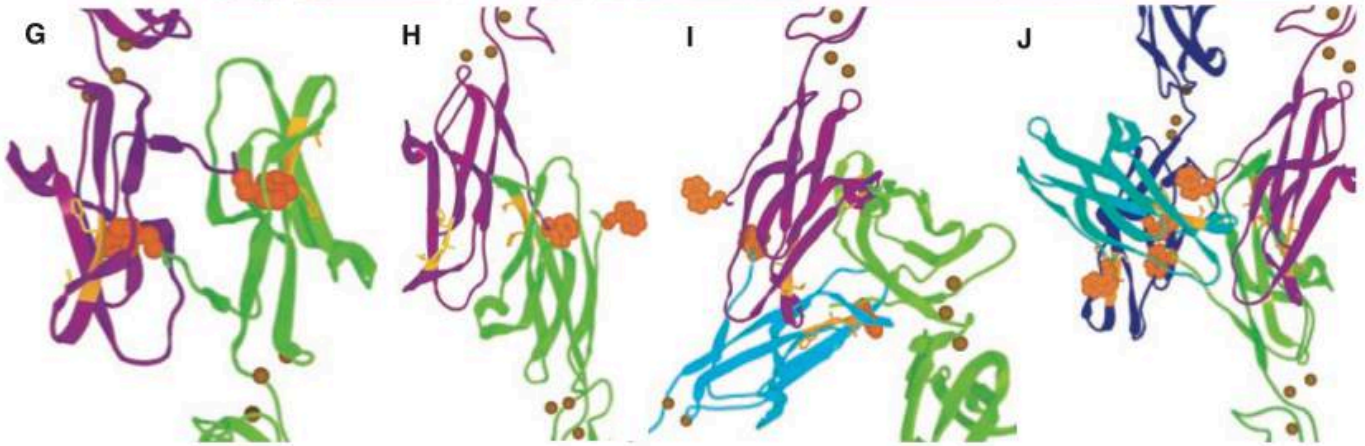
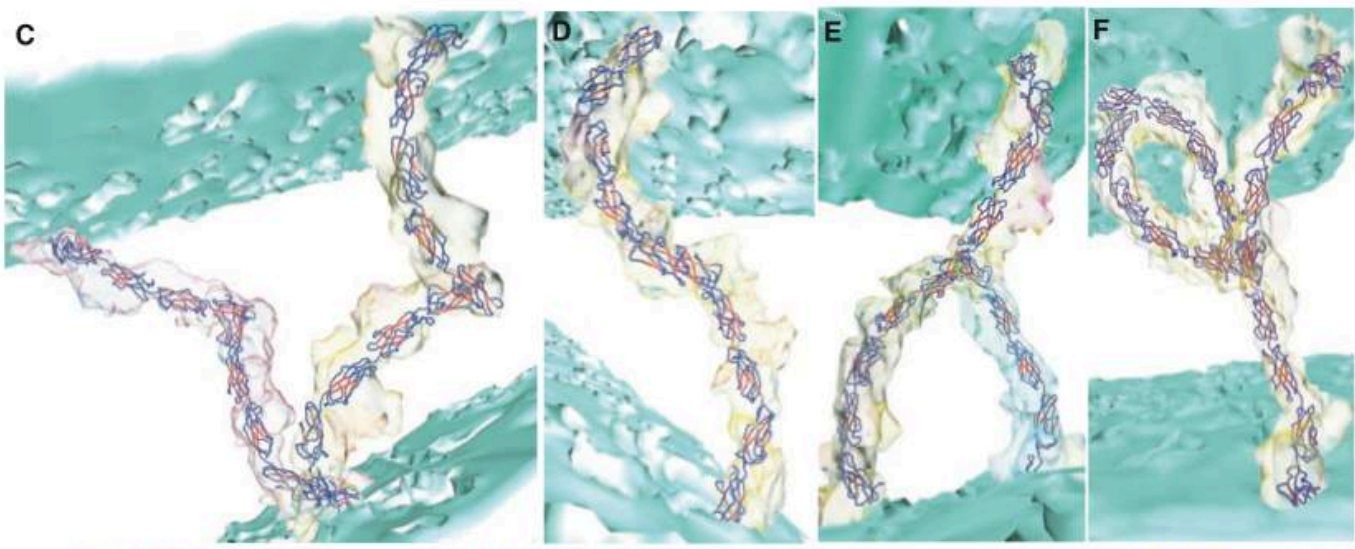
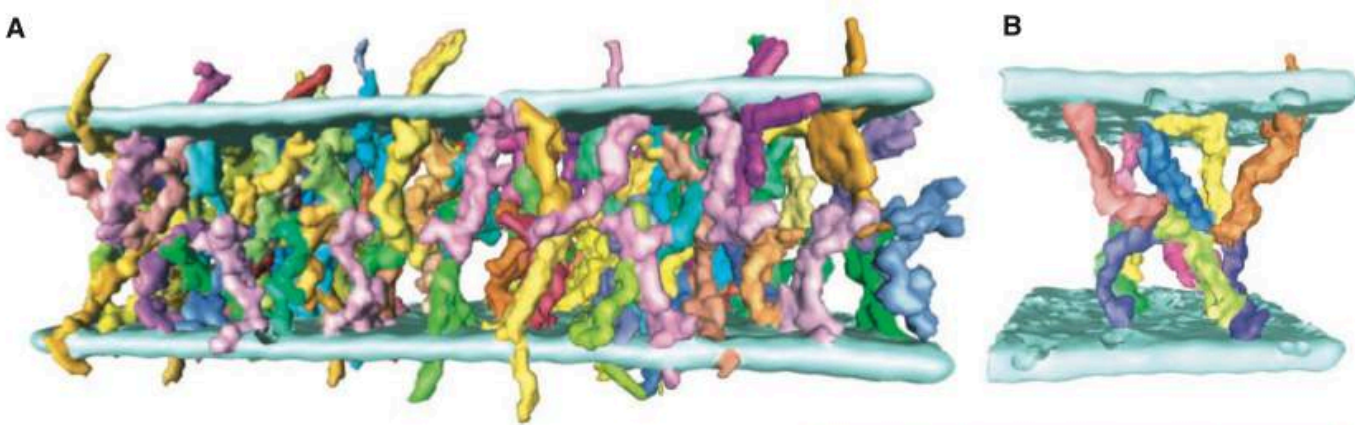
- *cis* interakcije med EC1 in EC2 dveh protomerov
- mesto interakcije na nasprotni strani od mesta pri *trans* povezavi
- vse interakcije so šibke



Elektronska tomografija celic kože

- dezmosomi *in situ*

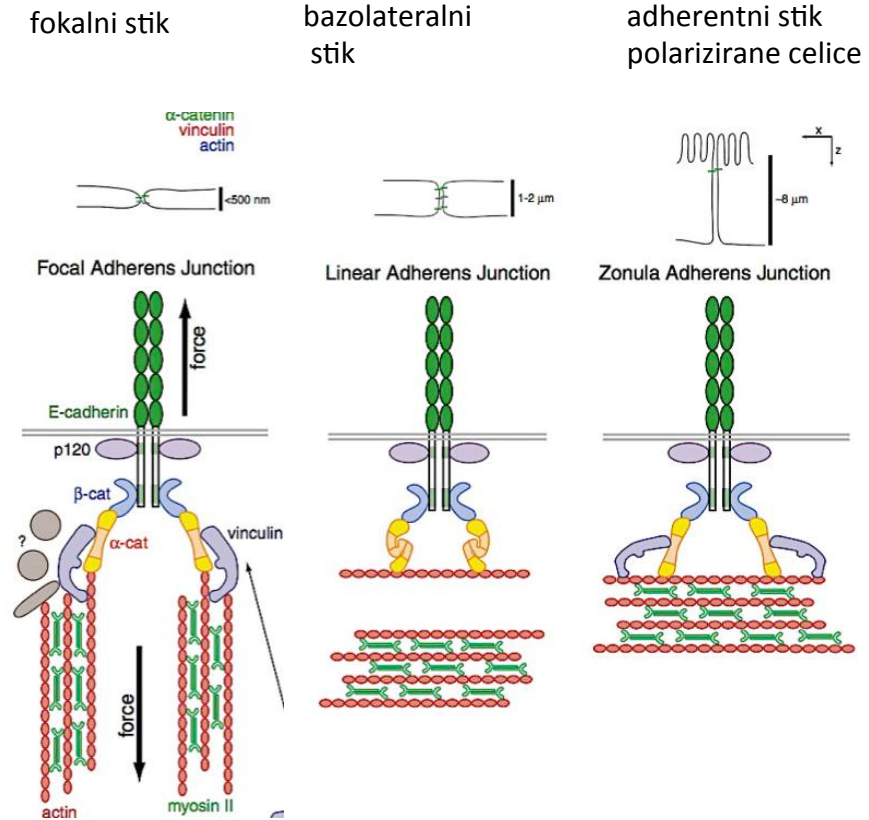




Kompleksnost povezave kadherin-aktin

Proces preoblikovanja (zorenje celice v smislu stika celica-celica)

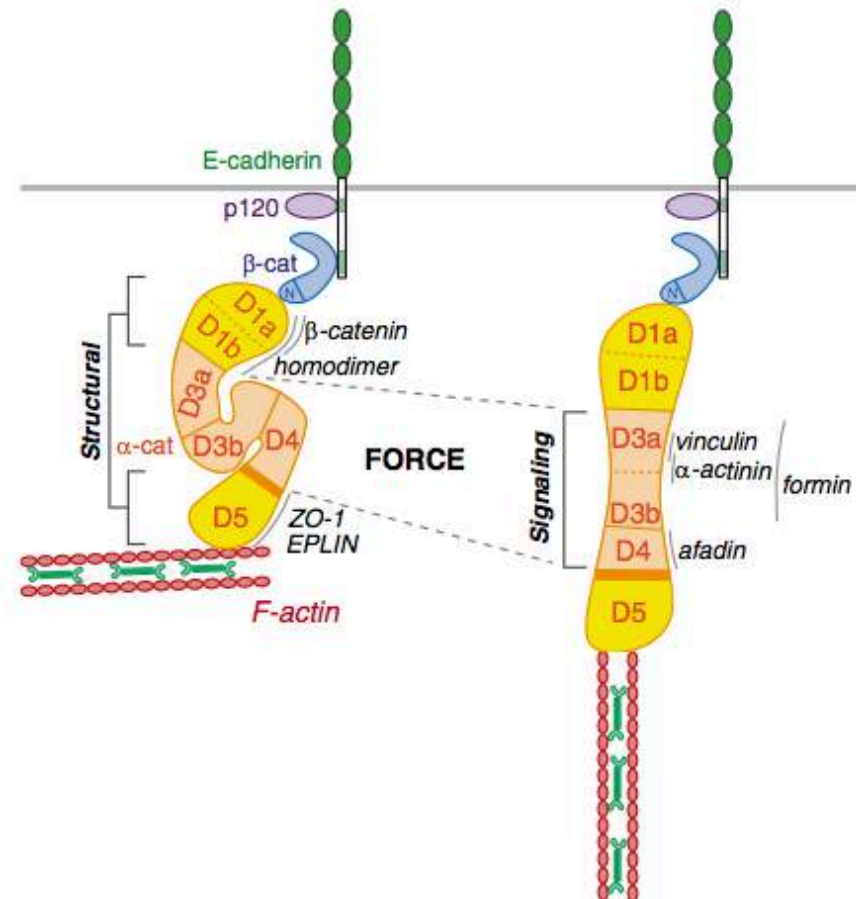
- fokalni stik
 - proces preoblikovanja
 - tvori ob začetnem kadherin/kadherin kontakt
 - prisotnost vinkulina pogojena (napetost/pritisk/tenzija)
 - miozinska kontraktilnost radialno usmerjena
- bazolateralni stik
 - umiritev procesa
 - manj tenzije, odsotnost vinkulina
 - α -katenin v skrčeni obliki
- prehod med obema oblikama je dinamičen
- adherentni stik pri polariziranih celicah
 - tvori se F-aktinski pas, ki povezuje celice
 - aktivnost miozina/rekrutacija vinkulina



Kompleksnost povezave kadherin-aktin

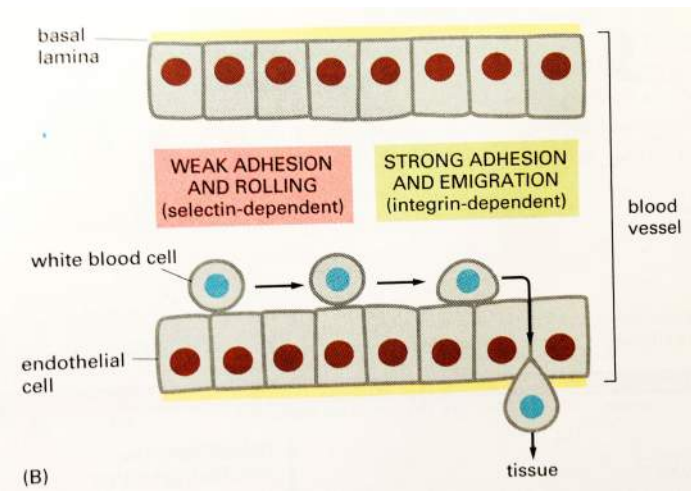
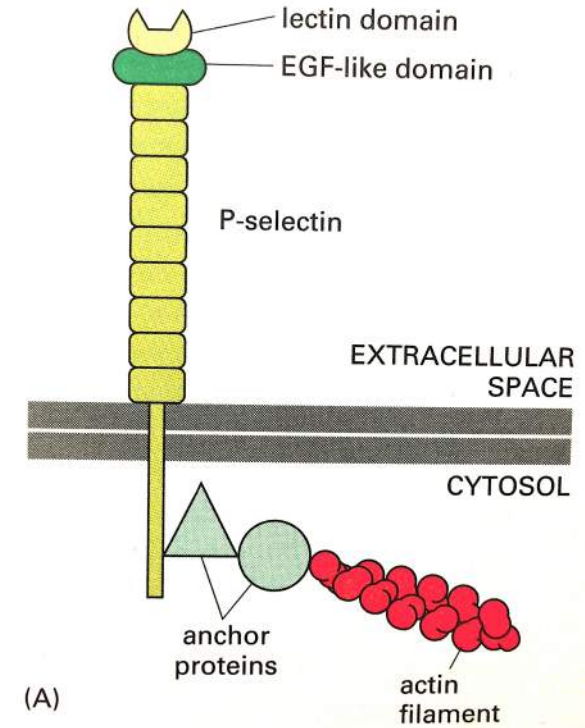
Strukturna in signalizacijska vloga α -katenina pri preoblikovanju tkiva:

- α -katenin
- vezavno mesto F-aktin in β -katenin
- centralna domena α -katenina
- D4/D3a interakcija
- vezavno mesto za vinkulin
- rekrutiranje adapterskih proteinov
- centralni del je ključen za regulacijo in deluje na osnovi sile



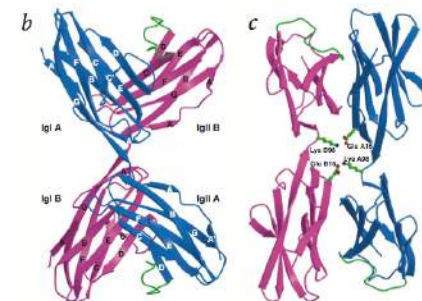
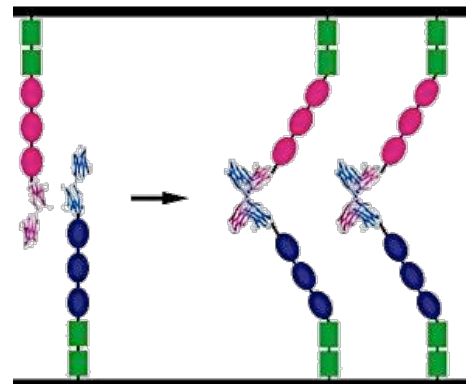
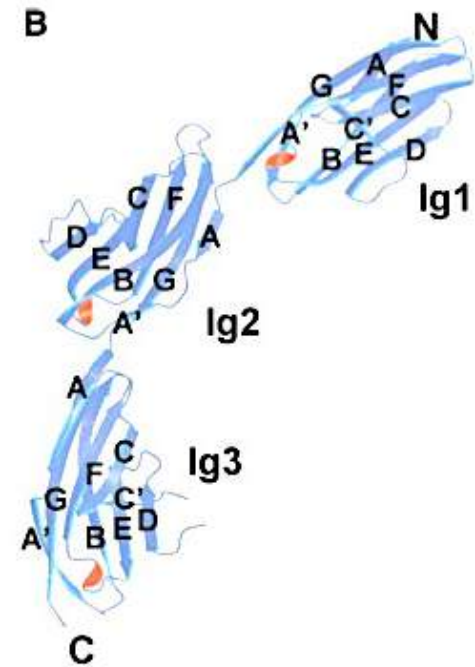
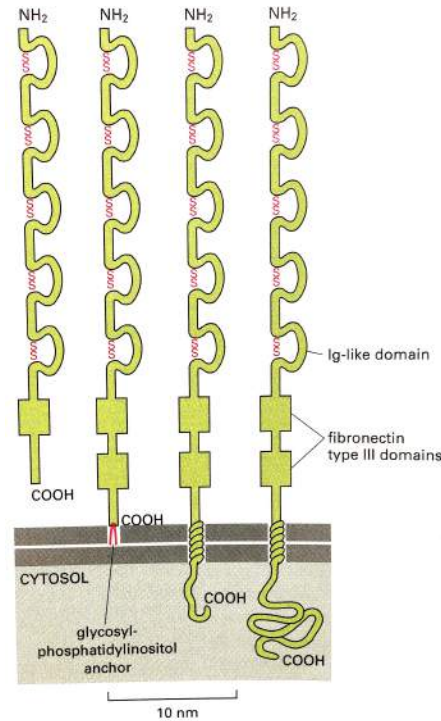
Selektini

- Levkociti
- poseben adhezijski sistem
- selektni (Ca^{2+} odvisni)
 - L-selektin (levkociti)
 - P-selektin (trombociti)
 - E-selektin (endotelijske c.)
- pomagajo pri migraciji celic v tkivo
- prepoznajo oligosaharide na endotelijskih c.
- nizka adhezijska afiniteta
- aktivacija integrinskega sistema
- obratno, na mestu vnetja endotelijske c. izražajo selektine-prepoznajo oligosaharide na levkocitih in trombocitih

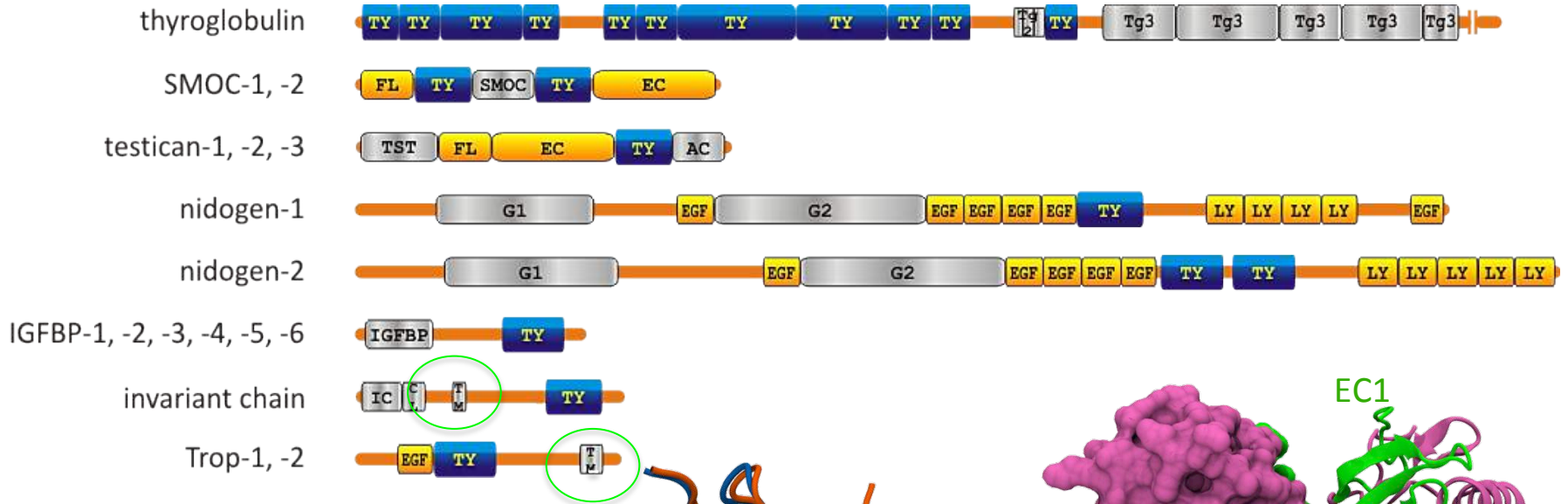


N-CAM

- Neural Cell Adhesion Molecule
- 20 različnih
- za razliko od kadherinov in selektinov ne potrebujejo Ca^{2+}
- spadajo v naddružino z Ig domenami
- izraža se v različnih celicah, vključno ž.c.
- nekatere oblike vezano sialno kislino – antagonisti adhezije
- tudi signalizacijska vloga (fosforilacija preko asociacije s Tyr kinazo)

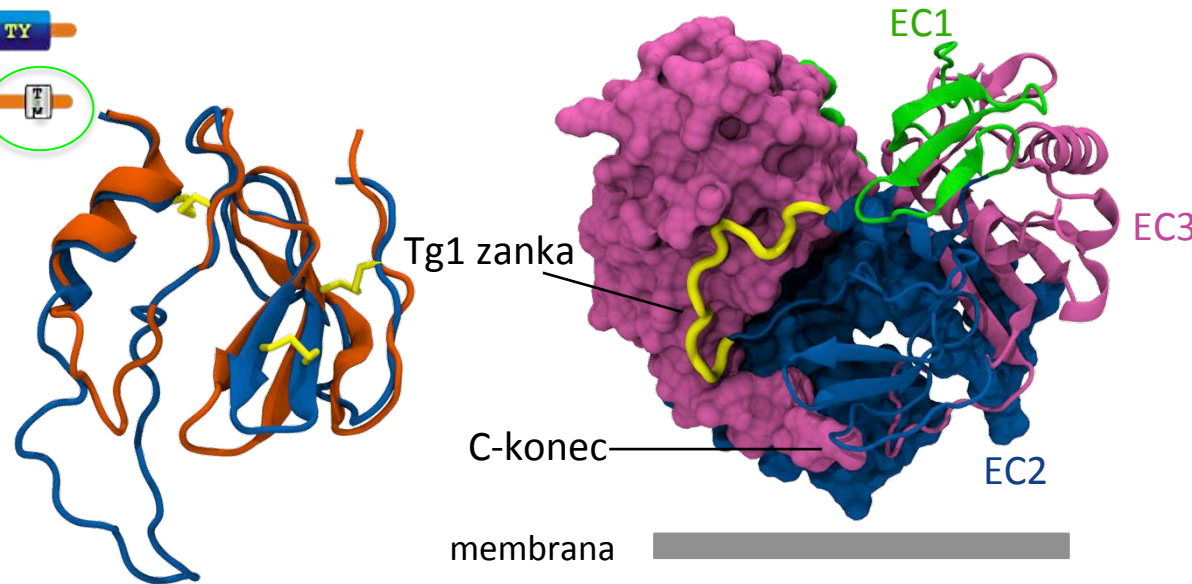


Transmembranski proteini

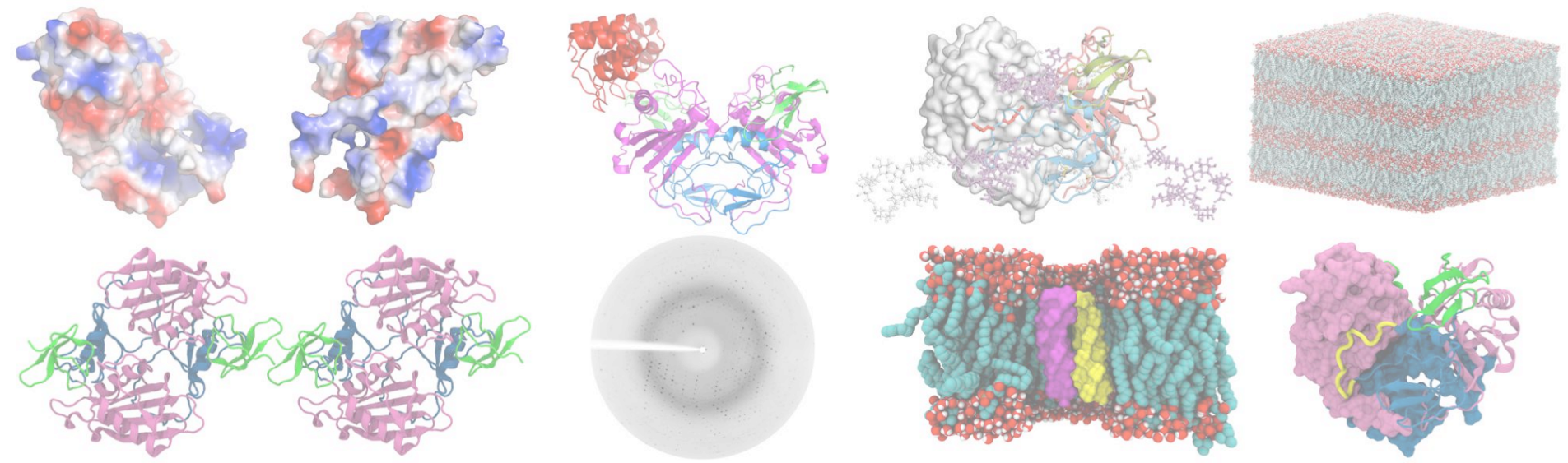


Imajo homologne domene podobne funkcije?

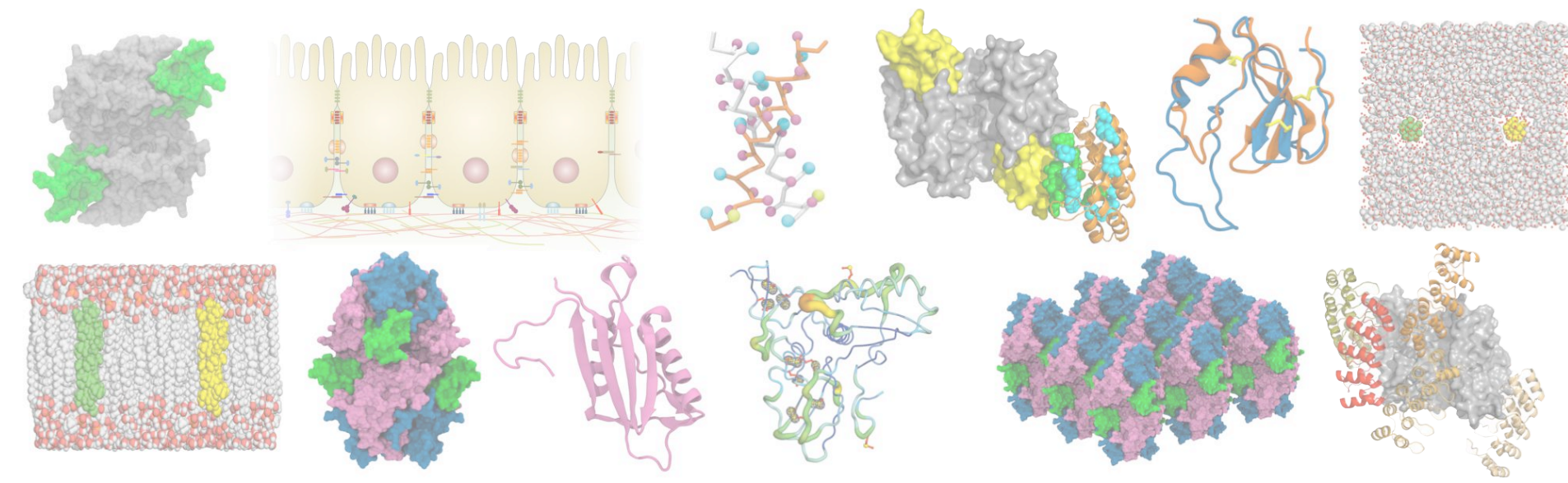
fragment p41 kot inhibitor CP



- Tg1 domena v fragmentu p41/inhibitor cisteinskih proteaz (rdeče)
- Tg1 domena v EpCAM/strukturna vloga pri dimerizaciji
- Tg1 domena IGFBP /vezava ravnega faktorja
- TG! domena SMOC /odgovorna za razvoj oči in okončin

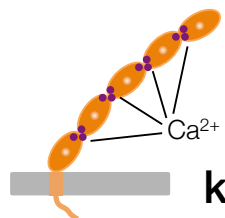


EpCAM

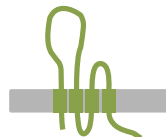


EpCAM = Epithelial Cell Adhesion Molecule

Epitelijska Celična Adhezijska Molekula



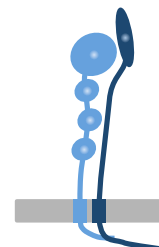
kadherini



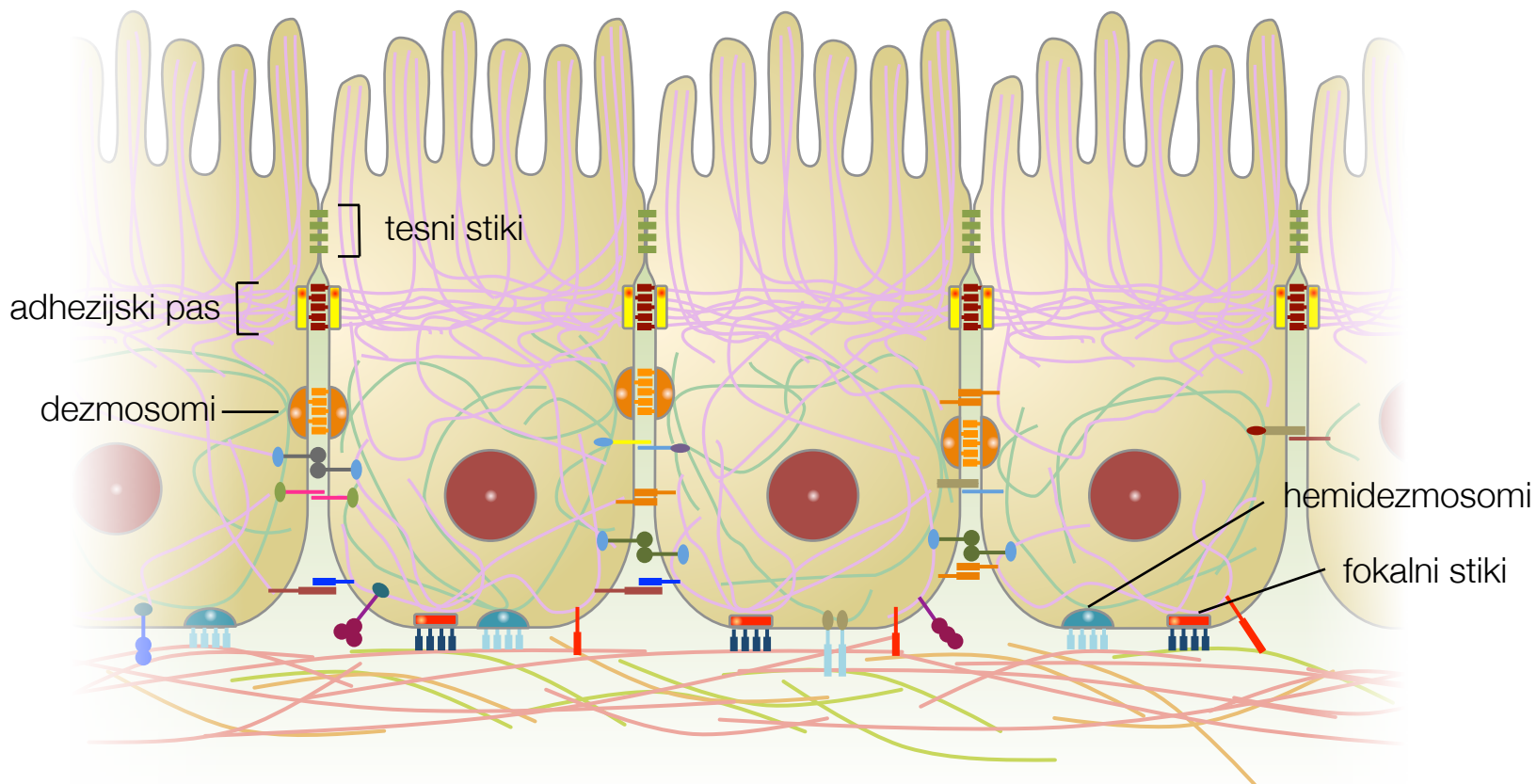
klavdini in
okludini

druge molekule:

- IgSFCAM
- selektini
- ...
- **EpCAM**



integrini

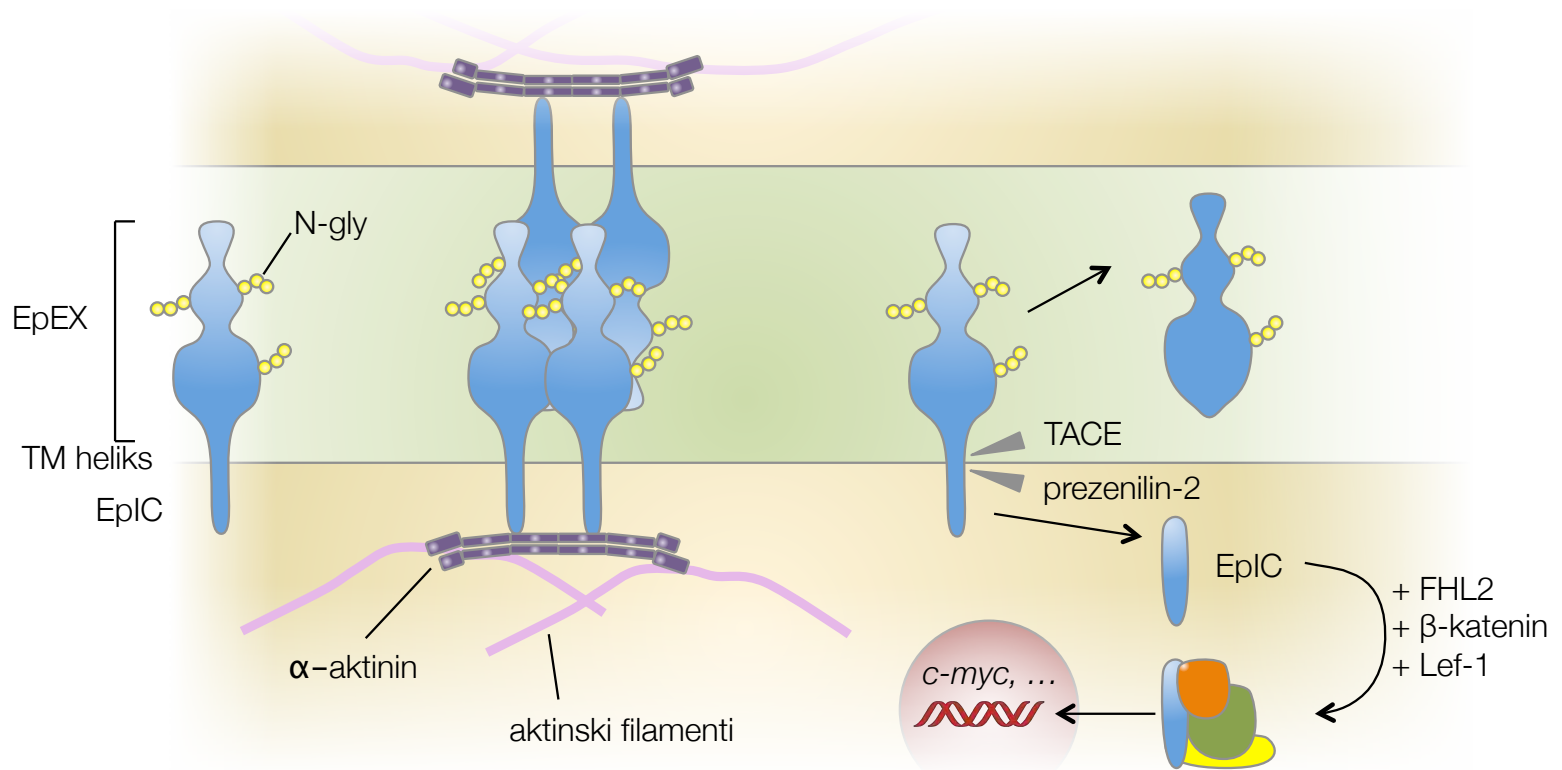


EpCAM = Epithelial Cell Adhesion Molecule

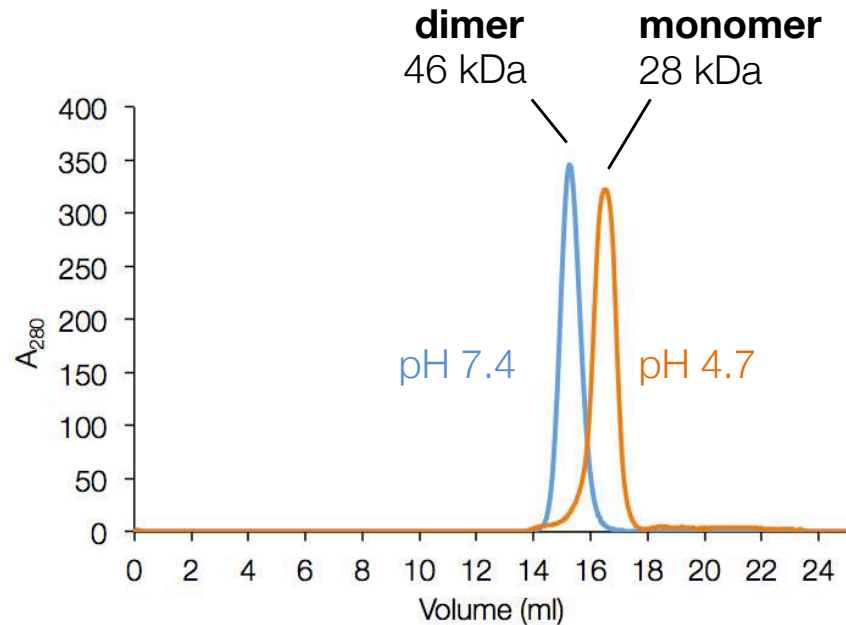
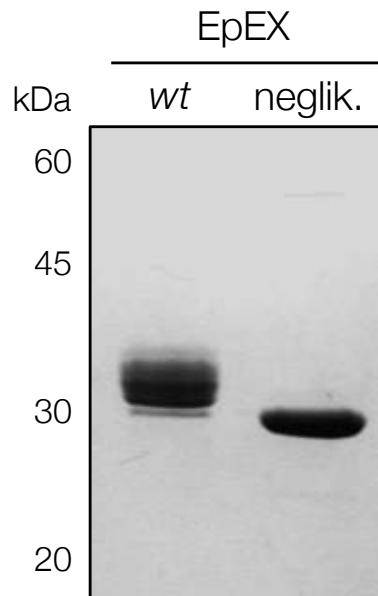
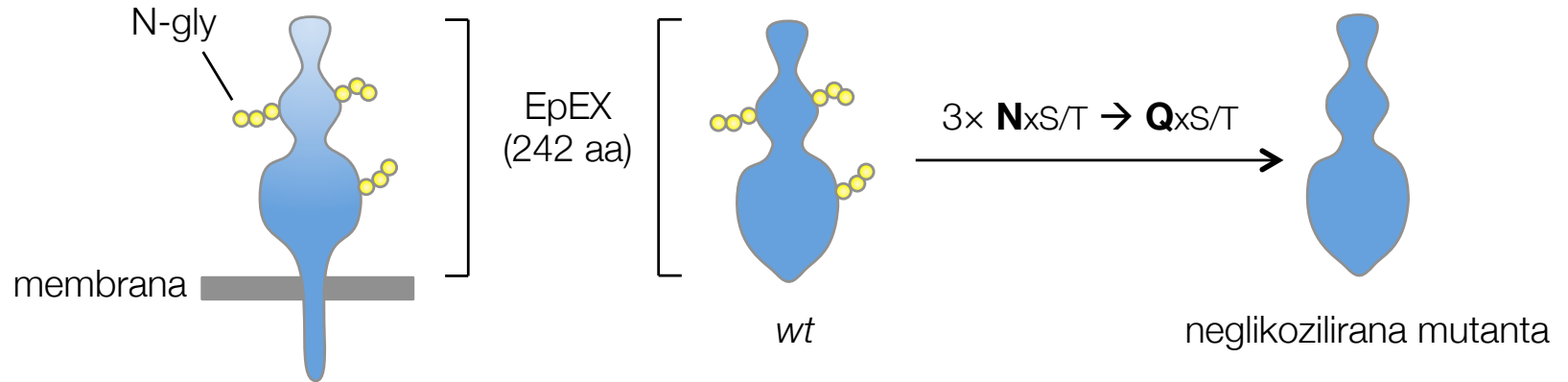
Epitelijska Celična Adhezijska Molekula

Znana dejstva:

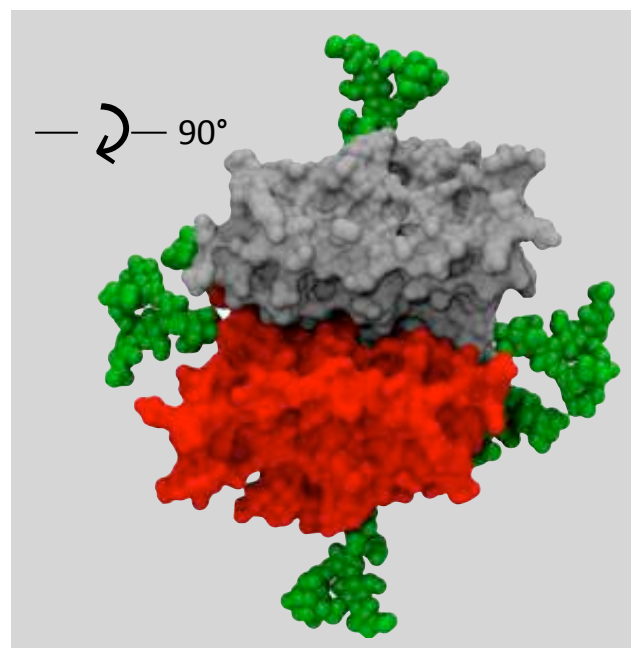
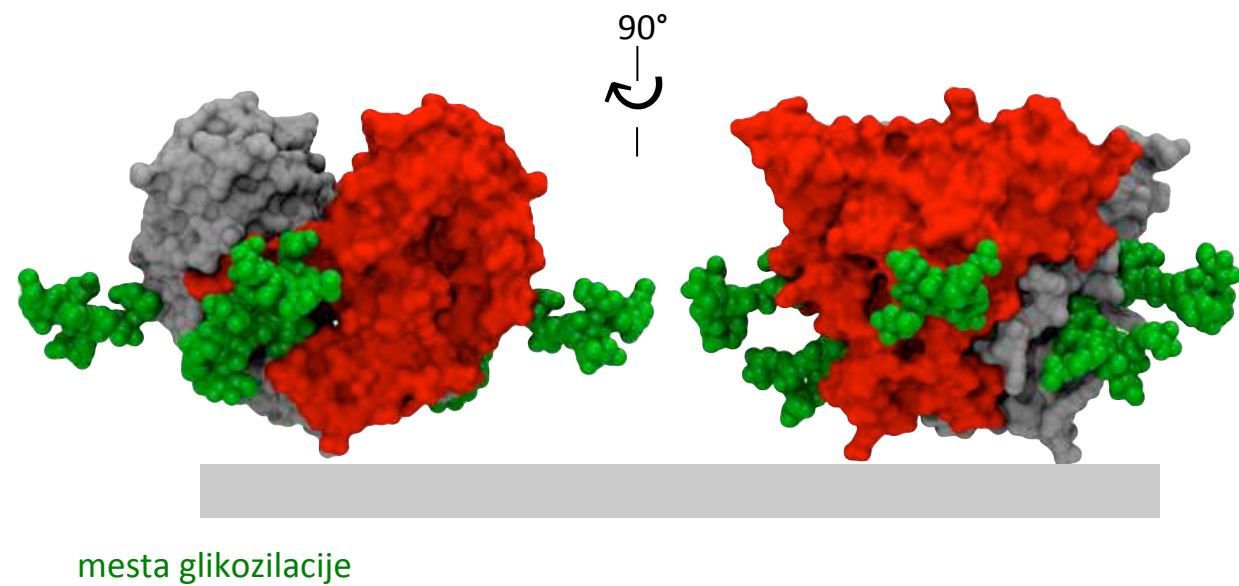
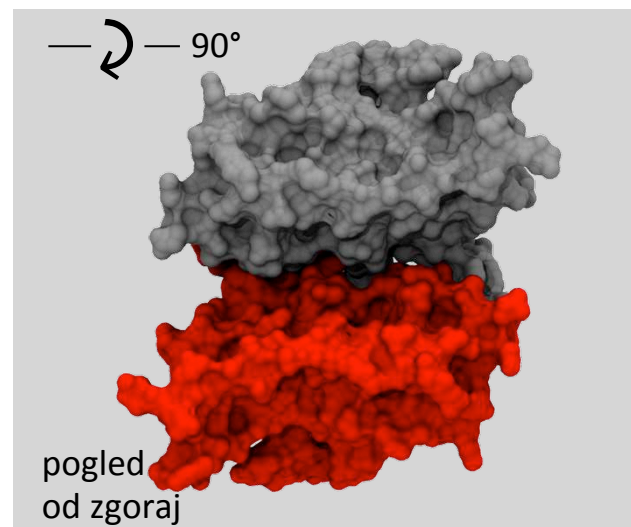
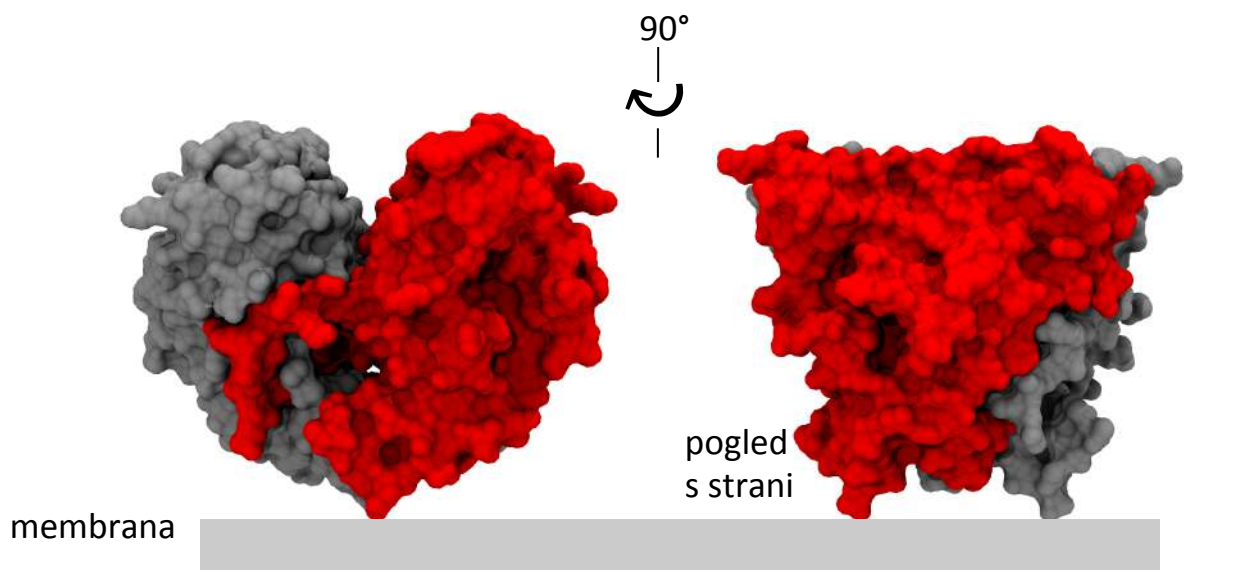
- homofilna od Ca^{2+} neodvisna **adhezija celica-celica (oligomeri)**
- izražanje: ↓ epitelijske celice, ↑ **matične in karcinomske celice**
- jedrno **signaliziranje** → **proliferacija**



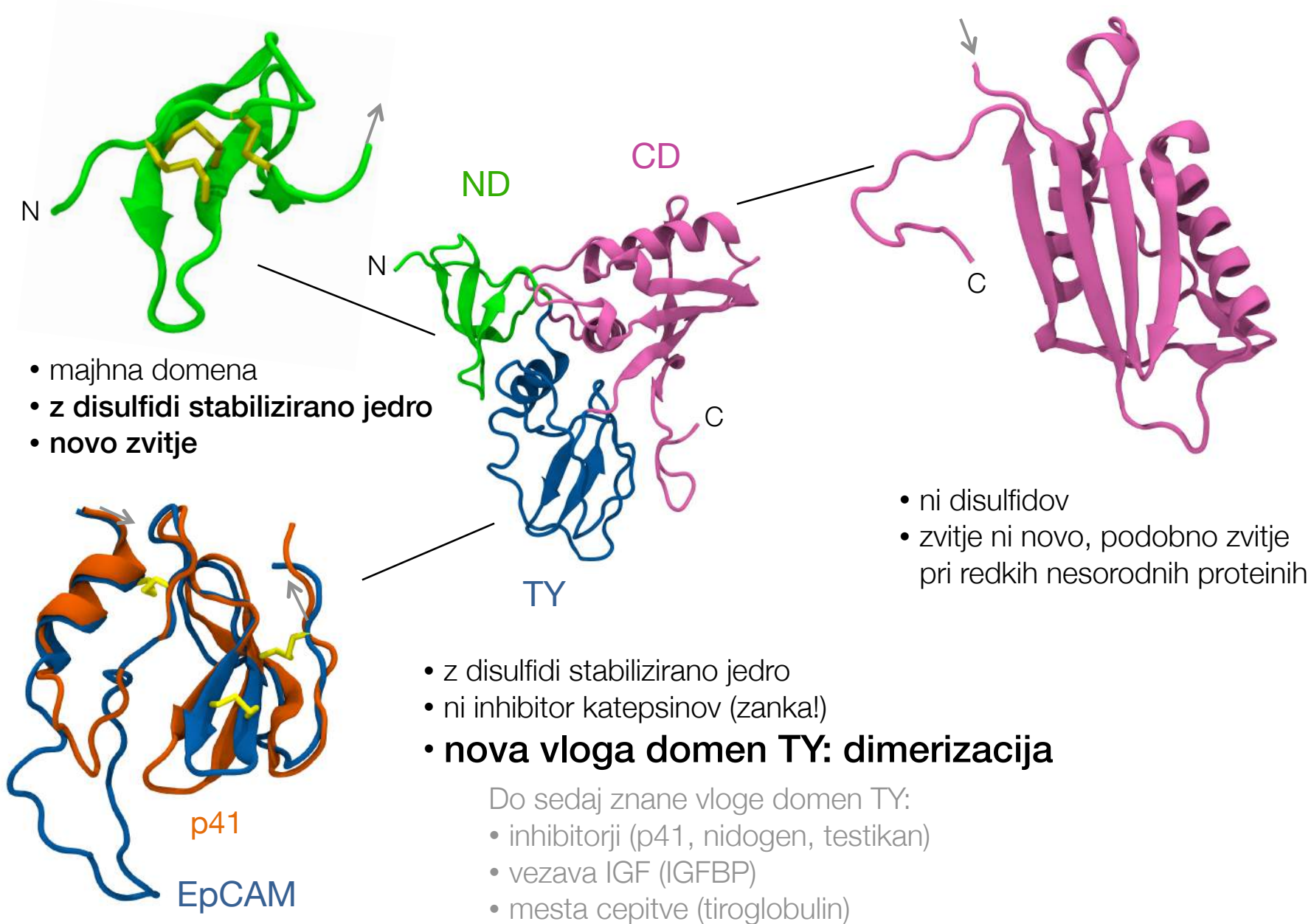
Priprava materialala



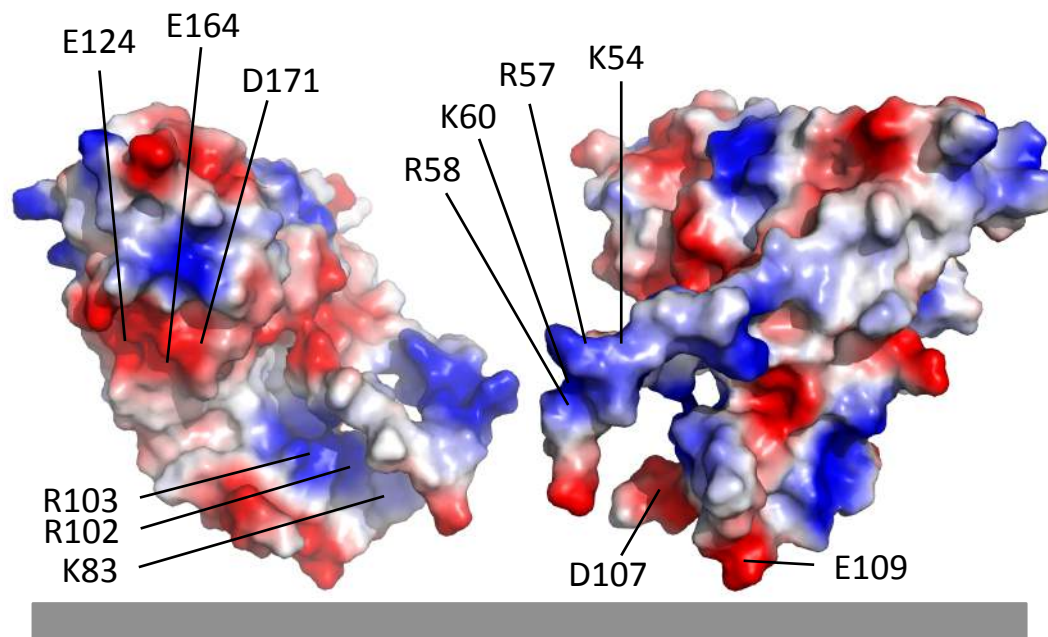
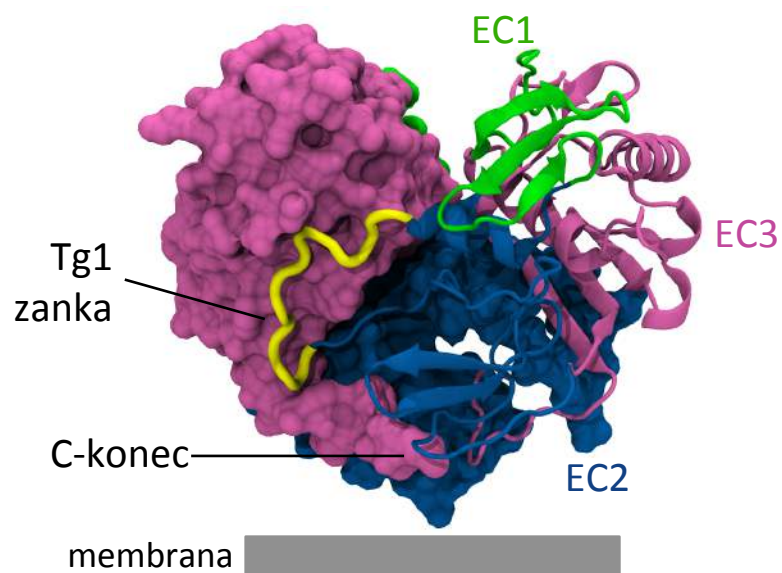
Struktura dimera zunajceličnega dela



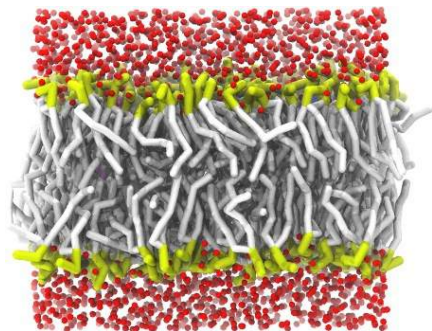
Struktura podenote



cis dimer EpCAM



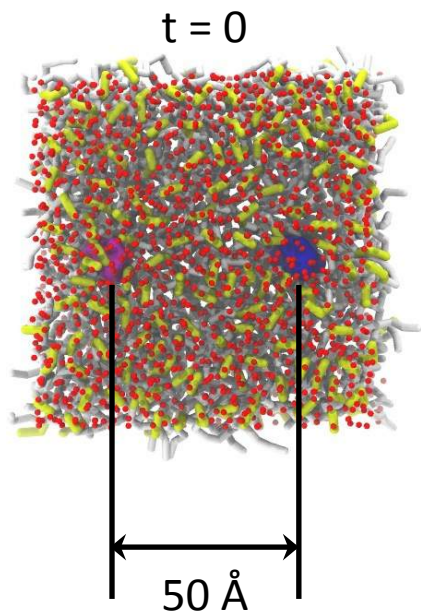
dimerizacija TM heliksa



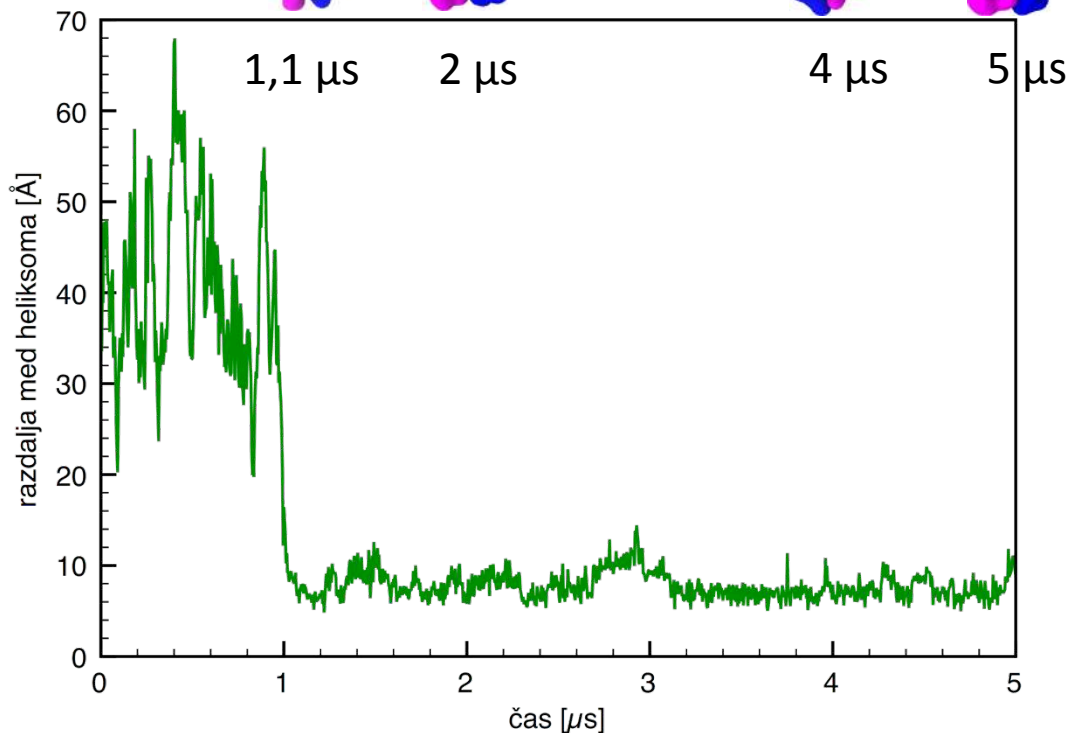
NAMD MD simulacija;

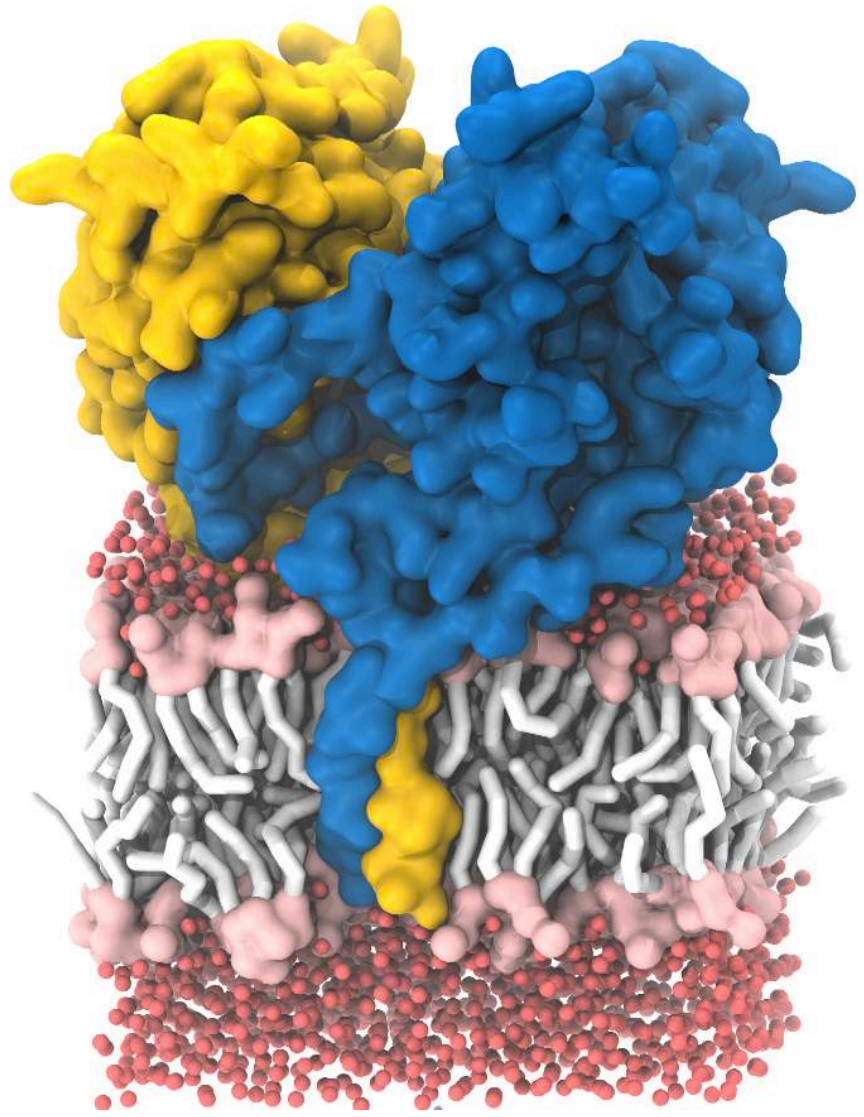
POPC lipidna faza

(POPC = 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)



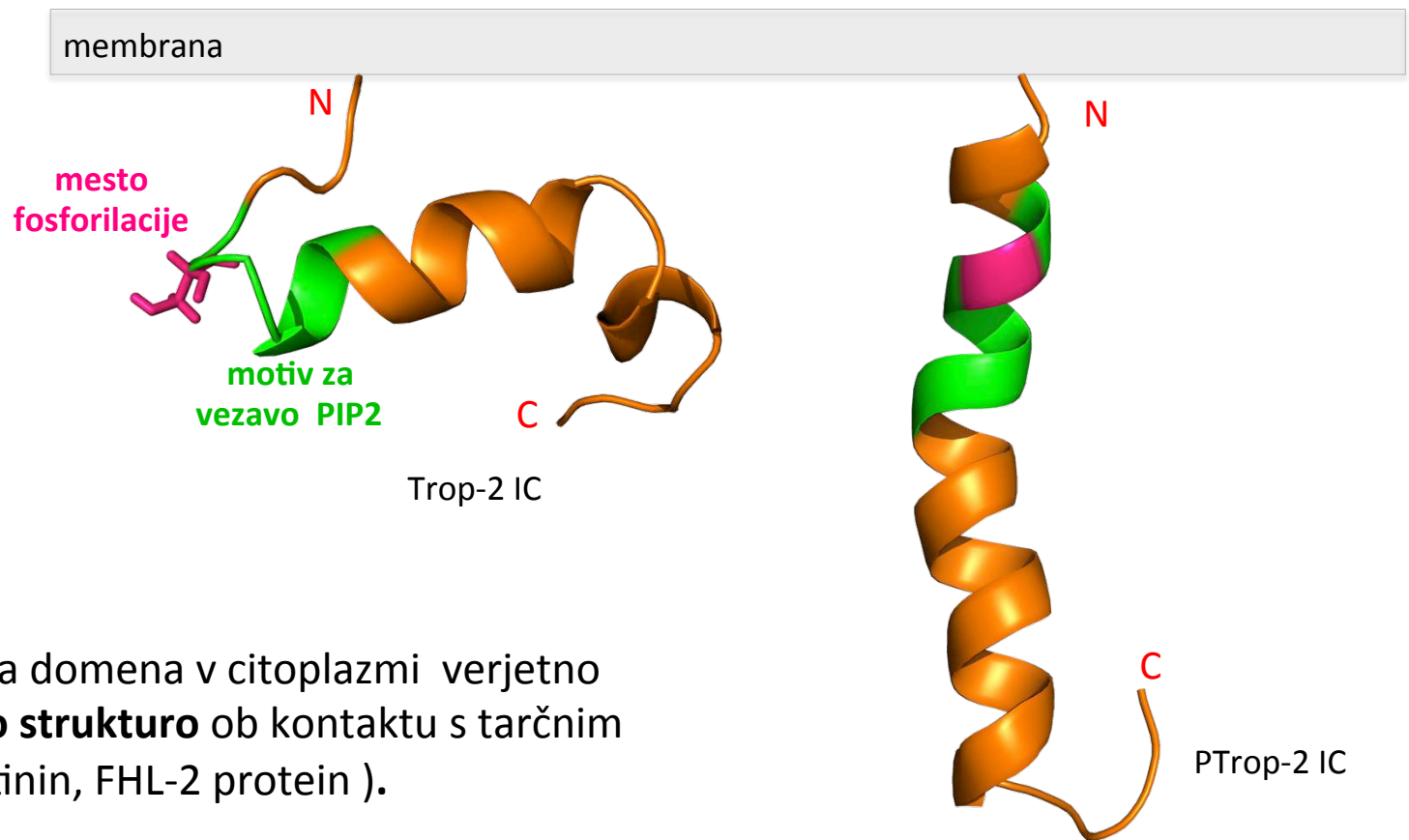
TM zaporedje (23 ak): AGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVI





NMR struktura Trop2ic

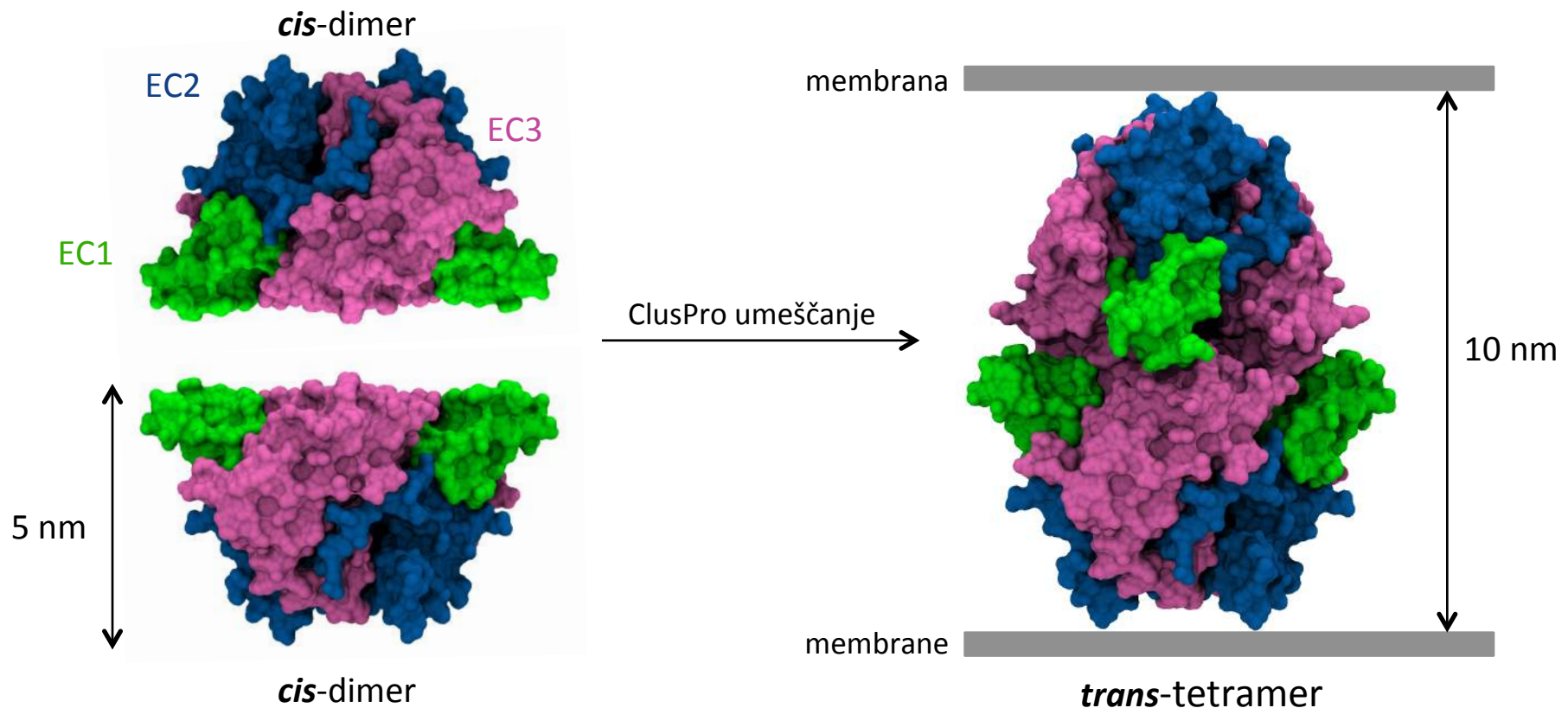
EpCAM : SRKKRMA**KY**E**KAEIKEMGEMHREL**NA
Trop-2 : **TNRRK****SGKYK****KVEIKELGELRKEPSL**



Nestrukturirana domena v citoplazmi verjetno **pridobi helično strukturo** ob kontaktu s tarčnim proteinom (aktinin, FHL-2 protein).

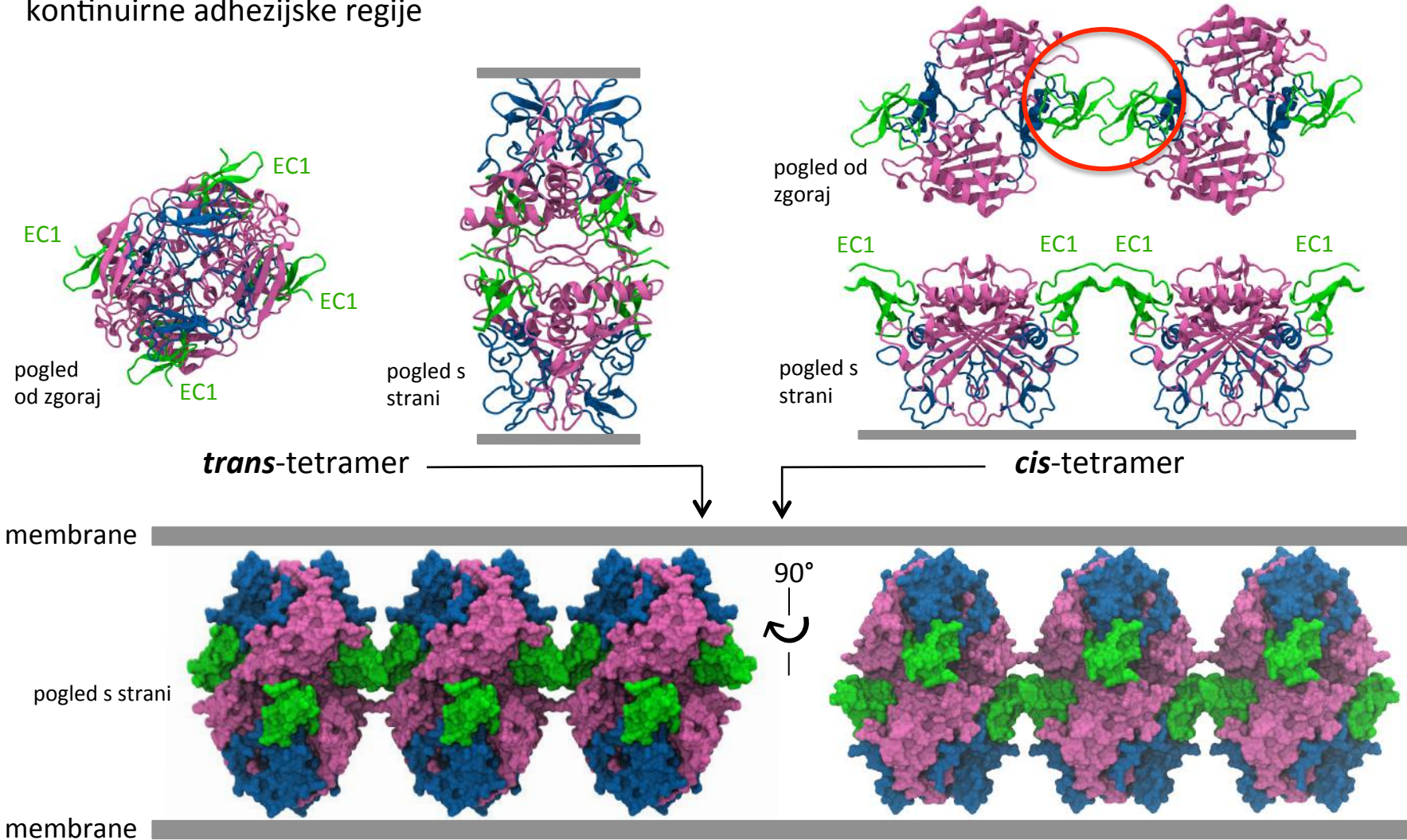
Model *trans*-tetramera

- adhezijska enota je tetramer
- EC1 domene niso v kontaktu
- razdalja med obema membranama ~10 nm

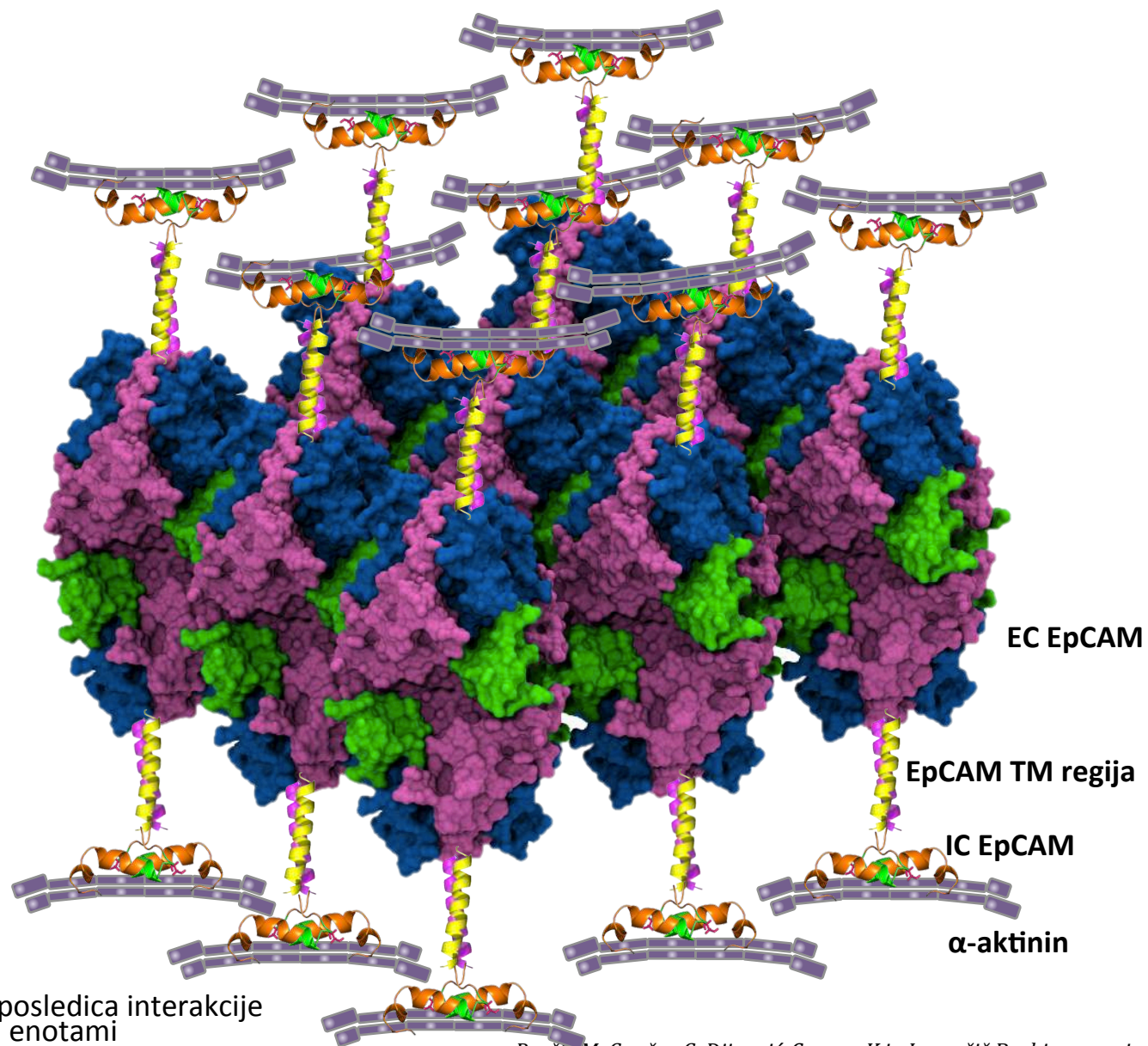


Model adhezijske mreže

- stabilni adhezijski kontakti in *cis*-oligomeri *via* EC1
- kontakti v kristalu & računalniško umeščanje: *cis*-interakcije dveh *cis*-dimerov *via* EC1
- kontinuirne adhezijske regije

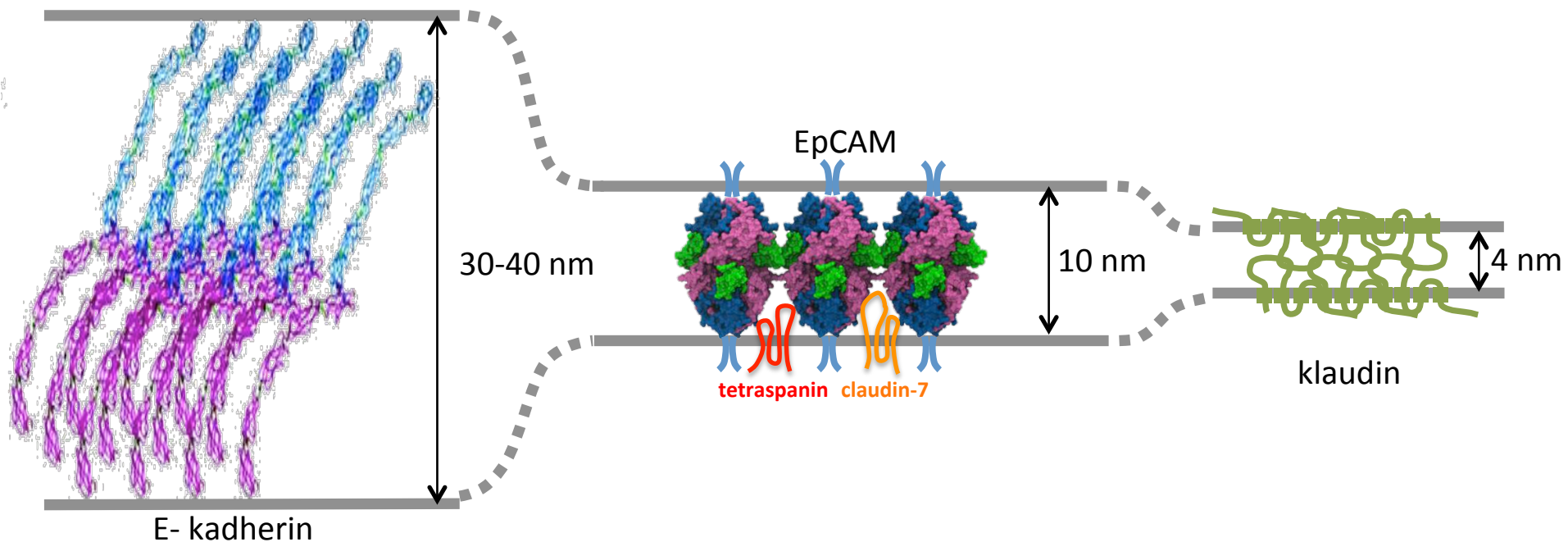


Model adhezijske mreže



Stabilni adhezijski kontakti kot posledica interakcije med tetramernimi adhezijskimi enotami

- EpCAM se strukturno razlikuje od klasičnih CAM (kadherini, integrini, selektini, Ig naddružina)

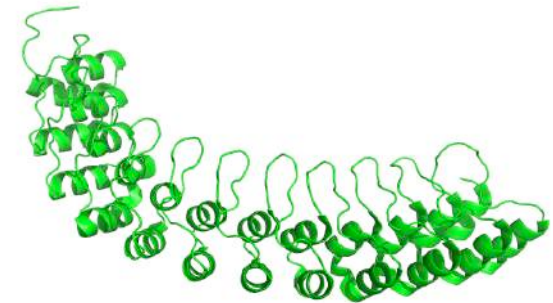
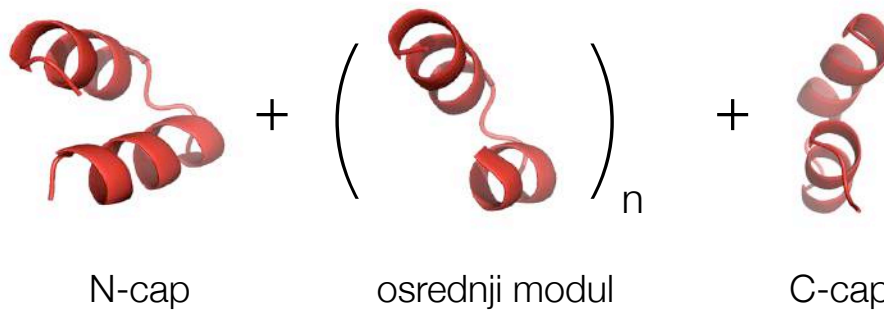


- Povečano izražanje EpCAM **poruši obstoječo celično povezavo** na osnovi kadherinov.
- Pri rakastih celicah tvori EpCAM **kompleks s kladinom-7 in tetraspaninom** (predstavljajo močan metastatski potencial).
- EpCAM je tarča **terapij na osnovi Ab** → strukturni podatki predstavljajo dobro osnovo za izboljšanje obstoječih terapij in razvoj novih.

Anti-EpCAM DARPi

DARPi - “Designed Ankyrin Repeat Proteins”

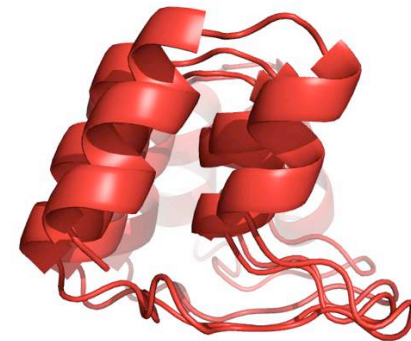
- majhni proteini (~14 kDa)
- ena domena: N-cap, eden ali več modulov, C-cap



N-končni del človeškega ankirina (12 ponovitev ANK); PDB ID 1N11 (Michaely in sod., 2002)

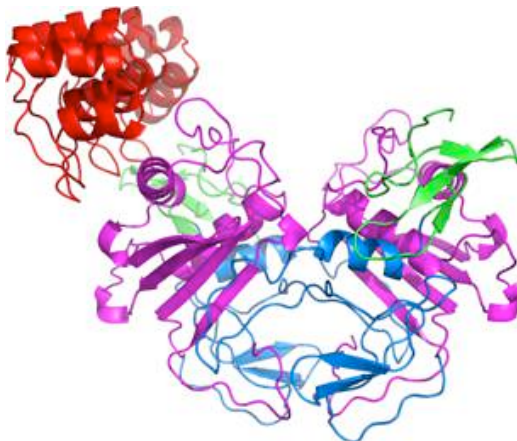


pogled z vrha

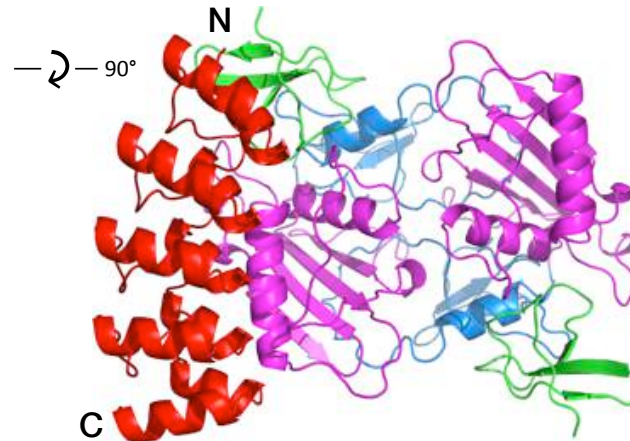


pogled s strani

Anti-EpCAM DARPiNi

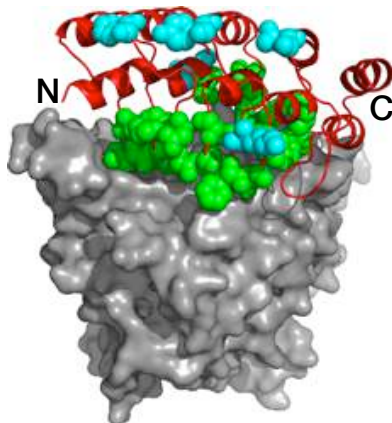


stranski pogled



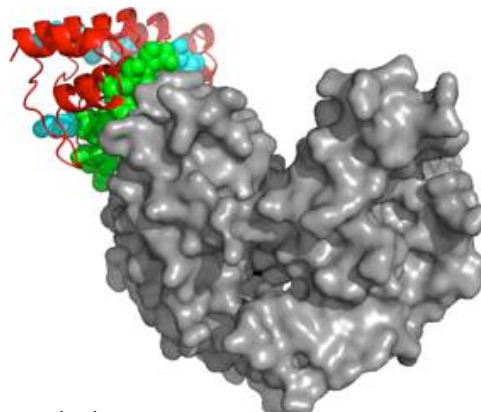
pogled z vrha

Randomizirani položaji (krogle) v kontaktu z EpEX

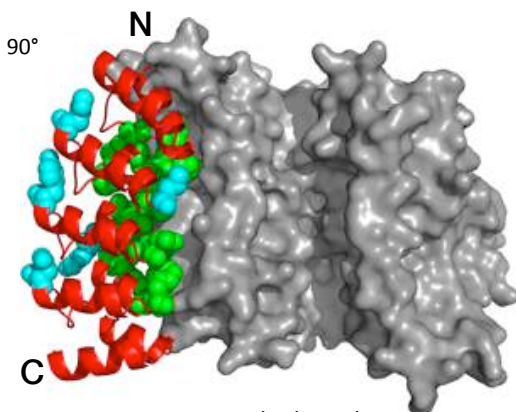


stranski pogled

90°
↻
|



↻ 90°



pogled z vrha

Premik miozina vzdolž aktinskega filamenta

- miozinska glava uporablja ATP za premik aktinskega filamenta.
- po vezavi ATP se mioz. glava sprostí iz filamenta
- hidrolize ATP in rotacija glave
- vezava na aktin
- sprostitvev P_i in sprostitvev energije za premik aktina
- sprostitvev ADP in nadomestitev s svežim ATP

