

I BUŇKY POTŘEBUJÍ kostru (na snímku myších astrocytů červeně svítí aktinová vlákna). Cytoskelet ale neslouží pouze jako mechanická podpora zajišťující buňce tvar a stabilitu. Podílí se i na buněčném dělení a pohybu, stejně jako na transportu látek a organel uvnitř buňky. Nejedná se o statické „lešení“, ale o překvapivě dynamický systém, který interaguje s dalšími částmi buňky a podle potřeby rychle mění své uspořádání.

Snímek Tania Lopez-Hernandez

Cytolinkery. Proteiny, které nás drží pohromadě

Cytoskelet není omezen na jednotlivé buňky, zajišťuje také integritu tkání

672

Entropické síly mohou pohánět buněčné dělení

Zaškrčení aktinového prstence se obejde bez molekulárního motoru

676

Tau, nenápadný strážce i zrádce mozku

Pochopení role proteinu tau může pomoci v léčbě neurodegenerativních onemocnění

679

Cytolinkery

PROTEINY, KTERÉ NÁS DRŽÍ POHROMADĚ

Již v roce 1903 formuloval ruský biolog Nikolaj Konstantinovič Kolcov (1872–1940) koncept cytoskeletu, „buněčné kostry“ sestávající z vláken či tubulů, která je odpovědná za buněčné tvary. Vlákna cytoskeletu badatelé postupně objevili ve všech buňkách všech známých organismů a došli k závěru, že jsou nezbytná i pro stavbu tkání. Teprve nyní ale vychází najevo, jak důležité jsou pro integritu tkání vazebné proteiny, tzv. cytolinkery.

text **MARTIN GREGOR, MAGDALENA PŘECHOVÁ,**
ilustrace **KATEŘINA KORELOVÁ**

V SOUČASNÉ DOBĚ VÍME, že základem cytoskeletu jsou tři typy proteinových vláken: mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediární (střední) filamenta, která společně zajišťují buňce tvar, mechanickou stabilitu i schopnost pohybu. Cytoskeletální vlákna jsou spojena s velkým množstvím dalších proteinů (např. tzv. proteinových motorů), které udržují architekturu cytoskeletu a pomáhají zabezpečit jeho základní funkce. Klíčovou roli v organizaci cytoskeletu však hrají také vazebné proteiny, tzv. cytolinkery. Jedná se o proteiny z rodiny plakinů, pro které je typický výskyt strukturálních motivů umožňujících vazbu různých typů cytoskeletálních vláken. Plakiny jsou tedy schopné fyzicky propojovat jednotlivé komponenty cytoskeletu. Vzniklou síť navíc ukotvují na další buněčné struktury, jako je jádro nebo buněčné spoje na buněčné membráně. Zejména díky plakinům tak cytoskelet vytváří dynamickou trojrozměrnou opěrnou síť, která vyplňuje celé buňky.

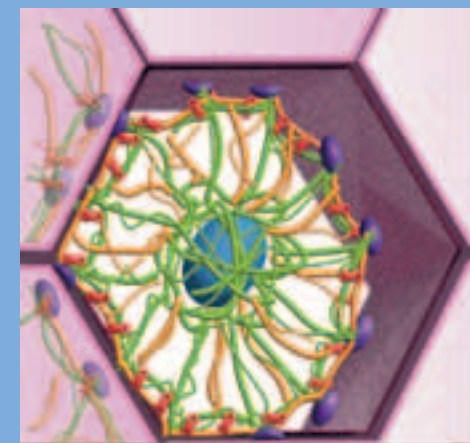
ZÁKLAD BIOMECHANIKY TKÁNÍ

Z materiálového hlediska můžeme cytoskelet považovat za polymerní kompozit, který obsahuje chemicky a fyzikálně odlišné

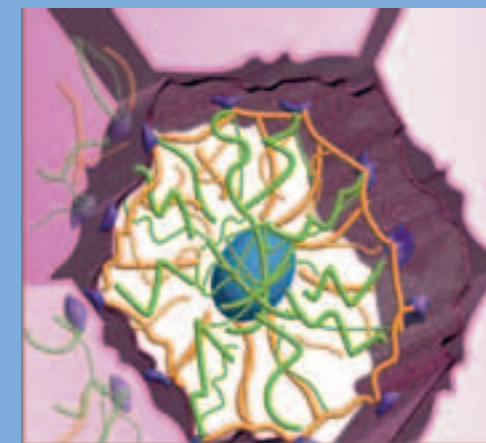
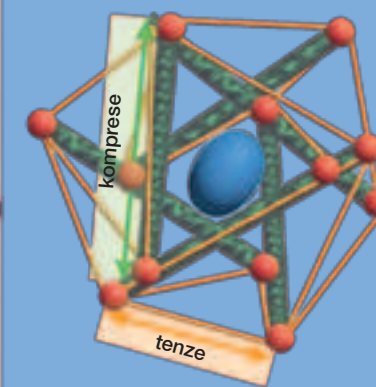
MARTIN GREGOR, Ph.D., (*1971) vystudoval biologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Postdoktorskou stáž absolvoval u prof. Gerharda Wicheho na Univerzitě ve Vídni. Od roku 2015 vede výzkumnou vědeckou skupinu integrativní biologie v Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Ve svém výzkumu se zabývá mechanobiologií epitelů.



MAGDALENA PŘECHOVÁ, Ph.D., (*1989) vystudovala biologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Doktorát z molekulární biologie získala na University College v Londýně pod vedením prof. Richarda Treismana. V současné době působí jako postdok ve výzkumné skupině integrativní biologie Martina Gregora, kde se zabývá úlohou cytoskeletálních sítí pro mechanické vlastnosti buněk.



keratin aktin plektin jádro desmozom



1. NA CYTOSKELET lze nahlížet jako na tenzegrtní strukturu, která v sobě spojuje kompresní a tažné síly a rovnováha napětí udržuje stabilitu celého buněčného systému. Díky vzájemnému propojení buněk se síly přenášejí v rámci celé tkáně.

Cytoskelet jako tenzegrtní struktura

USPOŘÁDÁNÍ cytoskeletu připomíná tzv. tenzegrtní struktury, které poprvé popsal v šedesátých letech 20. století americký architekt a teoretik Richard B. Fuller (1895–1983), zabývající se oblastí synergické geometrie. Tenzegrit (z anglických slov *tension* a *integrity*) byl definován jako strukturální vztah, ve kterém spolupůsobí pevná tělesa namáhaná tlakem a sítě přenášející tah. Vznikají tak statické soustavy, které si díky rovnováze napětí (*tension*) zachovávají svou celistvost (*integrity*). Podle amerického buněčného biologa Donalda E. Ingbera (1956) je tenzegrtní základní konstrukční princip, který řídí strukturu živých systémů od jednotlivých molekul a buněk až po celé tkáně, orgány a organismy [2] (viz také Vesmír 96, 726, 2017/12).

V epitelálních buňkách propojuje cytolinker plektin aktinová

mikrofilamenta s keratinovými intermediárními filamenti. Takto vzniklou síť napojuje plektin na hlavní epitelální mezibuněčné spoje – desmozomy. Aktin, společně s proteinovým motorem myosinem, je odpovědný za generování vnitřních sil a vznik cytoskeletálního napětí. Takto vzniklé síly jsou přenášeny mezibuněčnými (hlavně adhezními) spoji na sousední buňky, které se tímto dostávají do mechanické souvztažnosti [3]. Podobně fungují hemidesmozomy, plektinem spolutvořené spoje mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou označovanou u epitelů jako bazální membrána. Mezibuněčná hmota se skládá z více než tří set druhů strukturálních proteinů a vytváří mimobuněčný polymerní kompozit propojený s cytoskeletem. Biomechanické vlastnosti tkání jsou tak dány jak vlastnostmi buněk tkáně,

tak i vlastnostmi mezibuněčné hmoty a jejich vzájemným vztahem.

Buněčné spoje jsou hlavními strukturami buňky, které umožňují mechanotransdukcii – přeměnu mechanických stimulů na biochemické signály mechanosignalizačních drah. To umožňuje buňkám vnímat síly, které na ně působí, a reagovat na ně. Může se jednat o přízpůsobení mechanickému působení (například u epitelů) nebo reakci na tuhost mezibuněčné hmoty (například u migrující nádorové buňky). Studium mechanismů, jimiž fyzikální síly a změny mechanických vlastností buněk a tkání přispívají k chování živých systémů, se zabývá mechanobiologie, nově vznikající vědní obor na pomezí biologie, inženýrství, chemie a fyziky.

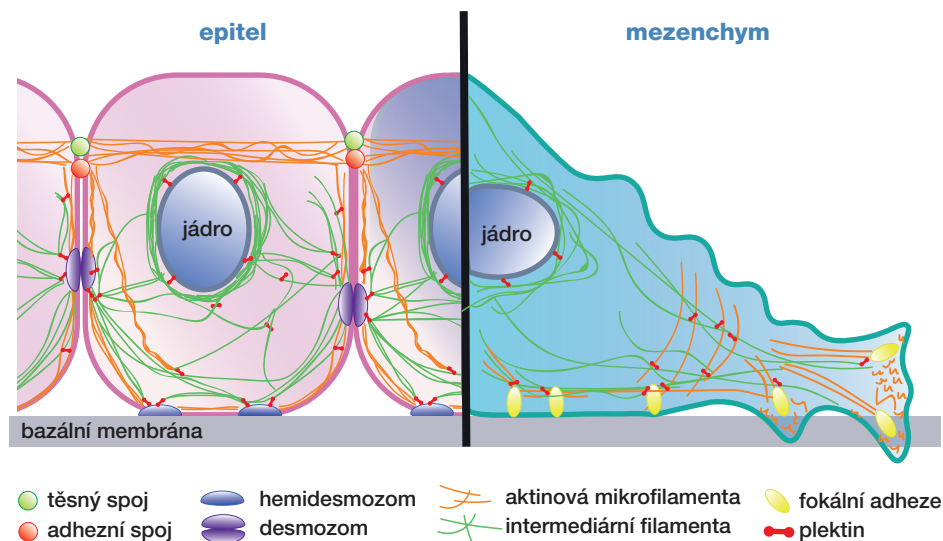
polymery ve formě vláken [1]. Tím připomíná některé moderní umělé vyrobené uhlíkové materiály. Je ale daleko sofistikovanější. Zatímco mikrotubuly se vyznačují nejvyšší tuhostí, intermediární filamenta mají ze všech tří typů cytoskeletálních vláken nejvyšší pružnost. Zajímavé je chování intermediárních vláken při mechanickém zatížení. Mnohem lépe totiž odolávají tahu než tlaku a historicky jsou považována za hlavní složku, která určuje tuhost cytoskeletu. Výsledné biofyzikální vlastnosti cytoskeletu jsou pak dány poměrným zastoupením jednotlivých vláken, mírou jejich propojení prostřednictvím cytolinkerů a architektonickým uspořádáním celé trojrozměrné sítě.

Zejména díky přítomnosti doprovodných proteinů a schopnosti jednotlivých vláken lokálně přirůstat (polymerovat) a rozpadat se (depolymerovat) je tato síť překvapivě dynamická. Působením vnějších sil může například docházet k rychlé přestavbě cytoskeletu tak, aby minimalizoval deformaci buňky. To má za cíl zabránit poškození jak celé buňky, tak jejich jednotlivých struktur, a především jádra obsahujícího genetickou informaci ve formě DNA.

Důležitou vlastností mikrotubulů a aktinových mikrofilamentů je schopnost orientovaně polymerizace. Společně s aktivitou s nimi spojených molekulárních motorů jsou tubulinové a aktinové polymerizace odpovědné za vytváření

vnitřních sil roznášených do cytoskeletální sítě. Klíčové je opět propojení cytolinkerů, které vytvářejí souvislou mechanickou vazbu umožňující distribuci vnitřních i vnějších sil v celé buňce. Výsledným rozložením těchto sil vzniká aktivní napětí cytoskeletu, jež stabilizuje jednotlivé buněčné struktury a udržuje buněčnou integritu. Cytoskelet lze proto považovat za tzv. tenzegrtní strukturu, ve které spolupůsobí struktury namáhané kompresními nebo tažnými silami (viz rámeček na této straně).

V tomto pojetí živých systémů představuje buněčný cytoskelet mechanickou jednotku, která není omezená jen na jednotlivé buňky, ale je fyzicky propojená se



2. CYTOSKELETÁRNÍ SÍŤ jednotlivých buněk jsou mezi sebou propojeny mezibuněčnými spoji a zároveň ukotveny k bazální membráně (extracelulární vrstvě mezi epitelem a pojivovou tkání) pomocí dalších adhezivních struktur.

epidermolýzy, a lékaři se proto zaměřují pouze na symptomatickou léčbu. Velké naděje se vkládají do genové terapie založené na „opravě“ mutovaných genů přímo v buňkách pacienta. Tento experimentální přístup lékaři úspěšně testovali v roce 2015 na univerzitě v italské Modeně. Tamní tým transplantoval tehdy sedmiletému syrskému chlapci kusy kůže vypěstované z buněk s opravenou genetickou informací a zachránil mu tím život. Tento případ můžeme považovat za první vlaštovku, nicméně k systematickému využití genové terapie vede ještě dlouhá cesta. Jisté je, že v současné časově náročné fázi preklinického výzkumu je velmi důležitá příprava dobře definovaných modelů lidských onemocnění.

MYŠÍ MODELY PLEKTINOPATII

Možnosti věrně modelovat plectinopatie u myši jsou omezené. Nelze totiž jednoduše znefunkčnit plectinový gen a dlouhodobě sledovat rozvoj onemocnění. Modelový organismus v takovém případě brzy hyne. Teprve dostupnost technologií pro místně a časově specifické inaktivace genu umožnila vznik modelů nesoucích mutace v jednotlivých typech tkání. V naší laboratoři se zaměřujeme zejména na modelování dopadů plectinových mutací v epitelech hlavních orgánů trávicí soustavy – střev a játrech.

Hlavní příčinou mechanické destabilizace tkání u plectinopatií je zhroutení architektury cytoskeletu. Bez „spojek“ tvořených molekulami plectinu se jednotlivá vlákna osamostatňují a celá soustava kolabuje. Zánik cytoskeletální tenzigrní struktury rovněž vede k změně cytoskeletálního napětí. To se ukazuje jako druhý významný mechanismus u plectinopatií.

Vnitřní síly buněk jsou totiž ve větší míře přenášeny na buněčné spoje, které se tak dostávají pod významné napětí. To od sebe odtahuje jednotlivé buňky, mezibuněčné prostory se rozšiřují a zvyšuje se propustnost epitelů. Náš výzkum ukázal, že plectin organizuje aktinová a keratinová filamenta podél mezibuněčných spojů do husté sítě, která je schopna zpevnit mezibuněčné spojení v odpovědi na mechanické zatížení [3]. Další zatížení v důsledku vnějšího mechanického stresu namáhá již tak destabilizované mezibuněčné spoje, které se mu nedokážou přizpůsobit. Výsledkem jsou mechanická poškození epitelů, defekty v architektuře mutovaných tkání a vznik poranění, jejichž dopady lze studovat v jednotlivých myších modelech.

Myší model s plectinovou mutací omezenou na jaterní buňky například umožnil podrobně popsat, jak se játra vyrovnávají s hromaděním toxické žluči za cholestatických podmínek, kdy je omezen její odtok prostřednictvím žlučových duktů do střeva. Tento stav postihuje zhruba 1 % těhotných žen, u kterých na konci těhotenství ohrožuje vývoj plodu. U mutovaných myši nedocházelo k přestavbě žlučových a zadržovaná žluč působila významné poškození celého orgánu [4]. Další naše studie ukázala, že vlivem opakovaného mechanického působení střevního obsahu vzniká poranění, pokud je plectinový gen v buňkách střevní sliznice inaktivován. Ta umožňují různým patogenům (např. bakteriím) proniknout do tkáně a vyvolat rozsáhlý zánět připomínající lidskou ulcerózní kolitidu [5].

MECHANOBIOLOGIE V TERAPII?

V posledních letech přibývá důkazů, že mechanika tkání hraje klíčovou roli při

svým okolím prostřednictvím buněčných spojů – adhezivních struktur na buněčné membráně. Buněčné spoje umožňují přenos sil mezi jednotlivými cytoskeletálními jednotkami a propojují epiteliální buňky s mezibuněčnou hmotou do strukturního a funkčního celku [3–5]. Jednotlivé buňky epitelů (pokožky, výstelky trávicí trubice ap.) jsou navzájem provázány třemi hlavními typy mezibuněčných spojů, na které se napojují jednotlivá vlákna cytoskeletu. Zatímco těsné a adhezivní spoje kotví aktinová mikrofilamenta, keratinová intermediární vlákna jsou napojena na desmozomy. Takto vzniklá souvislá vrstva epiteliálních buněk nasedá na hustou síť mezibuněčné hmoty zvanou bazální membrána. Ani tato interakce se však neobejde bez příslušných buněčných spojů a cytoskeletálních propojení. Zprostředkovává je čtvrtý typ buněčných spojů – hemidesmozomy, do kterých jsou pomocí plectinu ukotvena keratinová vlákna (obr. 2).

NEJEN NEMOC MOTÝLÍCH KŘÍDEL

S ohledem na význam cytolinkerů pro biomechaniku tkání není překvapivé, že mutace v genech kódujících tyto proteiny mohou vést k rozvoji onemocnění asociovaných s křehkostí tkání. Nejznámější je patrně nemoc motýlích křídel (bulózní epidermolýza), která se projevuje tvorbou puchýřů po celém povrchu těla. Motýlí děti, jak bývají pacienti kvůli křehkosti své kůže nazýváni, trpí velmi bolestivými příznaky a těžká forma choroby vede k úmrtí v časném věku. Příčinou různých forem nemoci souhrnně označovaných jako plectinopatie jsou mutace v plectinovém genu a dalších dvaadvaceti různých genech kontrolujících architekturu cytoskeletu či mechanickou odolnost kůže a sliznic. S rozvojem technologií umožňujících detailní analýzu lidského genomu jich jen v plectinovém genu různí badatelé objevili již přes čtyřicet.

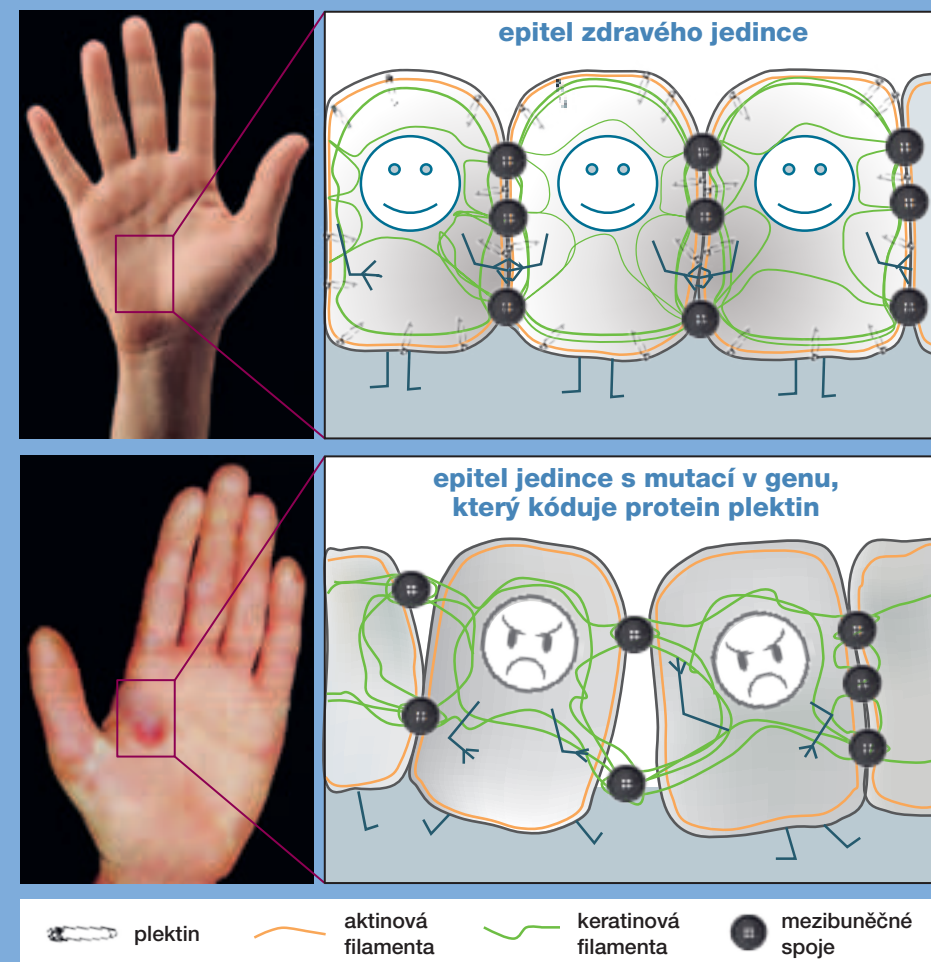
Mutacemi v cytolinkerech není ohrožena jen kůže a ostatní epitely, ale obecně všechny tkáně, které jsou vystaveny různým formám mechanické zátěže. Typickým příkladem jsou svaly, u kterých tyto mutace vedou k vzniku svalových dystrofií. Dystrofie způsobují oslabení svalů a ztrátu aktivní svalové hmoty, což může pacienta postupem času upoutat na invalidní vozík. Nedávno bylo například zjištěno, že mutace hlavní varianty svalového plectinu je příčinou pletencové svalové dystrofie, která postihuje především svalstvo v oblasti boků, pánve a ramen.

V současné době je léčba onemocnění spojených s poškozením cytolinkerů mimořádně obtížná. Kupříkladu neexistuje žádný účinný způsob léčby bulózní

Když každý dotek bolí

NEMOC motýlích křídel (bulózní epidermolýza) postihuje přibližně 1 z 50 000 narozených dětí. Dědičné onemocnění se projevuje tvorbou puchýřů po celém povrchu těla, postihuje ale také sliznice, trávicí, dýchací a vylučovací ústrojí. Lidské tělo je v průběhu života vystaveno značné mechanické zátěži. Pacienti trpící nemocí motýlích křídel mají výjimečně citlivou pokožku a sliznice. Dokonce i mírný tlak či tření vede k jejich poškození, při kterém vznikají puchýře a špatně se hojící rány. Někteří nemocní proto nemohou dokonce ani přijímat pevnou stravu. O podporu lidí s tímto onemocněním se v České republice stará pacientské sdružení DEBRA ČR (<https://debra-cz.org>).

V současné době neexistuje žádný účinný způsob léčby bulózní epidermolýzy. Lékaři se zaměřují pouze na symptomatickou léčbu příznaků tohoto onemocnění. Prakticky jedinou nadějí pro pacienty je genová terapie založená na „opravě“ mutovaných genů přímo v buňkách lidí trpících onemocněním. V současné době jsou klinicky testovány nové postupy genové terapie od šesti farmaceutických společností.



3. ORGANIZACE cytoskeletální sítě a mezibuněčných spojů v epiteliálních buňkách zdravého jedince, kde protein plectin propojuje aktinová a keratinová vlákna (nahore), a jedince trpícího bulózní epidermolýzou s mutací v genu, který protein plectin kóduje (dole).

Ilustrace M. Přečková

vzniku dalšího vážného zdravotního stavu – fibrózy. Jedná se o nadměrné ukládání mezibuněčné hmoty v důsledku hojivého procesu při chronickém poranění. Patologická mezibuněčná hmota s velkým množstvím kolagenových vláken a vysokou mírou jejich vzájemného zesíťování vytváří jizvy a je odpovědná za postupné tuhnutí tkáně. Typickými příklady jsou játra nebo plíce, u plíc může být příčinou mimo jiné covid-19.

Související mezibuněčnou hmotu produkuje skupina buněk známých jako fibroblasty. Fibroblasty jsou s ní také spojeny prostřednictvím dalšího typu buněčných spojů – fokálních adhezí. Ty umožňují buňkám „cítil“ tuhost prostředí. Se zvyšováním tuhosti se aktivuje mechanosignální dráha a zvyšuje se činnost fibroblastů. Přenos sil přes spoje tak slouží jako kanál obousměrné komunikace mezi polymerním kompozitem mezibuněčné hmoty a cytoskeletálním napětím

generovaným buňkou. Ze zdravotního hlediska je nejrizikovější, že mezi oběma aktéry vzniká těžko přerušitelná smyčka pozitivní zpětné vazby. Změna biomechanických vlastností tkáně vede k progresivnímu tuhnutí, jehož důsledkem může být orgánové selhání. Analogicky je zvyšující se tuhost tkáně hnací silou nádorové invaze a zhoubnosti. Stejný faktor dokonce negativně koreluje s vyhlídkami na přežití u pacientů s nádory.

Vzhledem k tomu, že biomechanické změny fibrotických tkání stále více badatelů chápe spíše jako příčinu než jako důsledek postupu onemocnění, zaměřuje se současný výzkum na možnosti jejich cílené manipulace. Pro tyto účely představují plectin a jemu podobné cytolinkery atraktivní nástroje, kterými lze ovlivnit jak biomechanické vlastnosti tkáně, tak i schopnost buněk na tyto vlastnosti reagovat. K cíli ve formě prakticky použitelné terapie ještě vede dlouhá cesta. Právě takovým výzvám se

ale plánujeme v naší laboratoři do budoucna intenzivně věnovat. ●

K dalšímu čtení...

[1] Fletcher D. A., Mullins R. D.: Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature 463, 485–492, 2010, DOI: 10.1038/nature08908.
 [2] Ingber D. E.: Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. Journal of Cell Science 116, 1157–1173, 2003, DOI: 10.1242/jcs.00359.
 [3] Přečková M. et al.: Plectin-mediated cytoskeletal crossstalk controls cell tension and cohesion in epithelial sheets. Journal of Cell Biology 221(3):e202105146, 2022, DOI: 10.1083/jcb.202105146.
 [4] Jiroušková M. et al.: Plectin controls biliary tree architecture and stability in cholestasis. Journal of Hepatology 68, 1006–1017, 2018, DOI: 10.1016/j.jhep.2017.12.011.
 [5] Krausová A. et al.: Plectin ensures intestinal epithelial integrity and protects colon against colitis. Mucosal Immunology 14, 691–702, 2021, DOI: 10.1038/s41385-021-00380-z.