

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Marie Hejnarová

Mechanosignalizace a mechanosenzorické proteiny v adhezivních spojích
Mechanosignaling and mechanosensory proteins in adherens junctions

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli, panu docentu RNDr. Danielu Röselovi, PhD. za jeho cenné připomínky a také za čas, který mi při psaní této práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala všem členům Laboratoře mechanismů invazivity nádorových buněk za vřelé přijetí do velice přátelského kolektivu a zavedení do laboratorní praxe. Poděkovat bych chtěla také svým rodičům Jaroslavě a Jiřímu Hejnarovým za nepřetržitou podporu ve studiu i životě, ale také své sestře Václavě Hejnarové, která pro mě vždy byla velkou inspirací. V neposlední řadě můj dík patří mému partnerovi Martinu Řandovi za jeho trpělivost a užitečné rady ohledně psaní této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 6. 5. 2021

.....
Marie Hejnarová

Abstrakt

Adhezivní spoje jsou součástí mezibuněčných kontaktů, kde napomáhají propojení aktinového cytoskeletu dvou a více sousedních buněk. V rámci tkáně zajišťují vnímání mechanických sil působících na buňky a následně vyvíjí adekvátní odpověď. Tyto procesy společně zajišťují proteiny, které sestavují mechanosenzitivní komplexy adhezivních spojů. V základním stavu v iniciačních mezibuněčných kontaktech je komplex tvořen kadheriny, β -kateniny a α -kateniny. Vnější síly působící na adhezivní spoje podporují konformační změny těchto proteinů, převážně pak α -kateninu a tím je umožněno vytvoření nových interakcí s dalšími vazebnými partnery. Mezi takové interaktory patří například EPLIN, vinkulin, nebo α -aktinin. Ti umožňují provázání kadherin-kateninového komplexu s aktinovými filamenti, pomocí kterých je umožněna na tenzi závislá změna morfologie buněk. Dále mohou tyto proteiny mechanickou sílu transformovat na regulační signál, který ovlivňuje aktivitu důležitých drah, jako je buněčná proliferace, diferenciace, nebo migrace. Tato mechanosenzitivní aktivita adhezivních spojů hraje důležitou roli v procesech udržujících integritu tkání. Znalosti ohledně vlivu mechanosenzingu adhezivních spojů na fyziologii tkání mohou přispět k porozumění vzniku patologií během embryogeneze, regenerace, nebo při neoplastickém vývoji.

Klíčová slova: mechanosenzor, mechanosenzing, adhezivní spoje, kadherin-kateninový komplex, integrita tkání

Abstract

Adherens junctions are part of intercellular contacts, where they help to connect actin cytoskeleton of two or more neighboring cells. Within the tissue, they enable the sensing of mechanical forces acting on cells and subsequently develop adequate response. These functions are provided by proteins, assembled into the mechanosensitive complexes of adherens junctions. In their base form—in the initial intercellular contacts, they are composed of cadherins, β -catenins, and α -catenins. Extrinsic forces acting on adherens junctions, propagate to the conformational changes of these proteins, mostly in α -catenin, allowing the creation of new interactions with additional binding partners. Such interactors include -for example- EPLIN, vinculin, or α -actinin. They allow the interconnection of the cadherin-catenin complex with actin filaments, which mediates the tension-dependent change of cell morphology. Furthermore, these proteins can transform the mechanical force to a regulatory signal, which activates important pathways, such as cell proliferation, differentiation, or migration. Thus mechanosensitive activity of adherens junctions plays an important role in the processes that maintain tissue integrity. Any knowledge how the mechanosensing in adherens junctions affects tissue physiology contributes to our understanding the emergence of pathologies during embryogenesis, regeneration or neoplastic development.

Key words: mechanosensor, mechanosignaling, adherens junctions, cadherin-catenin complex, tissue integrity

Seznam zkratek

ABD	A ctin b inding d omain	Aktin vazebná doména
AJ	A dherens j unctions	Adhezivní spoje
ARP-2/3	A ctin r elated p rotein 2/3	Protein související s aktinem 2/3
BCL 9-2	B -cell lymphoma 9-2	Protein buněčného lymfomu 9-2
CAM	C ell a dhesion m olecules	Buněčné adhezivní molekuly
CBD	C atenin- b inding d omain	Katenin vazebná doména
CKII	C asein k inase II	Kasein kináza II
E-kadherin	E pithelial- c adherin	Epiteliální kadherin
ECM	E xtracellular m atrix	Extracelulární matrix
EPLIN	E pithelial p rotein l ost i n n eo- plasm	Epiteliální protein ztracen v neo- plazmě
GSK-3β	G lycogen synthase k inase-3 β	Kináza glykogen syntázy 3 β
JMD	J uxtamembrane d omain	Juxtamembránová doména
N-kadherin	N euronal- c adherin	Neuronální kadherin
Tcf	T ranscription f actors	Transkripční faktory
VBS	V inculin- b inding s ite	Vinkulin vazebné místo
VE-kadherin	V ascular e ndothelial- c adherin	Vaskulární endoteliální kadherin
Wnt	W ingless Int1	"Wingless/Int1"

Obsah

1 Úvod	1
2 Adhezivní spoje	2
2.1 Základní mechanosenzorický komplex	4
2.1.1 Klasické kadheriny	5
2.1.2 β -katenin	9
2.1.3 α -katenin	13
2.2 Další vazební partneři mechanosenzorického komplexu	18
2.2.1 Protein p120	19
2.2.2 Vinkulin	20
2.2.3 α -aktinin	23
2.2.4 EPLIN	24
2.2.5 Afadin	26
3 Vliv mechanosenzorického komplexu na integritu tkání	28
3.1 Embryogeneze	28
3.2 Regenerace tkání	29
3.3 Nádorová transformace a invazivita nádorových buněk	30
4 Závěr	32
Seznam použité literatury	33

1 Úvod

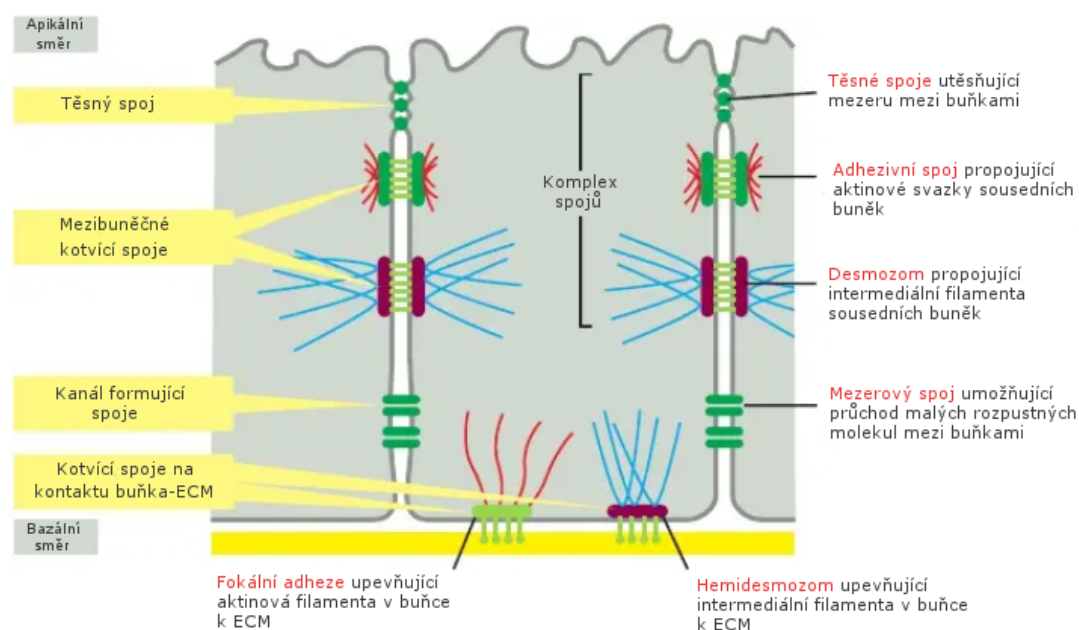
Každá tkáň v mnohobuněčném organismu má svoji specifickou úlohu. Podle toho jsou lokalizovány na patřičných místech těla, kde plní odlišné funkce. Na základě jejich distribuce je však každá tkáň vystavena různým podmínkám, na které je potřeba správně reagovat. Vysoce namáhaná svalová tkáň musí na působení sil odpovídat aktivněji, na rozdíl od tkání tvořící centrální nervovou soustavu. Všechny tkáně mají proto vyvinuty specifické odpovědi, umožňující adekvátně reagovat na individuální podněty, kterým jsou v danou chvíli vystaveny. Tyto odpovědi jsou realizovány jednotlivými buňkami, které vykonávají určitý buněčný program. Každá taková buňka musí přesně vědět, které tkáni náleží a podle toho uzpůsobí svou aktivitu. Tato vymezení určuje tkáňová integrita.

Při mechanickém poranění, nebo vlivem působení patogenů může dojít k narušení tkáňové integrity. Aby byla tkáň nadále schopna patřičně reagovat na všechny podněty, musí být integrita opět obnovena. V takovém případě je nutné opravit rozrušené mezibuněčné kontakty, aby se všechny buňky dostaly zpět do správného funkčního kontextu a mohly tak spolupracovat na formování tkáňově specifických odpovědí. Pokud buňka z nějakého důvodu nedokáže rozpoznat, které tkáni náleží, není pak schopna přizpůsobit svou aktivitu. Takové buňky mohou mít narušenou regulaci buněčného dělení, diferenciaci a velmi často ztrácí adhezivní vlastnosti. Disbalance v těchto procesech může vést k nádorovým onemocněním a dalším patologiím tkání. Pro odhalení procesů, které stojí za nádorovou transformací je proto důležité pochopit, jak mohou mezibuněčné spoje ovlivnit buněčnou aktivitu a tím napomáhat při udržování tkáňové integrity.

Cílem této práce je shrnout současné poznatky o adhezivních spojích. Především pak bude kladen důraz na jednotlivé komponenty adhezivních spojů a uplatnění jejich mechanosenzorických vlastností při udržování integrity tkání.

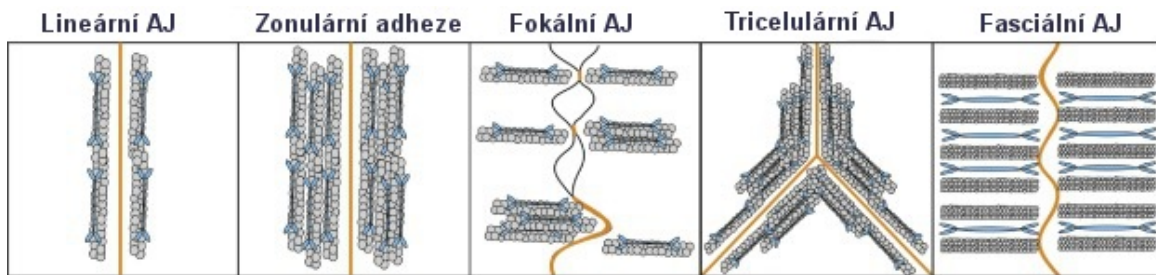
2 Adhezivní spoje

Mnohobuněčné organizmy jsou tvořeny různorodými tkáněmi s odlišným původem, strukturou, lokalizací i funkcí. Soubory buněk, které společně formují funkční jednotku, moduluji své vlastnosti tak, aby zajišťovaly procesy specifické pro každý typ tkáně. Samotné buňky musí zároveň čelit různým jevům, které mohou narušit integritu dané tkáně a tím i její správné fungování. Aby byla tato integrita udržena, je potřeba provázat jednotlivé buňky mezi sebou, umožnit jejich vzájemnou komunikaci a ukotvit vzniklý soubor buněk k pevnému podkladu. K tomuto účelu jsou buňkami vytvářeny různé typy spojů (viz. Obrázek 1). Jsou rozlišovány mezibuněčné spoje, které zprostředkovávají kontakt buňka-buňka, nebo spoje zajišťující adheze buněk k extracelulární matrix (ECM). Dále je možné spoje rozdělit podle jejich hlavní funkce na uzavírající, kotvící a komunikační. Mezi uzavírající spoje patří například těsné spoje, jejichž účelem je semknout buňky tak, aby vytvořily nepropustnou vrstvu a tím oddělily vnitřní a vnější prostředí. Kotvící spoje zajišťují propojení cytoskeletu dvou sousedních buněk, nebo nepřímý kontakt cytoskeletu buňky s ECM. Díky tomuto propojení jsou buňky schopné účelně regulovat přestavby cytoskeletu a tím měnit svůj tvar, nebo stabilizovat mezibuněčné spoje, což vede k vyšší odolnosti vůči působícím mechanickým silám. Adhezivní spoje a fokální adheze jsou kotveny k aktinovému cytoskeletu, naopak desmozomy a hemidesmozomy se napojují na intermediální filamenta. Komunikační spoje, jako jsou například mezerové spoje, nebo plazmodezmata u rostlin slouží k předávání signalizačních molekul mezi takto propojenými buňkami. Všechny typy spojů mají tedy své specifické vlastnosti a buňky je vytváří za určitým účelem, který je v souladu s momentálními potřebami tkáně. Tato práce se dále detailněji zabývá pouze adhezivními spoji, jejich mechanosenzorickými vlastnostmi a významem v udržení integrity tkání.



Obrázek 1: Typy buněčných spojů v epiteliálních tkáních tenkého střeva – zelené struktury -buněčné adhezivní molekuly zajišťující kontakt buňka-buňka, nebo buňka-ECM; **žlutá tlustá linka** -bazální lamina; **červené křivky** -aktinové svazky; **modré křivky** -intermediální filamenta; **fialové struktury** -disk upevňující intermediální filamenta (převzato a upraveno Alberts *et al.* (2014)).

Adhezivní spoje (AJ) propojují buňky v epiteliálních, endoteliálních a mezenchymálních tkáních. Tato mezibuněčná spojení jsou buňkami vytvářena jako jedna z prvních stabilních kontaktů a mohou se dále podílet na iniciaci vzniku těsných spojů a desmozomů. Nachází se na laterální membráně polarizovaných buněk (bazálněji, než jsou lokalizovány těsné spoje). Jedno propojení dvou buněk není samo o sobě dostatečně pevné, aby dokázalo odolávat mechanickým silám běžně působícím v tkáních, proto je potřeba tyto síly rozložit mezi více AJ. Ty jsou rozmístěny po celém kontaktu obou buněk, nebo se nahromadí do shluků, kde tvoří pevnou a odolnou vazbu. Stejně jako ostatní mezibuněčné spoje, AJ jsou utvářeny multiproteinovým komplexem, který lze rozdělit na transmembránovou a intercelulární část. Transmembránová část zajišťuje specifický kontakt mezi buňkami a intercelulární část slouží k propojení komplexu s cytoskeletem a dalšími vazebnými partnery. Tkáně, jako je například střevní epitel, se neustále přestavují a obnovují, což koreluje i s remodelací mezibuněčných spojů, převážně pak AJ, které opakovaně vznikají, maturují a zanikají. Buňky mohou vytvářet různé morfologické formy AJ podle fáze vývoje a působících sil. Lineární, zonulární, fokální, tricelulární i fasciální mezibuněčné spoje mají různou strukturu, hlavně v rámci orientace aktomyosinových vláken na kontaktu buněk (viz. Obrázek 2), ale pro všechny je společný základní mechanosenzorický komplex (Taguchi *et al.*, 2011). Právě mechanosenzorické vlastnosti tohoto komplexu řídí přestavby AJ a tím i remodelaci tkání, pro které jsou působící síly vstupním informačním signálem.



Obrázek 2: Morfologické formy adhezivních spojů – **Lineární AJ** -obvodové svazky aktomyosinu jsou orientovány rovnoběžně s mezibuněčným spojem kvůli rozmístění mechanosenzorických komplexů po celé délce kontaktu buněk; **Zonulární adheze** -plně maturované AJ po celé délce kontaktu dvou buněk, spoj je silnější a odolnější díky nahromadění obvodových aktomyosinových vláken podél spoje; **Fokální AJ** -lokální kontakty dvou buněk, ke kterým kolmo směřují aktomyosinová vlákna odbočující z obvodových svazků; **Tricelulární AJ** -interakce tří buněk u kterých se po celé délce kontaktů podélně hromadí obvodové aktomyosinové svazky; **Fasciální AJ** -odbočující vlákna aktomyosinu směřující kolmo ke kontaktu dvou buněk vytváří aktinový disk; **šedé struktury**-aktomyosinová vlákna; **černé křivky** -cytoplazmatická membrána buněk; **žluté křivky** -části cytoplazmatických membrán buněk, kde dochází ke kontaktu; mechanosenzorické komplexy zde nejsou zobrazeny (převzato a upraveno Angulo-Urarte *et al.* (2020)).

2.1 Základní mechanosenzorický komplex

Na buňky v tkáních působí různé síly, které mohou pocházet z extracelulárního prostoru, nebo jsou generovány přímo samotnou buňkou. Tyto mechanické síly jsou v epiteliálních a endoteliálních tkáních detekovány právě přes mezibuněčné spoje, obsahující transmembránové a intracelulární mechanosenzorické proteiny a další přidružené molekuly, které se následně podílí na mechanotransdukcí. Prvním krokem mechanotransdukční dráhy je detekce působících sil mechanosenzorickými proteiny, což je doprovázeno změnami jejich konformace. Každý protein je schopen chovat se dynamicky během mechanického napětí, ale jen mechanosenzorické proteiny dokáží mechanickou změnu ve své struktuře převést na signální odpověď danou například indukovanou schopností interagovat s mechanotransdukčními vazebnými partnery (Banes *et al.*, 1995). Ti zprostředkují transformaci síly na signál, který vyvolává patřičnou odpověď. Buňky tak mohou například aktivně měnit svůj tvar (Effler *et al.*, 2006), zpevňovat mezibuněčná propojení, regulovat buněčné dělení, migraci (Hermiston *et al.*, 1996) a mnoho dalších procesů.

Nejlépe prozkoumanými mechanosenzitivními mezibuněčnými spoji jsou právě AJ. Odpovídají převážně na tažné síly, které jsou detekovány kadherin-kateninovým komplexem. Tento komplex se v minimálním stavu skládá z kadherinu, α -kateninu a β -kateninu (Buckley *et al.*, 2014). Všechny tyto proteiny mají mechanosenzorické vlastnosti popsané výše. S tímto komplexem mohou být asociovány další intracelulární proteiny, jako je vinkulin (le Duc *et al.*, 2010),

epiteliální protein ztracený v neoplazmě (EPLIN) (Taguchi *et al.*, 2011), nebo i jiné molekuly, které rovněž plní důležitou roli v mechanosenzingu. Jak již bylo zmíněno, AJ patří mezi kotvící spoje, tudíž jsou napojeny na buněčný cytoskelet, konkrétně na aktomyosinová vlákna. Je ale potřeba dodat, že kadherin-kateninový komplex může být asociován také s mikrotubuly (Ligon *et al.*, 2001).

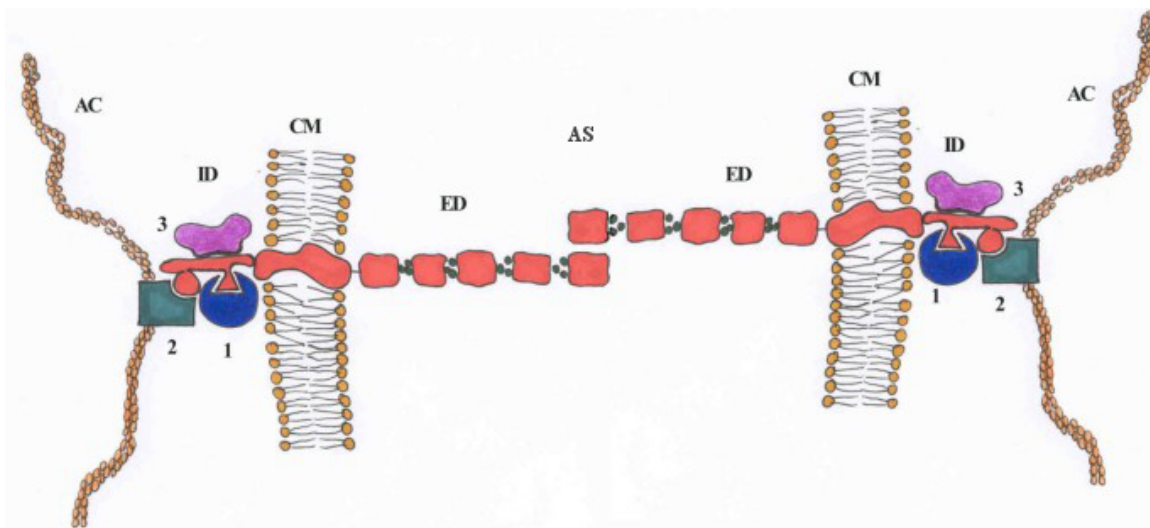
Podle současných poznatků se usuzuje, že AJ založené na kadherin-kateninovém komplexu nevznikají primárně. První mezibuněčný kontakt je tvořen nektin-afadinovým komplexem, jehož vlastnosti se zdají být klíčové pro navedení kadherinů, α -kateninů a β -kateninů do iniciačních buněčných spojů. Tento mechanismus nahrazení nektin-afadinového komplexu za kadherin-kateninový komplex vede ke stabilizaci AJ (Honda *et al.*, 2003).

2.1.1 Klasické kadheriny

Kadheriny jsou hojně rozšířené glykoproteiny na povrchu všech buněčných typů v mnohobuněčných organizmech. Existuje celá řada typů a subtypů těchto transmembránových proteinů, které dohromady tvoří početnou kadherinovou rodinu. Ta se dá rozdělit na dvě skupiny - klasické a neklasické kadheriny. Mezi neklasické kadheriny patří například desmocolin a desmoglein, které mají adhezivní funkci a jsou součástí struktury desmozomů (Chitaeu a Troyanovsky, 1997). V této skupině ale nalezneme také kadheriny s omezenou adhezivní vlastností, jako je T-kadherin (Ranscht a Dours-Zimmermann, 1991), který se nepodílí na formování spojů. Tato kapitola se věnuje skupině klasických kadherinů, které se přímo účastní stavby AJ.

Klasické kadheriny patří stejně jako například integriny, nebo selektiny do skupiny buněčných adhezivních molekul (CAM), což znamená, že buňkám umožňují přilnout k povrchu jiné buňky, nebo k ECM. Jsou ukotveny jednou transmembránovou doménou v plazmatické membráně, svým N-koncem směřují extracelulárně, zatímco jejich C-konec je lokalizován v cytoplazmě.

Extracelulární část je tvořena nejčastěji pěti repetitivními doménami, které jsou pro kadheriny sekvenčně specifické a zaujímají strukturu připomínající imunoglobuliny (Boggon *et al.*, 2002). Mezi těmito repeticemi se nachází vazebná místa pro vápenaté ionty (viz. Obrázek 3), jejichž koncentrace je klíčová pro zprostředkování kontaktu buňka-buňka. Bez navázaného Ca^{2+} jsou domény vůči sobě uspořádány do kompaktní struktury, ve které nemohou vytvářet kontakt s dalším kadherinem na sousední buňce. Po navázání dostatečného množství Ca^{2+} se tyto domény rigidizují a organizují se do napřímené pozice. Tato konformace extracelulárního N-konce již umožňuje vytvářet *trans* vazbu mezi kadheriny dvou sousedních buněk (Pokutta *et al.*, 1994).



Obrázek 3: Schéma struktury E-kadherinu podílejícího se na kontaktu buněk v adhezivních spojkách – E-kadherin označen červeně; **AS** -adhezivní spoj; **ED** -extracelulární domény s modře vyznačenými místy vazby Ca^{2+} iontů; **ID** - intracelulární doména; **CM** - cytoplazmatická membrána; **AC** -aktinový cytoskelet; **1** - β -katenin; **2** - α -katenin; **3** -protein p120 (převzato a upraveno Pečina-Šlaus (2003)).

Dalším důležitým aspektem této interakce je její preferenčně homotypický charakter. Expresí rozdílných kadherinů a jejich vystavení na plazmatické membráně omezuje kontakt odlišných buněčných typů. Převážně ty buňky, které mají na svém povrchu stejný subtyp kadherinu spolu mohou interagovat a vytvářet tak jednotlivé tkáně. Je tedy zřejmé, že subtypy kadherinů tvořící AJ budou do jisté míry tkáňově specifické. Díky této vlastnosti je možné pouhou změnou exprese kadherinu během morfogenetických procesů odlišit buňky tak, aby mohly opustit původní soubor, zakládat nové tkáně a formovat jednotlivé orgány (Nose *et al.*, 1988). Epiteliální kadherin (E-kadherin), dříve nazývaný uvomorulin je nejčastějším subtypem, který tvoří mechanosenzorický komplex v AJ (Gumbiner *et al.*, 1988). Vyskytuje se ve všech epiteliálních tkáních a v embryogenezi vzniká jako jeden z prvních subtypů klasických kadherinů. Teprve poté buňky začínají exprimovat i neurální kadherin (N-kadherin), napomáhající utvářet neurální tkáň a hladké vaskulární svalstvo (Puranam *et al.*, 2019). Dále pak vaskulární endoteliální kadherin (VE-kadherin), který je součástí spojů v endotelu krevních cév a pouze zde má mechanosenzorické vlastnosti (Conway *et al.*, 2013). V neposlední řadě je exprimován také placentální kadherin, jehož lokalizace není striktně vázána pouze na placentu, ale částečně se nachází také v epitelu, endotelu a ektodermu (Nose a Takeichi, 1986).

Distribucí v různých tkáních ale rozdíly mezi subtypy kadherinů nekončí. Částečnou odlišnost vykazují i ve vlastnostech, které jim umožňují reagovat podle specifických potřeb dané tkáně. Metodou mikroskopie atomárních sil samostatných spojů kadherin-kadherin bylo odha-

leno, že síla, které jsou tyto homotypické interakce schopny odolávat je specifická pro jednotlivé subtypy kadherinů. Pro E-kadheriny se pohybuje okolo 73-157 pN (Panorchan *et al.*, 2006), u VE-kadherinů přibližně kolem 35-55 pN (Baumgartner *et al.*, 2000) a u N-kadherinů v rozmezí 17-40 pN (Panorchan *et al.*, 2006). Tyto poznatky korespondují se skutečností, že jsou různé tkáně ovlivňovány jiným rozmezím sil. Ovšem průměrná velikost těchto sil, působících na kontakty mezi buňkami a mezi buňkou a okolním prostředím nabývá hodnot i 40-300 nN (Maruthamuthu *et al.*, 2011). Samotná interakce mezi kadheriny tedy není dostatečně silná, aby odolala této tenzi. Proto jsou kadheriny svou intercelulární částí nepřímo propojeny s aktinovým cytoskeletem, který stabilizuje AJ a umožňuje morfologické odpovědi buňky na mechanické síly.

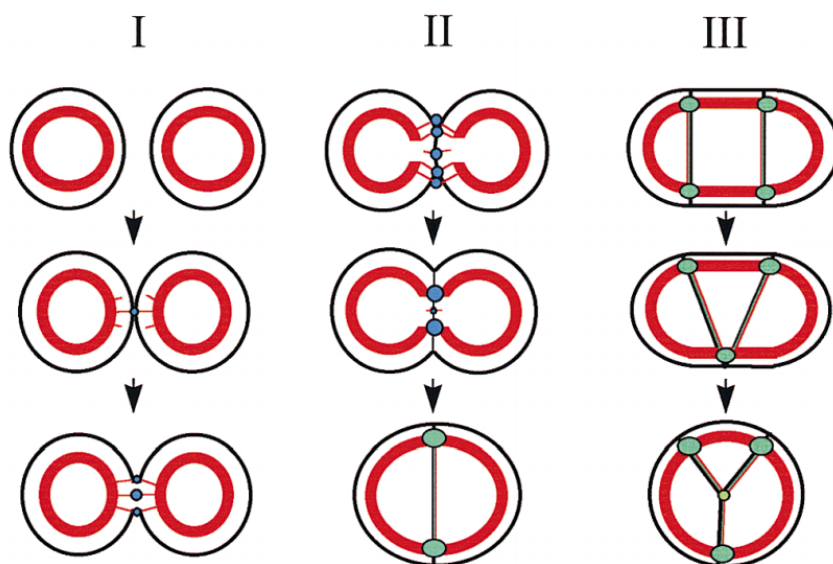
Na rozdíl od extracelulárních domén je intracelulární část klasických kadherinů výrazně konzervována a její struktura je identická napříč všemi subtypy. Obsahuje vazebná místa pro proteiny, které usměrňují endocytózu a slouží k recyklaci a degradaci kadherinů (Ireton *et al.*, 2002). Jiné proteiny zase mohou hrát roli v regulaci buněčné signalizace, kontrole transkripce (Orsulic a Peifer, 1996) a při remodelaci aktinových vláken (Rimm *et al.*, 1995). Tato vazebná místa jsou součástí dvou cytoplazmatických domén. Juxtamembránová doména (JMD) se nachází blízko plazmatické membrány a umožňuje interakci s proteinem p120 (Daniel a Reynolds, 1995). Tento protein patřící do rodiny *armadillo* zajišťuje mnoho aktivit. Zprostředkovává například shlukování mechanosenzorických komplexů během vývoje AJ (Yap *et al.*, 1998), nebo prodlužuje vystavení E-kadherinu na buněčném povrchu, což má vliv na udržení normální epiteliální morfologie (Ireton *et al.*, 2002). Ačkoliv je p120 nepostradatelným členem mechanosenzitivní dráhy v mezibuněčných spojích, neúčastní se interakcí s dalšími členy základního komplexu zprostředkující ukotvení AJ k aktinovému cytoskeletu (Daniel a Reynolds, 1995).

Druhou cytoplazmatickou doménou klasických kadherinů je katenin-vazebná doména (CBD). Do speciálního vazebného místa zde nasedá další člen *armadillo* rodiny, konkrétně β -katenin. Tento mechanosenzorický protein dále dokáže vázat α -katenin, který zprostředkovává kontakt AJ s aktinovými filamenty (Ozawa a Kemler, 1992). Může také vázat APC protein, který funguje jako regulátor řídící poměr mezi vázaným a cytoplazmatickým β -kateninem (Hülsken *et al.*, 1994). U interakcí byl prokázán význam serin/threoninové fosforylace na β -kateninu i kadherinu, což má vliv na afinitu vazby obou těchto partnerů, popřípadě dalších proteinů. Na vazebném místě v CBD byly detekovány tři serinové zbytky (v sekvenci SXXXXXSSE), které jsou rozpoznávány kasein kinázou II (CKII) a kinázou glykogen syntázy 3β (GSK- 3β). Následnou fosforylací serinů v sekvenci dochází ke zvýšení acidity vazebného místa na C-konci kadherinu, což umožňuje nasednutí vazebného α -helixu β -kateninu s bazickým charakterem.

Tato acidobazická interakce je dostatečně stabilní, aby byl β -katenin udržen vázaný v mechanosenzorickém komplexu AJ (Lickert *et al.*, 2000). Z těchto informací vyplývá, že sestavení a fungování komplexu mechanosenzorů je závislé na asociaci protein-kináz s AJ.

Vzhledem k identitě vazebných míst C-konců všech kadherinů je zřejmé, že i jednotlivé subtypy váží stejné cytoplazmatické partnery. Základní mechanosenzorický komplex se tedy ve svém složení nijak neliší. Bylo však prokázáno, že tyto mechanosenzitivní a mechanotransdukční proteiny mohou vyvolat jiné buněčné odpovědi na tažné síly v závislosti na subtypu kadherinu. Například změnou exprese E-kadherinů na N-kadheriny u buněk karcinomu prsu bylo pozorováno zvýšení invazivního fenotypu nádoru (Nieman *et al.*, 1999). To souvisí se zjištěním, že regulací exprese a lokalizace E-kadherinů a jeho vazebných partnerů jsou ovlivněny procesy související s karcinogenezí a vznikem metastáz (Gonzalez *et al.*, 1999). V různých tkáních se k základnímu komplexu mohou přidružovat další proteiny, které se jinde nevyskytují a mohou napomáhat formování tkáňově specifických odpovědí. Takovým proteinem může být například plakoglobin. Jeho jiný název (γ -katenin) poukazuje na homologii s β -kateninem a tím i na jeho příslušnost k *armadillo* rodině. Plakoglobin se váže na C-konec E-kadherinu, nebo N-kadherinu v AJ pouze u kardiomyocytů a pomáhá propojovat komplex s β -kateninem, α -kateninem a aktinem (Knudsen a Wheelock, 1992).

Díky působení tažných sil dochází k vývoji AJ, které se postupnou maturací zpevňují a ovlivňují i samotný tvar buňky. Na základě experimentu s fúzním proteinem E-kadherin-GFP, u kterého byla sledována jeho pozice vůči aktinovým vláknům v čase za působení sil, byla rozlišena 3 stádia vývoje AJ (viz. Obrázek 4). Před samotným začátkem formování spoje jsou kadheriny ukotveny v plazmatické membráně a volně se v ní pohybují. Během prvního stádia dochází ke sdružování mobilních kadherinů do imobilních shluků. Tyto shluky jsou pozorovány po celé délce počátečního kontaktu membrán mezi buňkami a jsou propojeny s aktinovými vlákny, která odbočují z větších obvodových svazků. Ve druhém stádiu vývoje se shluky laterálně spojují do plaků, které jsou koncentrovány na krajích mezibuněčných kontaktů. Plaky tvoří již plně maturovaná stabilní propojení, a to i díky tomu, že dochází k reorientaci obvodových svazků aktinu, která v této fázi směřují kolmo k AJ. Třetí a také poslední stádium nastává tehdy, kdy je potřeba propojit více než jen dvě buňky. V této fázi jsou plaky kadherinů tlačeny k sobě díky kontrakci aktinu. Společně se slučováním plaků se také mění tvar buněk, což je důležité pro zajištění vzájemné přilnavosti. Buňky tak nabývají kuželovitého tvaru, na jehož vrcholcích jsou umístěny maturované AJ (Adams *et al.*, 1998).

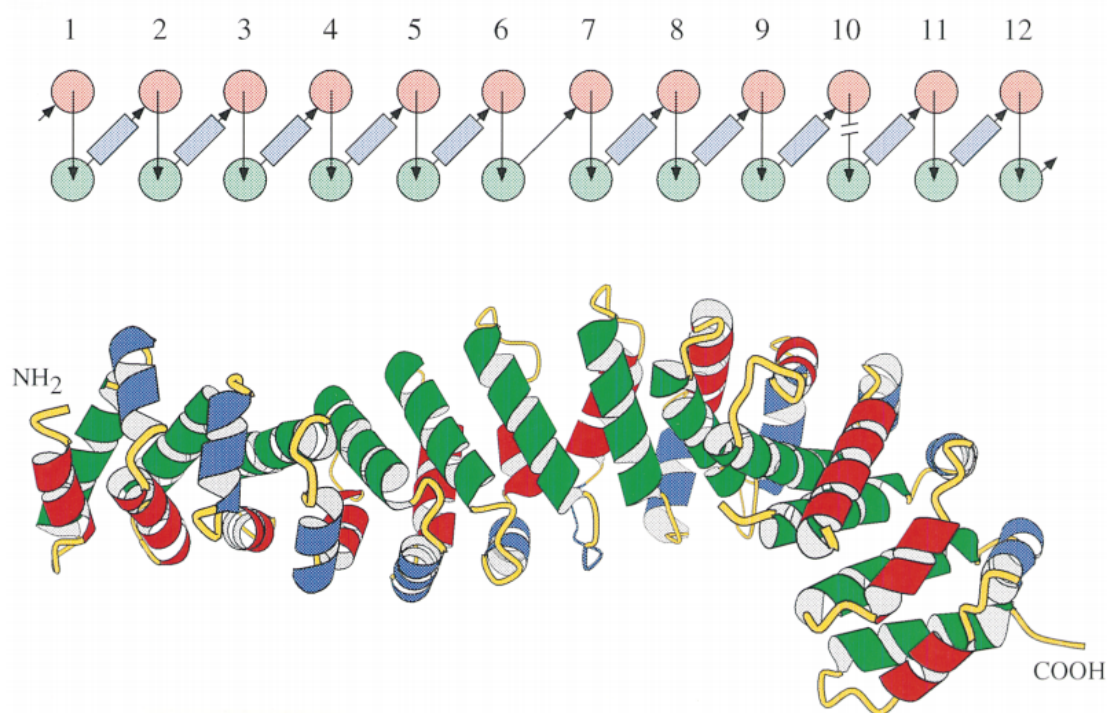


Obrázek 4: Stádia vývoje adhezivních spojů – **I** -první stádium při kterém postupně vzniká kontakt mezi buňkami a propojení jejich aktinového cytoskeletu pomocí jednotlivých kadherin-kateninových komplexů, vznikají imobilní shluky po celé délce kontaktu, ke kterým odbočují aktinová vlákna; **II** -Laterální spojování shluků do větších plaků rozmístěných na krajích kontaktu, obvodové svazky aktinu jsou orientovány kolmo k plakům; **III** -formování kontaktu mezi třemi buňkami, další shlukování plaků do větších kadherin-kateninových komplexů a změna tvaru buněk; **černé kruhy** -cytoplazmatická membrána; **tlusté červené kruhy a výseče** - obvodové svazky aktinu; **tenké červené linky** -odbočující aktinová vlákna; **modré kuličky** - shluky kadherin-kateninových komplexů; **mátově zelené kuličky** -plaky kadherin-kateninových komplexů (převzato Adams *et al.* (1998)).

2.1.2 β -katenin

Od kadherinu pokračuje základní mechanosenzorický komplex AJ β -kateninem. Konformační změny kadherinu vyvolané tažnou silou jsou tak přenášeny na tohoto dalšího přímo navázaného partnera. Jedná se o plně intracelulární protein, který ve své struktuře obsahuje celkem 12 *armadillo* repetice, díky nimž není pochyb o jeho zařazení mezi členy *armadillo* rodiny. Všechny 12 repetice je umístěno v repetiční oblasti (mezi 134. a 671. aminokyselinou myšičího β -kateninu), která je také nazývána $\beta 59$, kde číslo 59 odkazuje na velikost této oblasti v kilodaltech (kDa). Každá samostatná repetice je tvořena 42 specifickými aminokyselinami, které v sekundární struktuře vytvářejí tři α -helixy navzájem propojené přes smyčky. Helixy sousedních repetice spolu interagují a tím vzniká pravotočivá superhelikální organizace oblasti $\beta 59$ (viz. Obrázek 5), jehož vnitřní část tvoří kontinuálně rozmístěné hydrofobní aminokyseliny, zatímco na povrchu jsou přítomny kladně nabitě aminokyseliny (A. H. Huber *et al.*, 1997). Bazické žlábký superhelikální $\beta 59$ oblasti představují vazebná místa pro proteiny, jako je kadherin, APC protein (Hülsken *et al.*, 1994), nebo členy rodiny transkripčních faktorů (Tcf/Lef) (Molenaar *et al.*, 1996), jejichž navázání může mít rozdílné dopady na funkci a sestavení základního

mechanosenzorického komplexu.



Obrázek 5: Superhelikální struktura β_{59} oblasti β -kateninu – v horním schématu jsou čísla 1-12 označeny *armadillo* repetice; v dolním schématu je každá repetice tvořena červeným, zeleným a modrým α -helixem; žlutě jsou označeny smyčky mezi jednotlivými α -helixy (převzato a upraveno A. H. Huber *et al.* (1997)).

Protein β -katenin se vyskytuje ve dvou formách - volný v cytoplazmě, nebo vázaný například v kadherin-kateninovém komplexu mezibuněčných spojů. Vazba bazického superhelixu β -kateninu k CBD na kadherinu je vysokoafinní a dochází k ní těsně po syntéze obou proteinů dosud lokalizovaných v endoplazmatickém retikulu. Tato interakce je potřebná pro iniciaci transportu komplexu na plazmatickou membránu a pro jeho ukotvení v bazo-laterální části polarizované buňky. Během kontaktu β -kateninu a kadherinu nejspíš dochází ke konformačním změnám, které odhalují na jednom z proteinů signální sekvence řídicí sekreční dráhu celého komplexu. Intenzita syntézy a posttranslační modifikace β -kateninu tedy mohou regulovat distribuci kadherinů na buněčném povrchu a tím i nepřímou ovlivňovat pravděpodobnost vzniku AJ (Chen *et al.*, 1999).

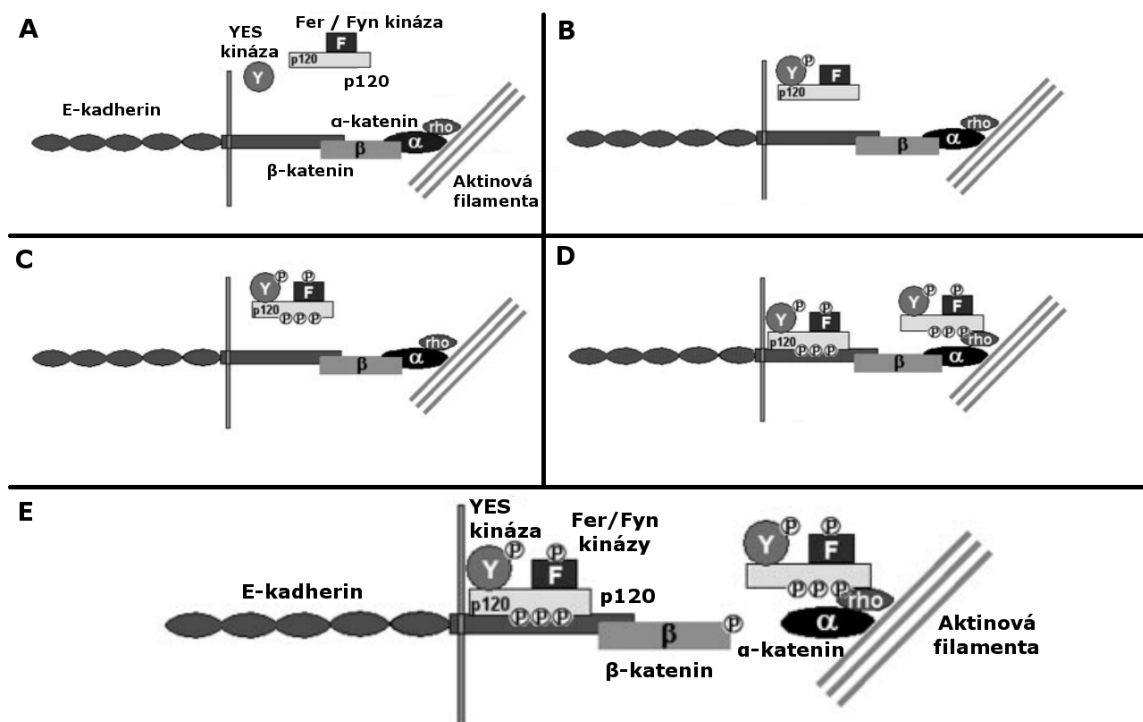
Mechanosenzor β -katenin je důležitým rozcestníkem mezi více signalizačními dráhami. Může být součástí hned několika funkčních komplexů, které mají rozdílný dopad na aktivity buňky. Pokud je β -katenin členem kadherin-kateninového mechanosenzorického komplexu, podporuje

vznik AJ. Tento komplex má tedy adhezivní funkci. Vazbou β -kateninu k proteinu fascin vzniká naopak komplex, který vede buňky k pohybu a má opačný efekt než interakce mezi kadherinem a kateninem. O tom, jestli β -katenin bude součástí jednoho nebo druhého komplexu rozhoduje vzájemná kompetice kadherinu a fascinu o vazbu na rozšířenou C-koncovou oblast β -kateninu. V této oblasti se totiž vyskytují částečně se překrývající vazebná místa pro oba tyto proteiny. Vždy se tedy může navázat pouze jeden z těchto interakčních partnerů, z čehož vyplývá, že β -katenin bude součástí jen jednoho funkčního komplexu. Fascin dále kompetuje o vazbu na β -katenin s plakoglobinem a APC proteinem (Tao *et al.*, 1996).

Pokud je β -katenin součástí kadherin-kateninového komplexu, který již opustil endoplazmatické retikulum a je ukotven na bazo-laterální membráně, může vázat další mechanosenzor a tím je α -katenin (Hinck *et al.*, 1994). Tato interakce je zprostředkována N-koncovou částí β -kateninu (v pozici 120-151 aminokyselin), do které už ovšem příliš nezasahují *armadillo* repetice (Aberle *et al.*, 1994). Přesto zde dochází k nasedání aminokyselinových zbytků N-konce α -kateninu a to s poměrně vysokou afinitou. Je to dáno tím, že α -katenin nepatří mezi *armadillo* proteiny, a tak nepotřebuje pro své navázání tyto speciální repetice (Herrenknecht *et al.*, 1991). V N-koncové části α -kateninu se kromě vazebného místa pro β -katenin nachází také homodimerizační oblast a dochází zde k částečnému překryvu obou těchto míst. Protein α -katenin tak společně s β -kateninem může vytvářet heterodimer, který brání vzniku homodimeru složeného pouze z α -kateninů. Zastoupení α - β heterodimerů oproti α - α homodimerům je buňkami udržováno v určitém poměru, kde heterodimery převažují (Koslov *et al.*, 1997). Ovšem tento poměr se může v rámci vývoje tkání měnit, protože oba dimery mají jiné funkce v rozdílných buněčných procesech. Nastolení správné hladiny homodimerů a heterodimerů je také závislé na různých posttranslačních modifikacích.

Mezi nejčastější posttranslační modifikace β -kateninu, které významně ovlivňují jeho interakce s ostatními proteiny, patří fosforylace. Jak již bylo zmíněno v předchozí podkapitole o kadherinech, serin/threoninová fosforylace zvyšuje afinitu vazeb β -kateninových interaktorů. Stejně kinázy, které rozpoznávají seriny na CBD kadherinů také dokáží fosforylovat motivy na N-koncové části β -kateninu. Enzym CKII detekuje Ser29, Thr102 a Thr112 místa na lidském β -kateninu, která následně fosforyluje, čímž umožňuje vazbu GSK-3 β na N-konec a tím ještě zvyšuje celkovou fosforylací β -kateninu. Obě tyto kinázy jsou součástí multiproteinového komplexu a jejich aktivita stabilizuje interakci mezi β -kateninem a α -kateninem (Bek a Kemler, 2002). Opačný efekt vyvolává fosforylace tyrozinových zbytků. Hlavními centry této modifikace u lidského β -kateninu jsou Tyr142 a Tyr654, kde fosforylace Tyr142 destabilizuje vazby β -kateninu s α -kateninem, zatímco fosforylace Tyr654 vede k rozrušení interakce mezi β -kateninem a kad-

herinem. Během fosforylace obou těchto aminokyselinových pozic byla pozorována zvýšená aktivita kináz Fer a Fyn. Ovšem tyto kinázy mohou přímo fosforylovat pouze tyrozin v pozici 142. Nicméně není vyloučeno, že se Fer a Fyn kinázy podílejí na fosforylaci Tyr654 alespoň nepřímo. Fer i Fyn patří do rodiny Src kináz, jejichž substrátem je také protein p120. Proto je možné, že fosforylací p120 dochází k jeho snadnější vazbě na kadherin (viz. Obrázek 6). Další kinázy, které jsou asociované s tímto proteinem pak mají snadnější přístup pro fosforylaci Tyr654 na β -kateninu (Piedra *et al.*, 2003).



Obrázek 6: Aktivace protein-kináz Fer a Fyn a následná fosforylace β -kateninu – **A** - neaktivní YES kináza se dostává do blízkosti komplexu p120-Fer/Fyn, ale v nefosforylovaném stavu se na něj nemůže vázat; **B** - aktivovaná Yes kináza se váže na protein p120; **C** - YES kináza fosforylací aktivuje kinázy Fer a Fyn a ty fosforylují protein p120; **D** - fosforylovaný p120 se společně s Fer, Fyn a YES kinázami váže na kadherin-kateninový komplex (Komplex protein-kináz a p120 se ve fosforylované formě může vázat na cytoplazmatickou část E-kadherinu, nebo na α -katenin přes Rho protein); **E** - fosforylace β -kateninu Fer a Fyn kinázami vede k disociaci α -kateninu a tím zaniká propojení komplexu s aktinovým cytoskeletem; **Písmena "P"v kroužku** - místa fosforylace (převzato a upraveno Piedra *et al.* (2003)).

Tyrozínové fosforylace β -kateninu tedy narušují jeho interakce s kadheriny a α -kateniny, čímž zaniká celý kadherin-kateninový komplex a tím i AJ. Jak již bylo výše zmíněno, β -katenin nemusí být pouze mechanosenzorem ukotveným pomocí dalších proteinů poblíž membrány, ale může být také lokalizován volně v cytoplazmě. Zde hraje roli jako kotranskripční faktor Wingless/Int1 (Wnt) signalizační kaskády. Během příchozího signálu z Wnt dráhy dochází k vazbě N-konců Tcf/Lef na *armadillo* repetice cytozolického β -kateninu. Touto interakcí se odhalí jaderný lokalizační signál na Tcf, který navede celý komplex do jádra. Samotný Tcf/Lef dokáže rozpoznat a nasedat na regulační sekvence cílových genů, ale pouze v interakci s β -kateninem vyvolá iniciaci transkripce (Molenaar *et al.*, 1996). Dalším důležitým účastníkem Wnt kaskády je protein B-buněčného lymfomu 9-2 (BCL 9-2). Tento kotranskripční faktor se váže na β -katenin v místě mezi první a druhou *armadillo* repeticí. Ve vazebné oblasti se také nachází Tyr142, který musí být fosforylovaný, aby mohlo dojít k interakci s BCL 9-2. Tímto mechanismem je zajištěno, že β -katenin nebude vázat BCL 9-2 současně s α -kateninem, což proteinu BCL 9-2 umožňuje přepínat mezi adhezivní a transkripční funkcí β -kateninu. Zároveň bylo prokázáno, že se BCL 9-2 podílí také na epiteliálně-mezenchymální tranzici, tedy na změně morfologie z přisedlých a dlaždicovitě tvarovaných buněk na pohyblivé buňky nepravidelného tvaru (Brembeck *et al.*, 2004).

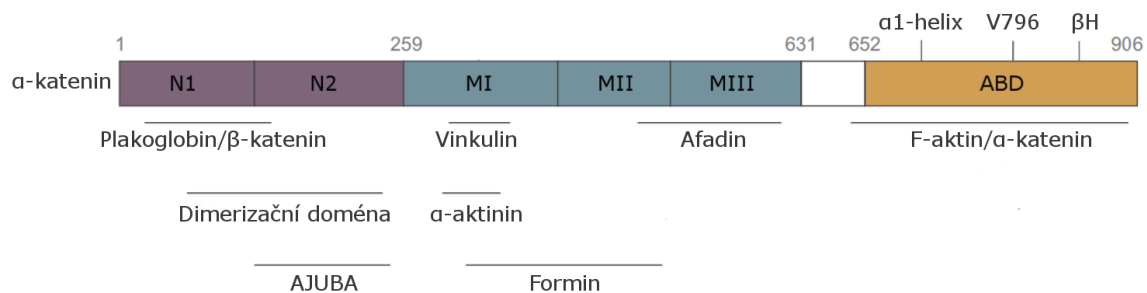
Aktivace Wnt dráhy a funkce β -kateninu jako kotranskripčního faktoru se uplatňuje převážně během embryonálního vývoje (Korinek *et al.*, 1998), regenerace tkání (Osakada *et al.*, 2007) a homeostázi (Fevr *et al.*, 2007). Mimo tyto procesy musí být hladina cytozolického β -kateninu udržována na nízké hodnotě a převažuje tak jeho vázaná forma, kde plní adhezivní a mechanosenzorické funkce v rámci AJ.

2.1.3 α -katenin

Posledním, ale zato velmi důležitým proteinem tvořící základní mechanosenzorický komplex v AJ je α -katenin. Na rozdíl od kadherinu a β -kateninu, α -katenin patří do vinkulinové rodiny, a tak neobsahuje žádné *armadillo* repetice (Herrenknecht *et al.*, 1991). Další podstatnou odlišností je jeho vysoká citlivost na působení tažných sil. Zatímco kadherin a β -katenin slouží v mechanosenzingu spíše jen jako spojníky mezi plazmatickou membránou a intracelulárním prostředím (jejich konformace se během mechanického napětí příliš nemění), α -katenin se svým homologem vinkulinem zajišťuje hlavní mechanosenzorické funkce AJ a přenos působících sil na chemický signál (Yonemura *et al.*, 2010).

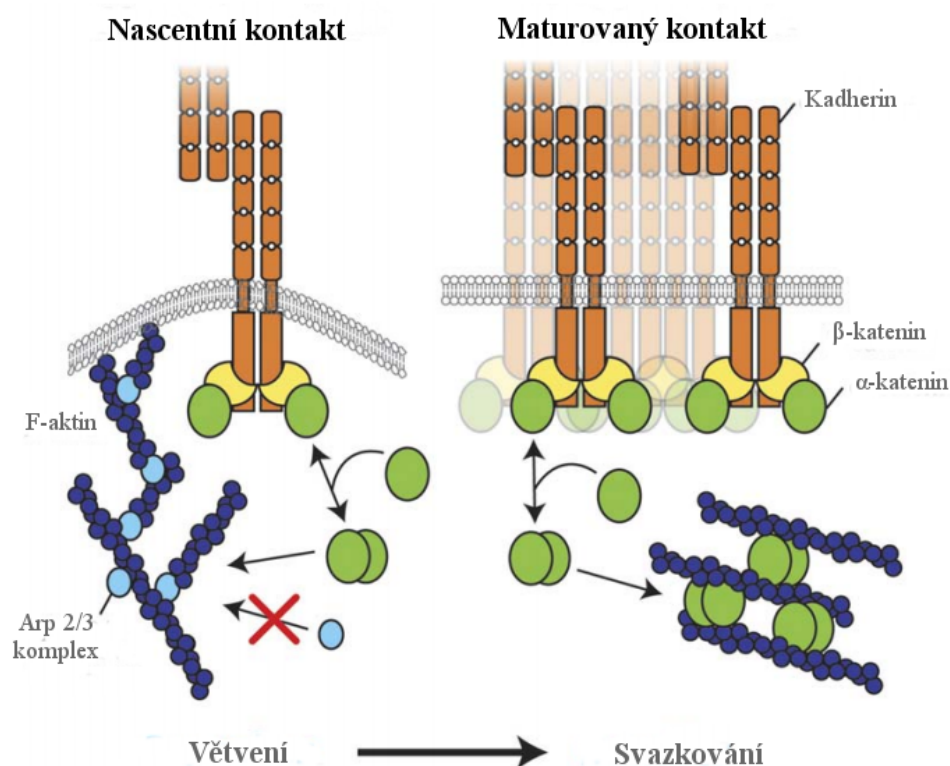
Vlastností, kterou se α -katenin naopak podobá kadherinu je vytváření tkáňově specifických

izoforem. Odlišné formy jsou preferenčně distribuovány v určitých tkáních, a tak například v nervovém systému jsou AJ nejčastěji tvořeny N-kadherinem a neurálním α -kateninem (Hirano *et al.*, 1992). Ačkoliv se izoformy navzájem liší v místech výskytu, organizace jejich domén je neměnná. Ve struktuře α -kateninu lze rozlišit tyto základní části: dvě N-terminální domény, několik centrálních modulačních domén a C-terminální doménu (viz. Obrázek 7). První N-terminální doména vždy obsahuje vazebné místo pro β -katenin a plakoglobin (O. Huber *et al.*, 1997). Tyto úseky částečně překrývají homodimerizační oblast, která zasahuje až do druhé N-terminální domény. Zde se mimo jiné nachází také vazebné místo pro AJUBA protein (Marie *et al.*, 2003). Střední část α -kateninu patří modulačním doménám, které bývají zpravidla tři (M1, M2, M3). V oblasti M1 je uloženo vinkulin-vazebné místo (VBS) (Watabe-Uchida *et al.*, 1998), zčásti zastihující sekvenci pro nasedání α -aktininu (Nieset *et al.*, 1997), což z obou proteinů dělá vzájemné konkurenty. Domény M2 a M3 v sobě mají uložené motivy, které jsou určeny pro kontakt s proteiny, jako je formin a afadin (Kobiela *et al.*, 2004; Pokutta *et al.*, 2002). C-koncová část nese pouze aktin vazebnou doménu (ABD), ukotvující α -katenin (a společně s ním i celý kadherin-kateninový komplex) k aktinovému cytoskeletu (Rimm *et al.*, 1995).



Obrázek 7: Schéma rozložení domén myšího α -kateninu a vazebných míst s ním asociovaných proteinů – N1, N2 -N-koncové domény s vazebnými místy pro β -katenin, plakoglobin, AJUBA protein a s dimerizační doménou, domény se nachází mezi první a 259. aminokyselinou; MI, MII, MIII -tři modulační domény s vyznačenými vazebnými místy pro vinkulin, α -aktinin, formin a afadin, domény se nachází mezi 259. a 631. aminokyselinou; ABD -aktin vazebná doména na C-konci α -kateninu obsahující motivy pro interakci s vlákny aktinu a dalším α -kateninem, tato doména se vyskytuje mezi 652. a 906. aminokyselinou; α 1-helix a β H jsou mechanosenzitivní motivy v ABD doméně a obsahují kryptické místo V796 (převzato a upraveno Angulo-Urarte *et al.* (2020)).

Dlouhou dobu se myslelo, že samotný α -katenin slouží v AJ jako přímé propojení mezi mechanosenzorickým komplexem a aktinovými filamenty. Avšak poslední studie poukazují na nedostatečný počet současných vazeb α -kateninu se zbytkem kadherin-kateninového komplexu a s aktinovým cytoskeletem. Tento poznatek souvisí se schopností α -kateninu přepínat mezi vytvářením homodimerů, nebo monomerů. Jako monomer se α -katenin přednostně váže na β -katenin a stává se tak součástí komplexu. V této formě ale není schopný zároveň dostatečně silně vázat aktinová vlákna, protože interakce s β -kateninem zamezují vzniku určitých vazebných struktur na C-konci α -kateninu, které jsou součástí ABS (Rangarajan a Izard, 2013). Ovšem tato vazba je v určitých situacích nestabilní. Zvýšení lokální koncentrace α -kateninu v cytoplazmě vede k alosterickému přepnutí z monomerní vázané formy na homodimerickou, což je doprovázeno snížením afinity α -kateninu ke zbytku základního mechanosenzorického komplexu. Udává se, že pro tuto záměnu je potřeba, aby se koncentrace cytoplazmatického α -kateninu zvýšila z původních 0,6 mM alespoň na 6 mM (10-ti násobné zvýšení koncentrace). K takovému vzrůstu koncentrace dochází v průběhu maturace AJ během působení mechanických sil popisované v podkapitole o klasických kadherinech. Při vývoji tohoto mezibuněčného propojení se jednotlivé mechanosenzorické komplexy postupně shlukují na jednom místě a tím se zvyšuje lokální koncentrace α -kateninu. Jako homodimer pak α -katenin dokáže vázat aktinový cytoskelet a tím inhibuje Arp-2/3 komplex. Komplex Arp-2/3 v konkurenci s homodimerem α -kateninu nedokáže efektivně interagovat s F-aktinem (viz. Obrázek 8) a není tak schopen nukleovat polymeraci aktinu a indukovat jeho větvení (Drees *et al.*, 2005). Díky tomu může α -katenin přes asociovaný protein formin zahájit polymeraci aktinových monomerů do silných svazků ve směru tažné síly (Kobielak *et al.*, 2004).



Obrázek 8: Dimerizace α -kateninu vedoucí k iniciaci formování aktinových svazků – Nascentní kontakt - α -katenin je převážně v monomerické formě vázané na β -katenin; α -katenin se neváže na aktinový cytoskelet; na aktin je navázán komplex Arp-2/3, který umožňuje větvení aktinových vláken; **Maturovaný kontakt** - dochází ke sdružování kadherin-kateninových komplexů; zvyšuje se lokální koncentrace α -kateninu, který dimerizuje a disociuje od zbytku komplexu; dimery α -kateninu se váží na aktinový cytoskelet a zabráňují vzniku Arp-2/3 komplexu; aktinová vlákna začínají vytvářet pevné svazky (převzato a upraveno Drees *et al.* (2005)).

Pro mechanosenzitivní funkce AJ je propojení kadherin-kateninového komplexu s aktinovými vlákny nezbytné. Aby bylo toto spojení dostatečně silné je nutné zvýšit afinitu monomerního α -kateninu k aktinovému cytoskeletu, aniž by tím byla narušena jeho vazba na β -katenin. K tomuto stavu skutečně dochází, a to pod vlivem působení tažných sil (Buckley *et al.*, 2014). Tenze vyvíjená na α -katenin způsobuje změnu konformace v důležitých motivech pro asociaci s aktinem. Těmito motivy jsou α 1-helix a β H, lokalizované na ABD. Tažná síla způsobuje rozvinutí α 1-helixu a tím dojde k odhalení kryptického místa V796, které je zodpovědné za zvýšení afinity vazby α -kateninu k aktinu. Při natažení α 1-helixu se odhalí také motiv β H, tvořící povrch pro navázání dalšího α -kateninu, což vede k dimerizaci (Ishiyama *et al.*, 2018). Tyto motivy ale nejsou jedinými místy, ve kterých dochází ke změnám konformace během působení sil. Protein α -katenin zaujímá při absenci tenze autoinhibiční konformaci, kdy jsou modulační domény MII a MIII uspořádány tak, že zakrývají MI oblast obsahující VBS. Jakmile jsou tyto

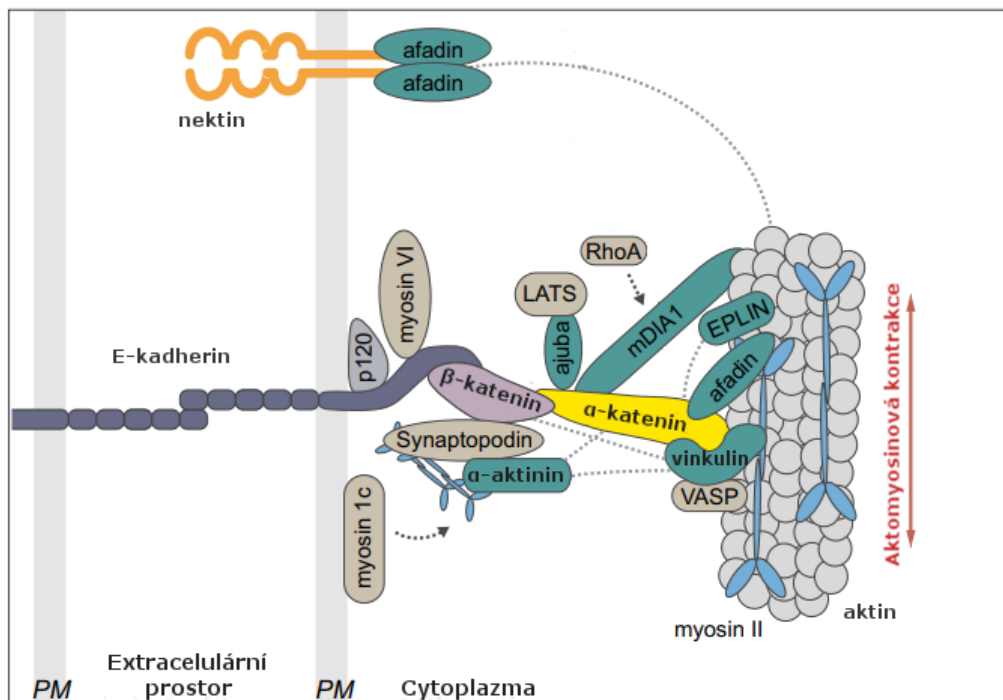
domény vystaveny dostatečně velké síle, změní se jejich konformace a vzájemné uspořádání. Síla potřebná k přechodu všech modulačních domén z autoinhibiční konformace do otevřené konformace se pohybuje okolo 15 pN, avšak už síla o velikosti 5-6 pN je dostačující pro odkrytí MI domény. Odhalení MI oblasti umožňuje nasedání α -katenin homologního proteinu vinkulinu do takto exponovaného vazebného místa (Pang *et al.*, 2019). Vzhledem k tomu, že je vinkulin také aktin-vazebným proteinem, stabilizuje a zvyšuje tak míru interakce mezi α -kateninem a aktinovým cytoskeletem, aniž by došlo k disociaci α -kateninu od zbytku základního mechano-senzorického komplexu.

Poté co α -katenin působením dostatečné tenze přejde do otevřené konformace, je schopen si tuto formu udržet i po odeznění iniciační síly. Tuto vlastnost mu nejspíš udílejí různé posttranslační modifikace, ale také navázaný vinkulin, který brání opětovnému zaujetí autoinhibičního stavu (Biswas *et al.*, 2016). Nicméně, v rámci otevřené konformace má α -katenin schopnost reverzibilně přepínat mezi stabilními formami, což mu umožňuje regulovat interakce s různými vazebnými partnery. Díky tomu může α -katenin zprostředkovat rozdílné procesy v AJ na základě momentálně působících sil (Kim *et al.*, 2015).

Kvůli jeho širokému rozpětí vazebných partnerů je α -katenin považován za hlavní mecha-notransdukční protein AJ, který mechanickou sílu transformuje na signál vedoucí k aktivaci různých signálních procesů a podílí se na mechanickou silou indukované remodelaci aktinového cytoskeletu.

2.2 Další vazební partneři mechanosenzorického komplexu

Jak již bylo výše zmíněno, minimální mechanosenzorický komplex tvořený kadheriny, β -kateniny a α -kateniny není dostatečný pro efektivní propojení aktinového cytoskeletu dvou a více sousedních buněk a není proto schopný plně zajišťovat základní mechanosenzorickou funkci. Ačkoliv tento komplex zajišťuje buněčný kontakt detekující působící síly, nedokáže formovat adekvátní reakce. K tomuto účelu slouží přidružené vazební proteiny, které rozšiřují možnosti buněčných odpovědí tím, že se účastní mnoha signalizačních kaskád. Tyto mechanotransdukční proteiny využívají vzniklý kadherin-kateninový komplex jako "lešení", na které regulovaně nasedají (viz. Obrázek 9). Tím je zajištěno propojení různých signálních drah a formování komplexních odpovědí buňky na mechanický stres. O několika důležitých vazebných partnerech minimálního mechanosenzorického komplexu a jejich vlastnostech budou pojednávat následující kapitoly.



Obrázek 9: Vazební partneři základního kadherin-kateninového komplexu v zónulárních adhezích – na obrázku jsou vidět proteiny, které tvoří vazebné interakce s α -kateninem, β -kateninem i E-kadherinem v maturovaném spoji; v horní části obrázku je vidět původní mezibuněčný spoj založený na komplexu nektin-afadin; **PM** - plazmatická membrána; **přerušovaná čára** - interakce mezi proteiny (převzato a upraveno Angulo-Urarte *et al.* (2020)).

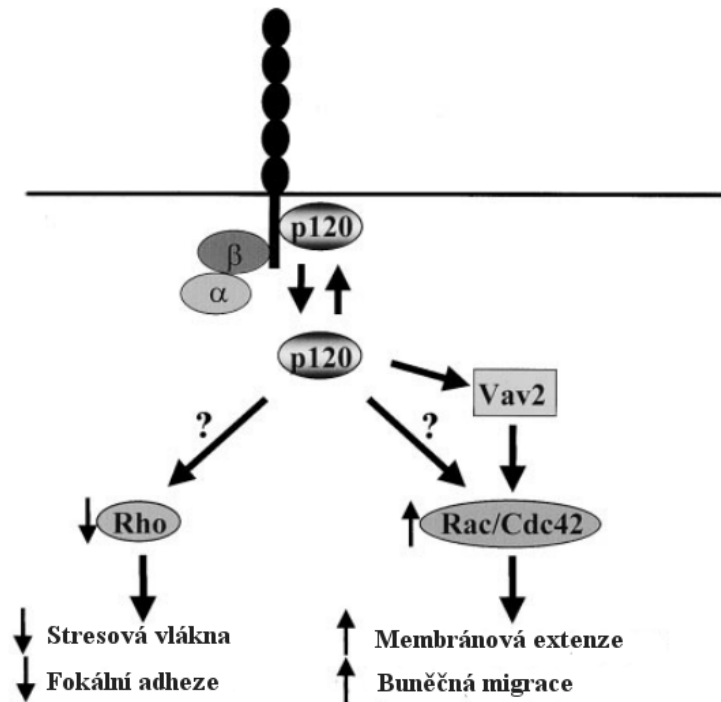
2.2.1 Protein p120

Dnes už je dobře známo, že protein p120 (p120 katenin) patří do *armadillo* rodiny a že je homotypický s β -kateniny a plakoglobiny (Reynolds *et al.*, 1992). Původně však byl tento protein objeven jako substrát pro nереceptorové tyrozin-kinázy Src (Reynolds *et al.*, 1989). Teprve o několik let později byly ve struktuře p120 odhaleny repetice typické pro *armadillo* proteiny.

Tyrozinová fosforylace má na funkci p120, stejně jako na vlastnosti ostatních *armadillo* proteinů, výrazný vliv. Růstové faktory přes své buněčné receptory nepřímým způsobem aktivují Src kinázy, které indukují a zvyšují fosforylace tyrozinových motivů na p120 (Osherov a Levitzki, 1994). U nádorových buněk je hladina této fosforylace mnohonásobně vyšší než u zdravých buněk (Cartwright *et al.*, 1989). Protein p120 se může stát vazebným partnerem hned několika členů základního kadherin-kateninového komplexu, ale právě fosforylované tyroziny mohou některé tyto interakce inhibovat. Tento proces vede k regulaci tvorby AJ, které jsou důležité pro kontrolu kontaktní inhibice buněčného růstu a diferenciaci (Shibamoto *et al.*, 1995).

Naopak fosforylace na serin/threoninových motivech proteinu p120 stabilizuje jeho interakce s ostatními členy minimálního mechanosenzorického komplexu. Příkladem může být vazba na JMD E-kadherinu. Protein p120 je sám schopný nasedat na vysoce konzervovanou sekvenci tvořenou osmi aminokyselinami v JMD. Tím dochází ke stabilizaci distribuce E-kadherinu na plazmatické membráně, což podporuje adhezivní vlastnosti mezi buňkami. Zároveň se tím snižuje množství volného p120, který může být translokován do jádra, kde řídí buněčnou proliferaci (Ferber *et al.*, 2002). Interakcí s JMD se p120 dostává do blízkosti plazmatické membrány, kde se nachází patřičné protein-kinázy. Serin/threoninová fosforylace proteinu p120 ještě zvyšuje afinitu jeho vazby k E-kadherinu a navíc umožňuje shlukování kadherin-kateninových komplexů (Fukumoto *et al.*, 2008).

V neposlední řadě se p120 podílí také na remodelaci aktinových filament, aniž by s nimi byl v přímém kontaktu. Buňky s vysokou expresí tohoto proteinu se vyznačují zvýšenou mobilitou. Je to dáno tím, že kadheriny nestíhají vyvázat všechny p120 a tím se zvyšuje množství jeho cytoplazmatické formy. V této podobě může p120 svou interakcí aktivovat protein Vav2, který slouží jako GEF (aktivuje G-proteiny indukcí výměny GDP za GTP) pro členy Rho rodiny. Mezi takové členy patří například proteiny Cdc42 a Rac1 (viz. Obrázek 10), které regulují přestavbu aktinového cytoskeletu a tím i mobilitu buněk (Noren *et al.*, 2000).



Obrázek 10: Interakce cytoplazmatického p120 se členy Rho rodiny – černá struktura na horní části obrázku - kadherin; na kadherin jsou vázané proteiny β -katenin a p120; α -katenin je ke kadherinu vázán přes β -katenin; p120 může být volně v cytoplazmě, nebo vázán v kadherin-kateninovém komplexu; nevázaný p120 může interagovat s Vav2, Rho, Rac/Cdc42; šípky s otazníkem - předpokládané interakce; interakce p120 s Rho snižuje aktivitu Rho proteinu a tím jsou narušena stresová vlákna a fokální adheze; interakce p120 s Vav2 podporuje zvýšení aktivity Rac/Cdc42; zvýšená aktivita Rac/Cdc42 vede ke zvýšení membránové extenze a buněčné migrace (převzato a upraveno Noren *et al.* (2000)).

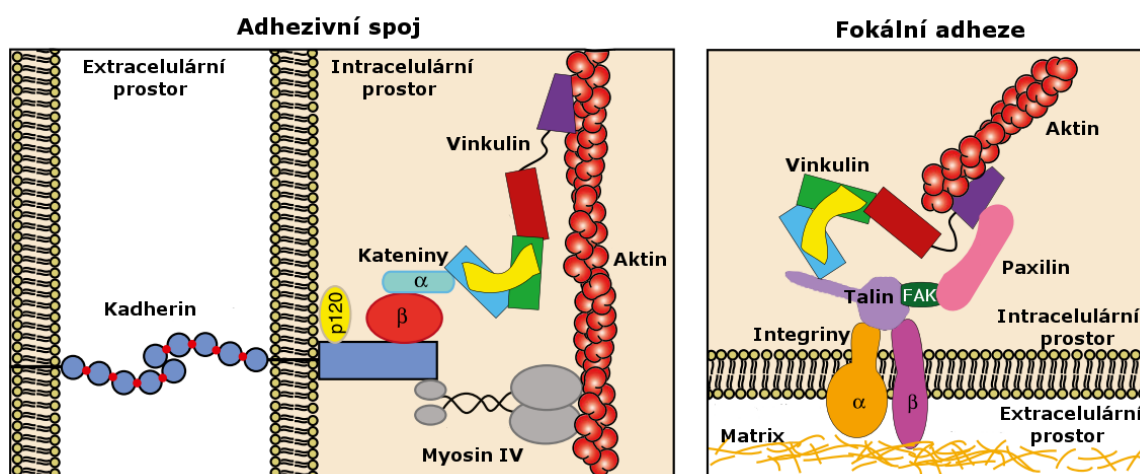
Souhrnně lze říct, že je p120 multifunkčním proteinem, který hraje významnou roli v buněčných procesech jako je proliferace, diferenciace, kontaktní inhibice růstu, mobilita a mnoho dalších. Ztráta schopnosti jeho exprese bývá doprovázena nádorovou transformací a invazivitou (Ireton *et al.*, 2002).

2.2.2 Vinkulin

Důležitou funkci v AJ zastává vinkulin, který je stejně jako jeho homolog α -katenin mechanosenzitivním aktin-vazebným proteinem (Menkel *et al.*, 1994). Oba tyto proteiny v rámci kadherin-kateninového komplexu vzájemně interagují a tím zajišťují stabilní mezibuněčné propojení aktinového cytoskeletu. Teprve po vytvoření této vazby je α -katenin skutečně pevným spojníkem zbytku mechanosenzitivního komplexu s aktinovými vlákny (Janssen *et al.*, 2006).

Ačkoliv je vinkulin pro vlastnosti AJ klíčový, jeho původní lokalizace je asociována s fokálními adhezemi (Geiger, 1979). Ve fokálních adhezích vinkulin vytváří propojení intracelulárních aktinových vláken s ECM přes protein talin (Burrige a Mangeat, 1984) a další členy adheziv-

ního komplexu (viz. Obrázek 11). Do AJ je vinkulin naveden až poté, co spoj projde maturací spojenou s působením sil. Tyto síly musí nabývat vyšších hodnot než 5 pN, aby byly dostačující pro rozvinutí autoinhibiční konformace α -kateninu a pro odhalení VBS. Taková síla může být vyvinuta například aktivitou jediného myosinového motoru (Finer *et al.*, 1994). Po navázání hlavové N-koncové domény vinkulinu na VBS α -kateninu se zvyšuje afinita C-terminální domény vinkulinu k aktinovým vláknům (H.-J. Choi *et al.*, 2012).

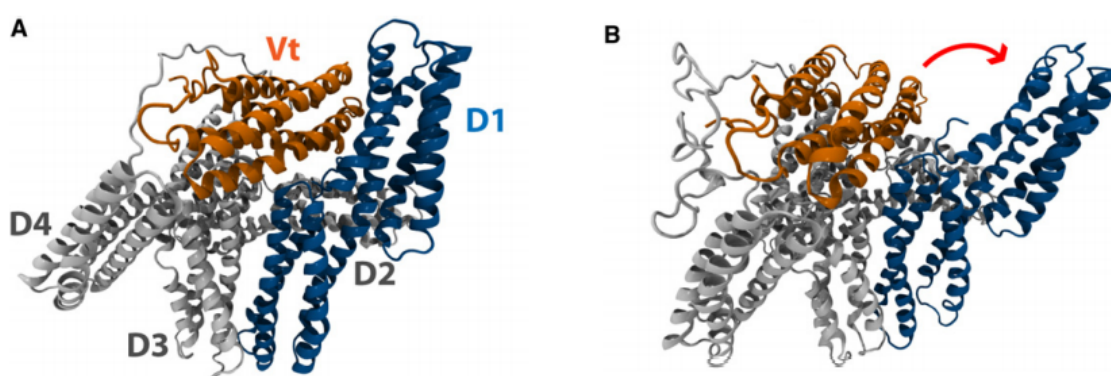


Obrázek 11: Lokalizace vinkulinu v adhezivních spojkách a fokálních adhezích – Vinkulin se skládá ze čtyř helikálních domén a C-terminální domény interagující s aktinem. V AJ vinkulin interaguje s α -kateninem a β -kateninem a spojuje kadherin-kateninový komplex s aktinovými vlákny. Ve fokálních adhezích funguje vinkulin jako spojník mezi ECM a aktinovým cytoskeletem. Zde interaguje s proteiny jako jsou talin a paxilin. (převzato a upraveno Leerberg a Yap (2013)).

Na velikosti síly závisí i míra lokalizace vinkulinu do AJ. Síla pocházející z aktivity cytoskeletálního myosinu II může být mezi buňkami rozložena nerovnoměrně. V buňce, na jejíž kadherin-kateninový komplex působí větší část této síly, dochází k výraznému nahromadění vinkulinu, který umožňuje zapojení více aktinových vláken v rámci spoje. Tím je vyvážena počáteční nerovnováha a mezibuněčný spoj se pak může posouvat směrem k té buňce, na kterou působila větší tažná síla (Yonemura *et al.*, 2010).

Pro začlenění proteinu vinkulin do kadherin-kateninového komplexu je tedy potřeba mechanicky rozvolnit autoinhibiční organizaci α -kateninu. Ovšem i vinkulin zaujímá určitou konformaci, kdy jeho N-koncové a C-koncové domény mezi sebou vytváří intramolekulární vysokoafinní interakci a tím je zamezen kontakt vinkulinu s některými vazebnými partnery (Johnson a Craig, 1994). Aby došlo k rozrušení této interakce a navození otevřené aktivní formy vinkulinu

je nutná ligandy řízená změna konformace obou domén. Vzhledem k vysokoafinnímu charakteru vazby, který v sobě nese obrovský energetický potenciál, musí být energie přinášena vinkulinovými aktivačními ligandy hodně vysoká. Proto se na změně konformace podílí několik různých ligandů, jejichž energetický potenciál se sčítá. Jakmile je překročen původní intramolekulární potenciál, N-koncová doména disociuje od C-koncové domény (viz. Obrázek 12) a vinkulin poté zaujímá otevřenou konformaci. Mezi aktivační ligandy vinkulinu patří například proteiny talin a α -katenin, kdy talin zastává tuto roli ve fokálních adhezích, zatímco α -katenin má tyto vlastnosti v AJ (Bakolitsa *et al.*, 2004).



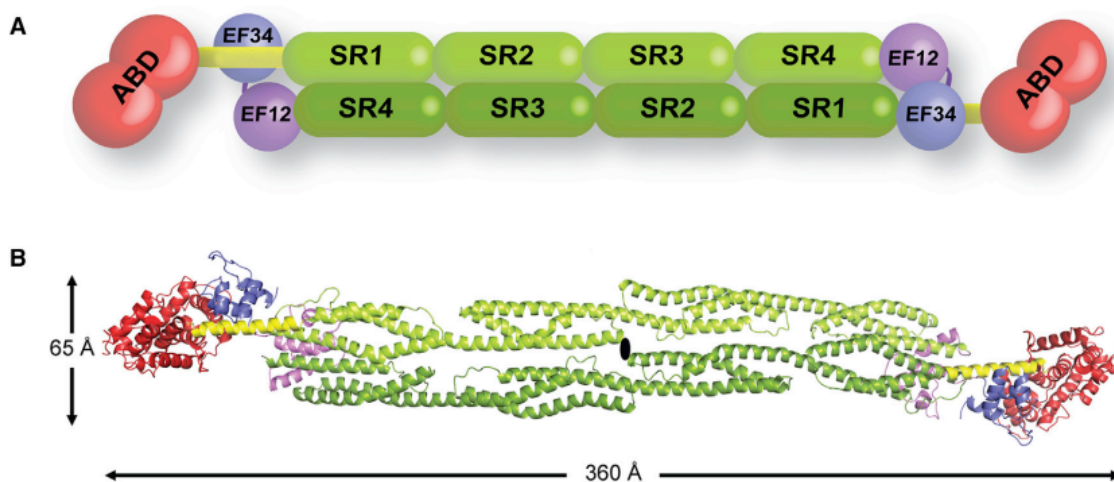
Obrázek 12: Autoinhibiční a otevřená konformace proteinu vinkulin – D1-D4 - helikální domény na N-konci až střední části proteinu; Vt - vinkulinová ocasová doména na C-konci proteinu; **A** - nativní autoinhibiční konformace vinkulinu, kdy Vt (označena oranžově) a D1 (označena modře) domény vzájemně interagují; **B** - otevřená konformace vinkulinu, Vt a D1 domény změnila svou organizaci a disociovaly od sebe (převzato a upraveno Golji *et al.* (2011)).

V otevřené konformaci může vinkulin interagovat s různými vazebnými partnery. Kromě výše zmíněného aktinu, talinu a α -kateninu je protein asociován také například s β -kateninem, α -aktininem, Arp-2/3 komplexem a mnoho dalšími molekulami. Asociace s β -kateninem se ukázala být klíčová pro navedení vinkulinu do AJ. Tato vlastnost byla ověřena na mutantních formách vinkulinu, u kterých byla zachována schopnost nasedat na α -katenin, ale mutace zabránila interakci s β -kateninem. Vinkulin byl v tomto případě lokalizován pouze mimo AJ (Peng *et al.*, 2010). Ve struktuře proteinu α -aktininu byla nalezena dokonce dvě vazebná místa určená pro přímý kontakt s vinkulinem (McGregor *et al.*, 1994). Zvláštní funkci má vazba Arp-2/3 komplexu na vinkulin. V tomto případě nejde o interakci, která by vedla k aktivaci aktin větvičného komplexu, pouze zprostředkovává jeho umístění v rámci fokálních adhezí (DeMali *et al.*, 2002).

2.2.3 α -aktinin

Vinkulin dokáže interagovat s dalším aktin-vazebným proteinem jakým je i on sám a to s α -aktininem. Doména, která je zodpovědná za vazbu aktinového cytoskeletu je lokalizována na N-konci molekuly. Protein α -aktinin je narozdíl od vinkulinu homologický se spektriny, na což poukazují čtyři spektrinové repetice umístěné v centrální části proteinu (Baron *et al.*, 1987). Mezi těmito repeticemi se nachází VBS (McGregor *et al.*, 1994) a vazebné místo pro α -katenin (Nieset *et al.*, 1997). Zbytek molekuly je tvořen doménami s místy pro nasedání Ca^{2+} iontů, které mohou u některých tkáňově specifických izoform α -aktininu ovlivňovat jeho další interakce (Baron *et al.*, 1987).

Vazba mezi α -aktininem a α -kateninem je umožněna pouze tehdy, pokud je α -katenin v přímém kontaktu s β -kateninem. V tomto případě dokáže navázaný α -aktinin dimerizovat (viz. Obrázek 13), čímž získává schopnost vázat dva α -kateniny, které jsou začleněny do jiných kadherin-kateninových komplexů a tím dochází ke shlukování a stabilizaci AJ (Nieset *et al.*, 1997). Přestože je α -aktinin schopný vázat α -katenin jak v epiteliálních buňkách, tak ve fibroblastech, interakce α -aktininu s vinkulinem nebyla zatím ve fibroblastech nalezena (Knudsen *et al.*, 1995).



Obrázek 13: Antiparalelní dimer α -aktininu – **A** - schéma struktury antiparalelního dimeru α -aktininu; **B** - sekundární struktura antiparalelního dimeru α -aktininu; **ABD** - aktin vazebná doména na N-konci molekuly (zobrazena červeně na obrázku B); **SR1-4** - čtyři serinové repetice, které obsahují vazebná místa pro α -katenin a vinkulin (na obrázku B zobrazeny zeleně); **EF34, EF12** - domény na C-konci molekuly (na obrázku B zobrazeny modře a fialově) s vazebnými místy pro Ca^{2+} ionty (převzato a upraveno Ribeiro *et al.* (2014)).

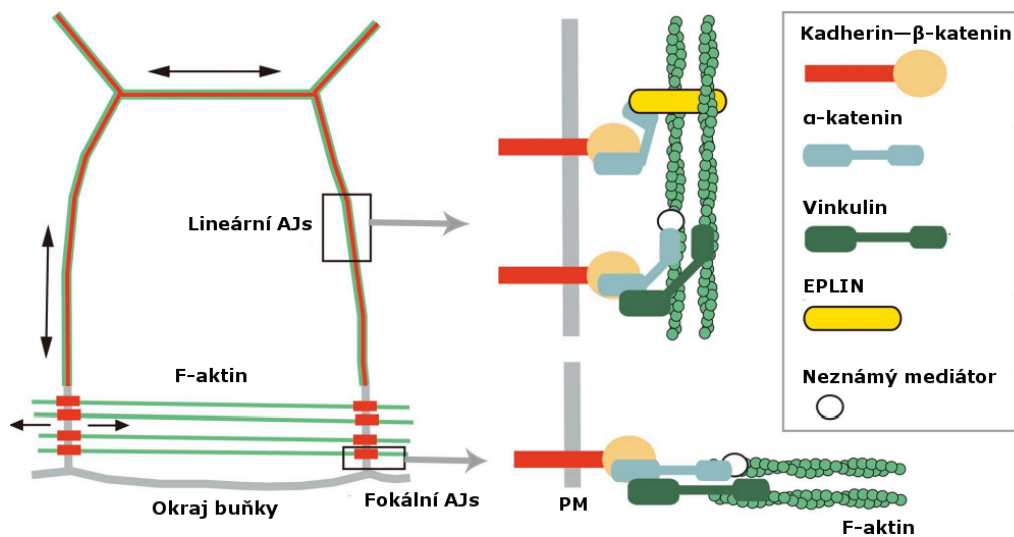
Protein α -aktinin má mechanosenzitivní vlastnosti, u kterých lze pozorovat určitou podobnost s vlastnostmi vinkulinu. Stejně jako vinkulin je α -aktinin lokalizován do AJ až za působení tažných sil. V tomto případě je však za translokaci α -aktininu zodpovědný jiný protein než α -katenin, nebo β -katenin jako tomu bylo u vinkulinu. Jde o synaptopodin, který dokáže vytvářet komplex α -kateninu, β -kateninu a myosinu II, pomocí kterého navede α -aktinin do správného místa AJ. Nejprve je tedy do kadherin-kateninového komplexu, na který působí síly zařazen synaptopodin. Teprve poté může nasedat na vzniklý komplex α -aktinin (Kannan a Tang, 2015), který je vlivem tenze natahován. Oddálením spektrinových repetitiv v rámci centrální části proteinu je odhaleno VBS. Tento proces pak napomáhá cílení vinkulinu do AJ, čímž dochází k jejich stabilizaci (Le *et al.*, 2017).

Proteiny α -aktinin a vinkulin dokáží vázat aktinový cytoskelet, ovšem každý z těchto proteinů má opačný vliv na jeho remodelaci. Molekuly α -aktininu propojují jednotlivá aktinová vlákna a vedou je do podoby viskózních sítí, zatímco vinkulin podporuje spojování filament a vznik rigidních aktinových svazků (Jockusch a Isenberg, 1981).

2.2.4 EPLIN

Dalším důležitým aktin-vazebným partnerem mechanosenzorického komplexu je EPLIN, někdy také nazýván LIMA-1. Označení LIMA-1 poukazuje na přítomnost LIM domény společně s aktin vazebnou doménou 1 ve struktuře tohoto proteinu (Maul a Chang, 1999). LIM domény umožňují všem proteinům, které je obsahují vytvářet protein-proteinové interakce a tím řídit aktivitu jejich vazebných partnerů (Schmeichel a Beckerle, 1994). Mezi takové interaktory se řadí i mnoho transkripčních faktorů, které se mohou podílet na procesech jako je buněčná diferenciace (Osada *et al.*, 1995).

EPLIN v rámci AJ interaguje s α -kateninem, který je součástí kadherin-kateninového komplexu. Oba tyto proteiny společně provazují komplex s aktinovým cytoskeletem a zajišťují mechanosenzing, který řídí přestavbu mezibuněčných spojů během působení sil. Funkční komplex kadherin-katenin-EPLIN je však prezentován pouze v lineárních AJ, kde se nevyskytují periferní aktinová vlákna. U jiných forem AJ je EPLIN v komplexu nahrazen vinkulinem. Oba typy komplexů navzájem spolupracují v procesech, které vedou různé formy AJ k maturaci končící na úrovni vzniku zonulárních adhezí. Během působení mechanické tenze získává α -katenin svou otevřenou konformaci, EPLIN postupně opouští komplex a je nahrazen vinkulinem (viz. Obrázek 14). Mezibuněčný spoj přechází do jiné morfologické formy, ve které se vyskytují periferní aktinová vlákna a buňka je pak schopna měnit svůj tvar (Taguchi *et al.*, 2011).



Obrázek 14: Asociace aktinového cytoskeletu s mechanosenzorickým komplexem pomocí proteinů EPLIN a vinkulin – šipky označují směr působení sil; PM - plazmatická membrána; EPLIN je asociován s α -kateninem v uzavřené konformaci v lineárních AJ. Vinkulin se váže na α -katenin pouze v jeho otevřené konformaci jak v lineárních AJ, tak ve fokálních AJ. Ve fokálních AJ jsou prezentována periferní aktinová vlákna směřující rovnoběžně k mezibuněčnému spoji. (převzato a upraveno Taguchi *et al.* (2011)).

Další funkce, kterou EPLIN zajišťuje v AJ je spojena s jeho schopností řídit přestavby aktinového cytoskeletu. EPLIN ve své struktuře obsahuje hned dvě vazebná místa pro aktinová filamenta, díky čemuž je schopný propojovat více vláken dohromady. Dále dokáže interagovat s komplexem Arp-2/3, pomocí kterého inhibuje polymerizaci a větvení aktinového cytoskeletu tím, že prodlužuje interval nukleace. V neposlední řadě se EPLIN podílí také na stabilizaci aktinu a zabránění jeho depolymerizaci (Maul *et al.*, 2003). Všechny tyto vlastnosti proteinu EPLIN jsou využívány při sestavování aktinového prstence, který určuje apikobazální polarizaci epiteliálních a endoteliálních buněk (Abe a Takeichi, 2008).

Z výčtu všech zmíněných funkcí proteinu EPLIN je zřejmé, že při narušení jeho exprese, nebo jeho vlastností dochází k částečné ztrátě kontroly nad remodelací aktinových vláken. Za nízké koncentrace proteinu EPLIN v buňce může být iniciována dráha vedoucí k epiteliálně-mezenchymální tranzici (Zhang *et al.*, 2011). Ta je u nádorových buněk doprovázena přechodem do invazivního fenotypu, který podporuje vznik metastáz (Maul *et al.*, 2003). Celková hladina exprese proteinu EPLIN je u většiny epiteliálních nádorových onemocnění (jako je rakovina prsu a prostaty) snížena, nebo kompletně potlačena. Naopak, při nadměrné syntéze tohoto proteinu je inhibován růst nádoru, z čehož vyplývá, že EPLIN patří mezi nádorové supresory (Maul a Chang, 1999).

2.2.5 Afadin

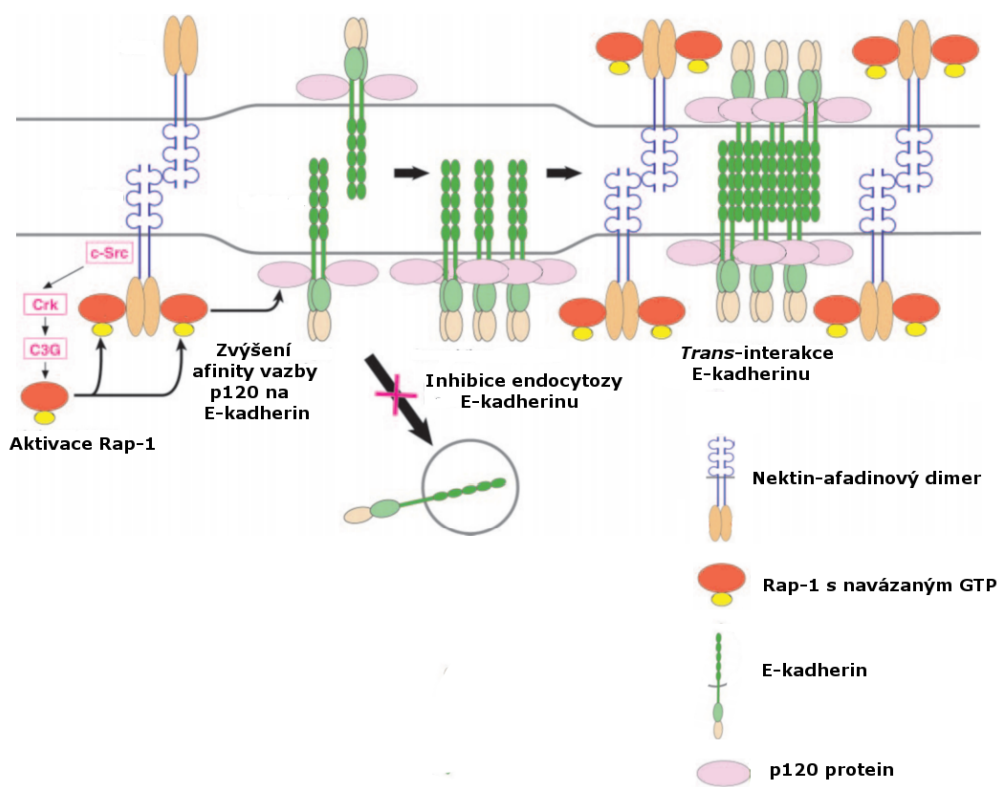
Posledním zde zmíněným vazebným partnerem mechanosenzorického komplexu je protein afadin. Afadin patří stejně jako vinkulin, α -aktinin, nebo EPLIN mezi aktin vazebné proteiny. Pro tyto účely má na svém C-konci konzervované aktin vazebné místo. Jednou z nejdůležitějších struktur udávající afadinu jeho vlastnosti je PDZ doména (Mandai *et al.*, 1997). Tato doména umožňuje afadinu nasedat na nektin – transmembránový protein, který tuto interakci zprostředkovává přes svou cytoplazmatickou část molekuly. Společně vytváří nektin-afadinový komplex napomáhající sestavení dalších mezibuněčných spojů na místě iniciačních kontaktů buněk (Takahashi *et al.*, 1999).

Afadin tedy slouží v rámci komplexu k propojení transmembránového nektinu s aktinovým cytoskeletem, podobně jako α -katenin ukotvuje kadherin-kateninový komplex k aktinovým filamentům. Tyto dva komplexy založené na jiném proteinovém základu mohou být vzájemně propojené a to právě přes afadin a α -katenin. Afadin se ale dokáže navázat na α -katenin pouze v jeho otevřené konformaci z čehož vyplývá, že k propojení obou komplexů dochází teprve za působení mechanické síly (Pokutta *et al.*, 2002). Tímto způsobem je naveden kadherin-kateninový komplex do iniciačních kontaktů dvou buněk, kde koexistuje a spolupracuje s nektin-afadinovým komplexem (viz. Obrázek 9).

Afadin se společně s nektinem objevuje v epiteliálních a endoteliálních buňkách, kde hraje klíčovou roli v udržení integrity tkání během časně embryogeneze (Ikeda *et al.*, 1999). Exprese a interakce obou těchto proteinů byla pozorována také ve fibroblastech (Honda *et al.*, 2003). První mezibuněčné kontakty mezi buňkami jsou tvořeny spoji založenými na nektin-afadinovém komplexu. Tento typ iniciačního spoje nadále pomáhá vytvářet maturované AJ a těsné spoje poskytující buňkám další vlastnosti, které by samotný nektin-afadinový komplex nebyl schopen zajistit (Sakakibara *et al.*, 2018). Afadin, který může být součástí všech těchto spojů a ovlivňuje mnoho procesů spojených s jejich vznikem, maturací a udržením stability, nemá sám o sobě tolik aktivit. Jeho hlavní funkcí například v zonulárních adhezích je sloužit jako "lešení" pro nasedání efektorových proteinů. Afadin tedy lze označit jako adaptorový protein. Teprve společně s navázanými efekty dokáže například aktivně měnit tvar buněk během přechodu z bicelulárního propojení na trichelulární, nebo multichelulární kontakty (W. Choi *et al.*, 2016).

Dalším procesem, kde se afadin uplatňuje jako adaptorový protein a který je důležitý pro vznik a stabilizaci AJ je inhibice endocytózy E-kadherinu (viz. Obrázek 15). Kadherin, který nevytváří *trans*-interakce s dalším kadherinem na sousední buňce není stabilní a je veden do endocytózy (Izumi *et al.*, 2004). Pokud je však asociován s nektin-afadinovým komplexem,

dochází k pozastavení tohoto procesu a kadherin tak získává čas pro vytvoření homotypické interakce. Pro iniciaci dráhy vedoucí k inhibici endocytózy je ale potřeba, aby nektin vytvářel *trans*-interakci v rámci kontaktu buněk. Teprve tehdy dochází k aktivaci Rap-1 proteinu pomocí cytoplazmatické domény nektinu, což umožňuje vazbu Rap-1 na afadin. Tato interakce je klíčová pro následné vytvoření trimerního komplexu Rap-1-afadin-p120. Jakmile se protein p120 stane součástí tohoto komplexu, zvyšuje se jeho afinita k cytoplazmatické doméně E-kadherinu. Pomocí kontaktu p120 s E-kadherinem je zvýšena stabilita lokalizace E-kadherinu na plazmatické membráně, který poté může vytvářet *trans*-interakce a tím zajistit základní funkce AJ (Hoshino *et al.*, 2005).



Obrázek 15: Dráha inhibice endocytózy E-kadherinu pomocí aktivace Rap-1 – *Trans*-interagující nektinový dimer nepřímě aktivuje Rap-1 přes svou cytoplazmatickou doménu. Aktivovaný Rap-1 interaguje s afadinem, který je součástí nektin-afadinového komplexu. Rap-1 a afadin zvyšují afinitu proteinu p120 k E-kadherinu, čímž stabilizují jeho lokalizaci na plazmatické membráně. Tím je inhibována endocytóza E-kadherinu a ten poté může vytvářet *trans*-interakce. (převzato a upraveno Hoshino *et al.* (2005)).

3 Vliv mechanosenzorického komplexu na integritu tkání

Tkáně tvořící těla mnohobuněčných organizmů se navzájem liší svým vývojovým původem, lokalizací i funkcí. Na každou z nich působí jiné podněty jako jsou mechanické síly, na které je nutné reagovat patřičným způsobem. K tomuto účelu slouží tkáňově specifické odpovědi, které jsou vykonávány jednotlivými buňkami pomocí konkrétního buněčného programu. Hranice mezi odlišnými tkáněmi, které vymezují pole působnosti tkáňově specifických odpovědí jsou nastaveny již na začátku embryogeneze. Tím je také nastolena integrita jednotlivých buněčných souborů, která je důležitá pro správné fungování tkání. Organismus se ale neustále vyvíjí a jeho tělo je remodelováno, což má vliv i na posouvání původních a vznik nových hranic mezi tkáněmi. Pro udržení integrity i za těchto dynamických podmínek jsou využívány procesy jako jsou buněčná proliferace, migrace a diferenciaci na jejichž správném průběhu se významnou mírou podílí také komponenty AJ. Ty pomocí detekce změn působících sil řídí remodelaci tkání.

3.1 Embryogeneze

Na počátku embryogeneze se zakládají první shluky soudržných nediferencovaných buněk, ze kterých se postupně vyvíjejí a oddělují více diferencované a specializované tkáně dávající vznik jednotlivým orgánům. Tento vývoj je doprovázen neustálou remodelací buněčných tvarů a mezibuněčného propojení stejně jako jejich adhezí k ECM, což je spojeno se změnami směru a intenzity působících sil. Pro správný průběh embryogeneze je však klíčové, aby byla udržena integrita tkání, která byla ustanovena už u prvních funkčních souborů buněk. Právě integrita vymezuje hranice působnosti tkáňově specifických odpovědí, a tudíž má nepostradatelný vliv na jejich funkci. Všechny buňky v rámci jednoho funkčního celku vykonávají určitý program, který je realizován jednotlivými buněčnými procesy. Tyto procesy mají za úkol reagovat na změny v okolním prostředí tak, aby nenarušily integritu tkáně. Mechanosignalizační funkce AJ, odpovídající právě na změny v působení sil a spouštějící mechanotransdukční dráhy, hrají v realizaci buněčného programu velmi důležitou roli.

Jedním z důležitých mechanosenzorů, který se podílí na udržení integrity tkání během časného embryonálního vývoje je afadin. Tento protein má nepostradatelnou úlohu hlavně v remodelaci embryonálního ektodermu při organizování takových vývojových struktur jako je primitivní proužek a neurální rýha. Během tohoto přestavování epitelu, afadin řídí aktivní stavy nektinu a tím přispívá ke správnému seskupení mezibuněčných spojů (Ikeda *et al.*, 1999).

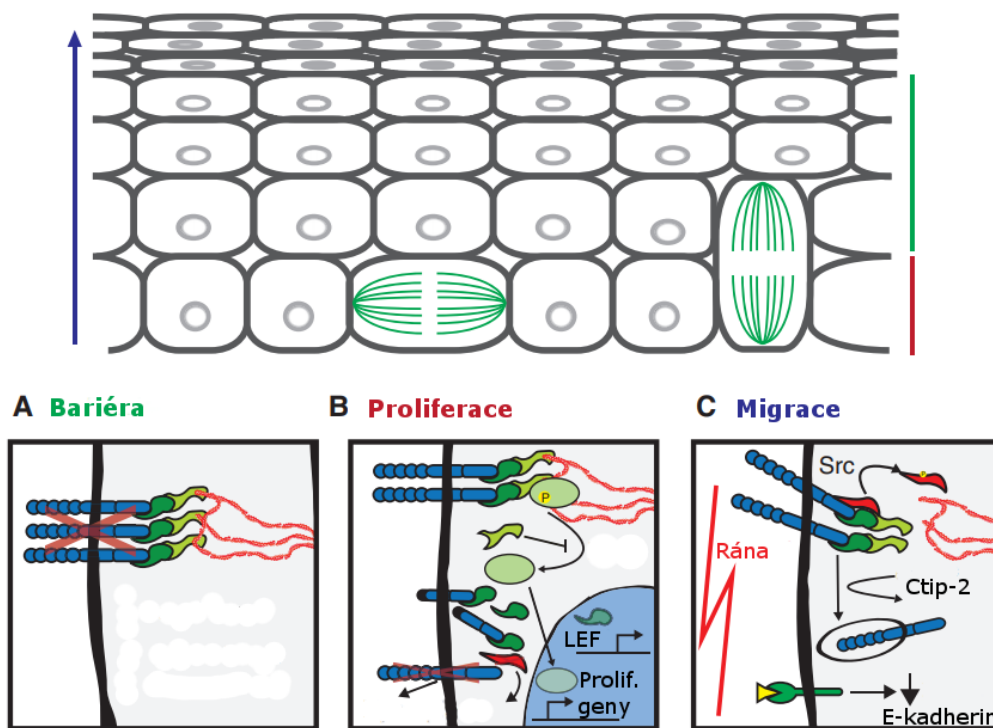
Mezi hlavní děje, kterými buňky během embryogeneze intenzivně prochází, jsou proliferace

a diferenciace. Na obou těchto buněčných procesech se podílí například Wnt kaskáda, s níž je spojen mechanosenzor β -katenin (de Boer *et al.*, 2004). Pokud je potřeba zahájit proliferaci, nebo diferenciaci buněk, je nejprve nutné aktivovat tyrozinové kinázy, které naruší vazby v kadherin-kateninovém komplexu a tím se zvyšuje koncentrace volného cytoplazmatického β -kateninu. Po aktivaci Wnt signalizace se na β -katenin váží Tcf s jejichž pomocí je β -katenin naveden do jádra, kde společně iniciují transkripci příslušných genů.

3.2 Regenerace tkání

Během embryogeneze byla vytvořena tkáň s vlastní integritou, která byla udržována po celou dobu vývoje. Ovšem integrita tkání může být narušena i u plně vyvinutých funkčních buněčných souborů a to například v důsledku poranění, nebo vlivem působení patogenů. V takových případech dochází mimo jiné k přerušení mezibuněčných spojů jako jsou právě AJ, které nadále nejsou schopny zajistit propojení aktinového cytoskeletu, což se odráží na změně intenzity tažných sil působících na okolní buňky. Ty jsou však schopny na tyto případy reagovat. V rámci specifického buněčného programu, pomocí kterého se jednotlivé buňky v rámci tkáně chovají jako jeden celek, jsou vykonávány děje, vedoucí k doplnění zasažených buněk, obnově AJ a tím i k celkové obnově integrity.

Častým místem zásahu mechanického poranění bývá epidermis tvořící pokožku živočichů. Jde o mnohvrstevnou tkáň složenou převážně z keratinocytů, které jsou v případě poškození doplňovány proliferací prekurzorů v bazální části tkáně (viz. Obrázek 16). Iniciace buněčného dělení a následných procesů je řízena změnami v mechanosenzorických podnětech detekovaných buňkami v blízkosti vzniklé rány (Liang *et al.*, 2016). Buněčné prekurzory poté přechází do vyšších vrstev epidermis, kde postupně diferencují. Kromě proliferace a diferenciace je tedy dalším důležitým aspektem regenerace tkáně také migrace buněk do místa poranění. V takovém případě není žádoucí, aby keratinocyt adheroval k ostatním buňkám. Přílnavost doplňovaných buněk je během regenerace omezena vlivem striktně kontrolovaného snížení exprese CAM, mezi které patří také E-kadheriny (Kuwahara *et al.*, 2001). Jakmile je buňka lokalizována na požadovaném místě, opět spouští expresi CAM, což vede k vytvoření nových mezibuněčných spojů a tím je přichodící keratinocyt zařazen do sociálního kontextu tkáně. Pomocí tohoto procesu dochází k uzavírání rány a obnově integrity epidermis.



Obrázek 16: Mechanismus hojení ran v epidermis pomocí mechanorecepce přes adhezivní spoje – horní část obrázku - vrstvy epidermis; v bazální části jsou dělicí se prekurzory keratinocytů; modrá šipka - směr, kterým je vedena migrace keratinocytů a jejich prekurzorů v epidermis; zelená čára - místo, kde keratinocyty tvoří bariéru mezi bazální částí epidermis a *stratum corneum*; červená čára - místo, kde dochází k intenzivní proliferaci prekurzorů keratinocytů; dolní část obrázku - podoba adhezivních spojů během narušení bariéry (A), proliferace (B) a migrace buněk (C); Při poranění dojde k narušení AJ mezi buňkami tvořící bariéru. Signál je předáván mechanicky přes propojený aktinový cytoskelet až do bazálních prekurzorů keratinocytů. Cytoplazmatický β -katenin je lokalizován do jádra, kde spouští geny zodpovědné za buněčnou proliferaci. Buňky migrující do místa rány destabilizují E-kadherin vystavený na plazmatické membráně pomocí Src tyrosinové fosforylace proteinu p120. E-kadherin je veden do endocytózy a exprese nového E-kadherinu je omezena, čímž buňky ztrácí adhezivní vlastnosti. (převzato a upraveno Garcia *et al.* (2018)).

3.3 Nádorová transformace a invazivita nádorových buněk

Během života mnohobuněčného organismu může nastat situace, kdy některé buňky nevratně ztrácí schopnost vykonávat příslušný buněčný program a tím přestávají sloužit v tkáni tak, aby byla udržována její integrita. Tyto defekty jsou podmíněné hromaděním mutací v genetické informaci, což je doprovázeno narušením exprese důležitých genů. Takové buňky poté mohou vstoupit do dráhy nádorové transformace a podílet se na vzniku a vývoji nádorových onemocnění. Mezi mutacemi postižené geny se často řadí i ty, kódující syntézu komponentů AJ (O. Huber *et al.*, 1997), čímž mohou být narušeny procesy jako jsou proliferace, diferenciace, adhezivita a migrace, jejichž správné fungování je klíčové pro udržování integrity tkání.

Nádorové buňky jsou často spojovány s vysokou intenzitou proliferace. Jejich krátký interval mezi každým buněčným dělením je dán mimo jiné i patologií ve funkcích AJ. Ty se totiž podílí na regulaci Wnt kaskády, čímž udržují správnou míru proliferace. Právě mutace v genech pro komponenty AJ, které jsou součástí také Wnt kaskády jsou velmi často spojovány s vývojem kolorektálních nádorů. V 80 % případů tohoto onemocnění se mutace objevují v genu pro APC (Powell *et al.*, 1992). Protein APC je poté sice exprimován, ale s pozměněným vazebným místem pro β -katenin. V tomto případě nedochází k interakci mezi těmito proteiny, která je důležitá pro sestavení komplexu cílící volný β -katenin do degradační dráhy (Rubinfeld *et al.*, 1997). Volný β -katenin se postupně hromadí v cytoplazmě, odkud může být lokalizován do jádra a spouštět expresi proliferačních genů. U zbylých 20 % případů kolorektálních nádorů, mutace postihují přímo geny pro β -katenin, jejichž výsledný produkt je poté odolný vůči působení kináz CKII a GSK-3 β (Morin *et al.*, 1997). Ačkoliv se mutace týká jiného proteinu, výsledkem je opět inhibice sestavení degradačního komplexu a nadměrná buněčná proliferace

U nádorových onemocnění jako jsou rakovina prsu a prostaty je velmi často pozorován invazivní fenotyp buněk patologické tkáně. Během jejich karcinogeneze dochází ke snížení exprese proteinu p120, který za běžných podmínek stabilizuje lokalizaci E-kadherinu na plazmatické membráně, čímž napomáhá udržení mezibuněčného kontaktu. Na invazivním fenotypu se dále podílí snížená, nebo úplně inhibovaná syntéza proteinu EPLIN. Při jeho nízké hladině exprese jsou buňky vedeny do dráhy epiteliálně-mezenchymální tranzice, která podporuje mobilitu buněk a šíření metastáz.

4 Závěr

Na organizaci a vlastnosti mezibuněčných kontaktů mají významný vliv AJ. Mechanosenzorický komplex, který je společný pro všechny AJ a je dostatečný pro zajištění základních mechanosenzorických funkcí je složen z kadherinu, β -kateninu a α -kateninu. Celý hypotetický mechanismus tohoto komplexu je založen na vytvoření *trans*-interakce mezi sousedními buňkami pomocí kadherinů a vzájemném propojení jejich aktinových cytoskeletů přes α -katenin. Ovšem poslední studie poukazují na fakt, že α -katenin není schopný současně interagovat s β -kateninem a aktinovými filamenti. Minimální kadherin-kateninový komplex tedy ve skutečnosti není dostatečný pro zajištění mechanosenzingu AJ. Současné výzkumy jsou zaměřené na další vazebné partnery α -kateninu, kteří se ukázali být klíčoví nejen pro ukotvení spojů k aktinovému cytoskeletu, ale také pro rozšíření škály mechanosenzitivních odpovědí buňky na působící síly.

Ve formě minimálního kadherin-kateninového komplexu se AJ vyskytují v iniciačních kontaktech buněk, na které nepůsobí žádné, nebo jen velmi malé tažné síly. Jakmile jsou však mezibuněčné spoje vystaveny dostatečně velké tenzi, je zahájena jejich maturace. Postupně jsou aktivovány konkrétní serin/threoninové kinázy, které svou aktivitou stabilizují spoje kadherin-kateninového komplexu a iniciují vznik nových komplexů. Ty se mohou postupně shlukovat a vytvořit tak silné mezibuněčné spoje. Při působení tenze je také převeden α -katenin ze své autoinhibiční konformace do otevřené formy, ve které je schopný interagovat s dalšími vazebnými partnery. Mezi ně patří například EPLIN, vinkulin a α -aktinin, kteří zprostředkují ukotvení α -kateninu a tím i celých AJ k aktinovému cytoskeletu. Během maturace tedy dochází ke zpevnění AJ a jejich ukotvení k aktinovým filamentům, díky čemuž jsou umožněny mechanosenzitivní změny morfologie buněk.

Pokud však buňky z nějakého důvodu nejsou schopné vnímat působící síly, nedochází k maturaci AJ. V takové situaci mohou být aktivovány tyrozinové kinázy, které naopak destabilizují vazby v minimálním kadherin-kateninovém komplexu. Tím se zvyšuje koncentrace volného β -kateninu v cytoplazmě, který se může zapojit do Wnt kaskády jako kotranskripční faktor a ovlivnit tak expresi genů vedoucích k buněčné proliferaci a diferenciaci. Tyto procesy se ve velké míře uplatňují například při embryogenezi, regeneraci a nádorové transformaci, pro které jsou společné změny v integritě tkání, nebo dokonce jejího narušení.

Pro popsání procesů stojících za defekty prenatálního vývoje, omezeným hojením ran a vznikem nádorových onemocnění je nutné nejprve zcela pochopit roli mechanosenzingu AJ v udržení integrity tkání. Tyto informace mají velký potenciál pro budoucí vývoj účinného boje proti zmíněným patologiím.

Seznam použité literatury

Přehledné články a učebnice označeny na konci citace jako **review** a **učebnice**.

1. K. Abe, M. Takeichi, EPLIN Mediates Linkage of the Cadherin–Catenin Complex to F-Actin and Stabilizes the Circumferential Actin Belt. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 13–19, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (led. 2008).
2. H. Aberle *et al.*, Assembly of the Cadherin-Catenin Complex in Vitro with Recombinant Proteins. en, *Journal of Cell Science* **107**, 3655–3663, ISSN: 0021-9533, 1477-9137 (pros. 1994).
3. C. L. Adams, Y.-T. Chen, S. J. Smith, W. James Nelson, Mechanisms of Epithelial Cell–Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-Resolution Tracking of E-Cadherin–Green Fluorescent Protein. *Journal of Cell Biology* **142**, 1105–1119, ISSN: 0021-9525 (srp. 1998).
4. B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, Anglicky (W. W. Norton & Company, New York, NY, 6. vydání, lis. 2014), ISBN: 978-0-8153-4524-4, **učebnice**.
5. A. Angulo-Urarte, T. van der Wal, S. Huveneers, Cell-Cell Junctions as Sensors and Transducers of Mechanical Forces. en, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1862**, 183316, ISSN: 00052736 (zář. 2020), **review**.
6. C. Bakolitsa *et al.*, Structural Basis for Vinculin Activation at Sites of Cell Adhesion. en, *Nature* **430**, 583–586, ISSN: 1476-4687 (čvc 2004).
7. A. J. Banes *et al.*, Mechanoreception at the Cellular Level: The Detection, Interpretation, and Diversity of Responses to Mechanical Signals. eng, *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* **73**, 349–365, ISSN: 0829-8211 (1995).
8. M. D. Baron, M. D. Davison, P. Jones, D. R. Critchley, The Sequence of Chick Alpha-Actinin Reveals Homologies to Spectrin and Calmodulin. en, *Journal of Biological Chemistry* **262**, 17623–17629, ISSN: 0021-9258 (pros. 1987).
9. W. Baumgartner *et al.*, Cadherin Interaction Probed by Atomic Force Microscopy. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4005–4010, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (dub. 2000).
10. S. Bek, R. Kemler, Protein Kinase CKII Regulates the Interaction of β -Catenin With α -Catenin and Its Protein Stability. en, *Journal of Cell Science* **115**, 4743–4753, ISSN: 0021-9533, 1477-9137 (pros. 2002).
11. K. H. Biswas, K. L. Hartman, R. Zaidel-Bar, J. T. Groves, Sustained α -Catenin Activation at E-Cadherin Junctions in the Absence of Mechanical Force. en, *Biophysical Journal* **111**, 1044–1052, ISSN: 0006-3495 (zář. 2016).
12. T. J. Boggon *et al.*, C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms. en, *Science* **296**, 1308–1313, ISSN: 0036-8075, 1095-9203 (květ. 2002).
13. F. H. Brembeck *et al.*, Essential Role of BCL9-2 in the Switch between β -Catenin's Adhesive and Transcriptional Functions. en, *Genes & Development* **18**, 2225–2230, ISSN: 0890-9369, 1549-5477 (zář. 2004).
14. C. D. Buckley *et al.*, Cell Adhesion. The Minimal Cadherin-Catenin Complex Binds to Actin Filaments under Force. eng, *Science (New York, N.Y.)* **346**, 1254211, ISSN: 1095-9203 (říj. 2014).
15. K. Burridge, P. Mangeat, An Interaction between Vinculin and Talin. en, *Nature* **308**, 744–746, ISSN: 1476-4687 (dub. 1984).
16. C. A. Cartwright, M. P. Kamps, A. I. Meisler, J. M. Pipas, W. Eckhart, Pp60c-Src Activation in Human Colon Carcinoma. en, *The Journal of Clinical Investigation* **83**, 2025–2033, ISSN: 0021-9738 (červ. 1989).
17. D. E. Conway *et al.*, Fluid Shear Stress on Endothelial Cells Modulates Mechanical Tension across VE-Cadherin and PECAM-1. en, *Current Biology* **23**, 1024–1030, ISSN: 0960-9822 (červ. 2013).
18. J. M. Daniel, A. B. Reynolds, The Tyrosine Kinase Substrate P120cas Binds Directly to E-Cadherin but Not to the Adenomatous Polyposis Coli Protein or Alpha-Catenin. en, *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4819–4824, ISSN: 0270-7306, 1098-5549 (zář. 1995).
19. J. de Boer, H. J. Wang, C. van Blitterswijk, Effects of Wnt Signaling on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering* **10**, 393–401, ISSN: 1076-3279 (břez. 2004).

20. K. A. DeMali, C. A. Barlow, K. Burridge, Recruitment of the Arp2/3 Complex to Vinculin : Coupling Membrane Protrusion to Matrix Adhesion. *Journal of Cell Biology* **159**, 881–891, ISSN: 0021-9525 (pros. 2002).
21. F. Drees, S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson, W. I. Weis, α -Catenin Is a Molecular Switch That Binds E-Cadherin- β -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. en, *Cell* **123**, 903–915, ISSN: 0092-8674 (pros. 2005).
22. J. C. Effer *et al.*, Mitosis-Specific Mechanosensing and Contractile-Protein Redistribution Control Cell Shape. en, *Current Biology* **16**, 1962–1967, ISSN: 0960-9822 (říj. 2006).
23. A. Ferber, C. Yaen, E. Sarmiento, J. Martinez, An Octapeptide in the Juxtamembrane Domain of VE-Cadherin Is Important for P120ctn Binding and Cell Proliferation. eng, *Experimental Cell Research* **274**, 35–44, ISSN: 0014-4827 (břez. 2002).
24. T. Fevr, S. Robine, D. Louvard, J. Huelsken, Wnt/ β -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. en, *Molecular and Cellular Biology* **27**, 7551–7559, ISSN: 0270-7306, 1098-5549 (lis. 2007).
25. J. T. Finer, R. M. Simmons, J. A. Spudich, Single Myosin Molecule Mechanics: Piconewton Forces and Nanometre Steps. en, *Nature* **368**, 113–119, ISSN: 1476-4687 (břez. 1994).
26. Y. Fukumoto, Y. Shintani, A. B. Reynolds, K. R. Johnson, M. J. Wheelock, The Regulatory or Phosphorylation Domain of P120 Catenin Controls E-Cadherin Dynamics at the Plasma Membrane. en, *Experimental Cell Research* **314**, 52–67, ISSN: 0014-4827 (led. 2008).
27. M. A. Garcia, W. J. Nelson, N. Chavez, Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. en, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **10**, a029181, ISSN: , 1943-0264 (led. 2018), **review**.
28. B. Geiger, A 130K Protein from Chicken Gizzard: Its Localization at the Termini of Microfilament Bundles in Cultured Chicken Cells. en, *Cell* **18**, 193–205, ISSN: 0092-8674 (zář. 1979).
29. J. Golji, J. Lam, M. R. K. Mofrad, Vinculin Activation Is Necessary for Complete Talin Binding. en, *Biophysical Journal* **100**, 332–340, ISSN: 0006-3495 (led. 2011).
30. M. A. Gonzalez *et al.*, An Immunohistochemical Examination of the Expression of E-Cadherin, α - and β/γ -Catenins, and A2- and B1-Integrins in Invasive Breast Cancer. en, *The Journal of Pathology* **187**, 523–529, ISSN: 1096-9896 (1999).
31. B. Gumbiner, B. Stevenson, A. Grimaldi, The Role of the Cell Adhesion Molecule Uvomorulin in the Formation and Maintenance of the Epithelial Junctional Complex. *Journal of Cell Biology* **107**, 1575–1587, ISSN: 0021-9525 (říj. 1988).
32. M. L. Hermiston, M. H. Wong, J. I. Gordon, Forced Expression of E-Cadherin in the Mouse Intestinal Epithelium Slows Cell Migration and Provides Evidence for Nonautonomous Regulation of Cell Fate in a Self-Renewing System. en, *Genes & Development* **10**, 985–996, ISSN: 0890-9369, 1549-5477 (dub. 1996).
33. K. Herrenknecht *et al.*, The Uvomorulin-Anchorage Protein Alpha Catenin Is a Vinculin Homologue. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 9156–9160, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (říj. 1991).
34. L. Hinck, I. S. Näthke, J. Papkoff, W. J. Nelson, Dynamics of Cadherin/Catenin Complex Formation: Novel Protein Interactions and Pathways of Complex Assembly. *Journal of Cell Biology* **125**, 1327–1340, ISSN: 0021-9525 (červ. 1994).
35. S. Hirano, N. Kimoto, Y. Shimoyama, S. Hirohashi, M. Takeichi, Identification of a Neural α -Catenin as a Key Regulator of Cadherin Function and Multicellular Organization. en, *Cell* **70**, 293–301, ISSN: 0092-8674 (čvc 1992).
36. T. Honda *et al.*, Antagonistic and Agonistic Effects of an Extracellular Fragment of Nectin on Formation of E-Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion. en, *Genes to Cells* **8**, 51–63, ISSN: 1365-2443 (2003).
37. T. Hoshino *et al.*, Regulation of E-Cadherin Endocytosis by Nectin through Afadin, Rap1, and P120ctn*. en, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 24095–24103, ISSN: 0021-9258 (červ. 2005).
38. A. H. Huber, W. J. Nelson, W. I. Weis, Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin. en, *Cell* **90**, 871–882, ISSN: 0092-8674 (zář. 1997).

39. O. Huber, M. Krohn, R. Kemler, A Specific Domain in Alpha-Catenin Mediates Binding to Beta-Catenin or Plakoglobin. en, *Journal of Cell Science* **110**, 1759–1765, ISSN: 0021-9533, 1477-9137 (srp. 1997).
40. J. Hülsken, W. Birchmeier, J. Behrens, E-Cadherin and APC Compete for the Interaction with Beta-Catenin and the Cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* **127**, 2061–2069, ISSN: 0021-9525 (pros. 1994).
41. Y.-T. Chen, D. B. Stewart, W. J. Nelson, Coupling Assembly of the E-Cadherin/ β -Catenin Complex to Efficient Endoplasmic Reticulum Exit and Basal-Lateral Membrane Targeting of E-Cadherin in Polarized MDCK Cells. *Journal of Cell Biology* **144**, 687–699, ISSN: 0021-9525 (ún. 1999).
42. N. A. Chitaev, S. M. Troyanovsky, Direct Ca²⁺-Dependent Heterophilic Interaction between Desmosomal Cadherins, Desmoglein and Desmocollin, Contributes to Cell–Cell Adhesion. *Journal of Cell Biology* **138**, 193–201, ISSN: 0021-9525 (čvc 1997).
43. H.-J. Choi *et al.*, α E-Catenin Is an Autoinhibited Molecule That Coactivates Vinculin. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8576–8581, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (květ. 2012).
44. W. Choi *et al.*, Remodeling the Zonula Adherens in Response to Tension and the Role of Afadin in This Response. *Journal of Cell Biology* **213**, 243–260, ISSN: 0021-9525 (dub. 2016).
45. W. Ikeda *et al.*, Afadin: A Key Molecule Essential for Structural Organization of Cell–Cell Junctions of Polarized Epithelia during Embryogenesis. *Journal of Cell Biology* **146**, 1117–1132, ISSN: 0021-9525 (zář. 1999).
46. R. C. Ireton *et al.*, A Novel Role for P120 Catenin in E-Cadherin Function. *Journal of Cell Biology* **159**, 465–476, ISSN: 0021-9525 (lis. 2002).
47. N. Ishiyama *et al.*, Force-Dependent Allostery of the α -Catenin Actin-Binding Domain Controls Adherens Junction Dynamics and Functions. en, *Nature Communications* **9**, 5121, ISSN: 2041-1723 (lis. 2018).
48. G. Izumi *et al.*, Endocytosis of E-Cadherin Regulated by Rac and Cdc42 Small G Proteins through IQGAP1 and Actin Filaments. en, *Journal of Cell Biology* **166**, 237–248, ISSN: 0021-9525 (čvc 2004).
49. M. E. W. Janssen *et al.*, Three-Dimensional Structure of Vinculin Bound to Actin Filaments. en, *Molecular Cell* **21**, 271–281, ISSN: 1097-2765 (led. 2006).
50. B. M. Jockusch, G. Isenberg, Interaction of Alpha-Actinin and Vinculin with Actin: Opposite Effects on Filament Network Formation. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 3005–3009, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (květ. 1981).
51. R. P. Johnson, S. W. Craig, An Intramolecular Association between the Head and Tail Domains of Vinculin Modulates Talin Binding. en, *Journal of Biological Chemistry* **269**, 12611–12619, ISSN: 0021-9258 (dub. 1994).
52. N. Kannan, V. W. Tang, Synaptopodin Couples Epithelial Contractility to α -Actinin-4–Dependent Junction Maturation. *Journal of Cell Biology* **211**, 407–434, ISSN: 0021-9525 (říj. 2015).
53. T.-J. Kim *et al.*, Dynamic Visualization of α -Catenin Reveals Rapid, Reversible Conformation Switching between Tension States. en, *Current Biology* **25**, 218–224, ISSN: 0960-9822 (led. 2015).
54. K. A. Knudsen, A. P. Soler, K. R. Johnson, M. J. Wheelock, Interaction of Alpha-Actinin with the Cadherin/Catenin Cell-Cell Adhesion Complex via Alpha-Catenin. *Journal of Cell Biology* **130**, 67–77, ISSN: 0021-9525 (čvc 1995).
55. K. A. Knudsen, M. J. Wheelock, Plakoglobin, or an 83-kD Homologue Distinct from Beta-Catenin, Interacts with E-Cadherin and N-Cadherin. *Journal of Cell Biology* **118**, 671–679, ISSN: 0021-9525 (srp. 1992).
56. A. Kobiela, H. A. Pasolli, E. Fuchs, Mammalian Formin-1 Participates in Adherens Junctions and Polymerization of Linear Actin Cables. en, *Nature Cell Biology* **6**, 21–30, ISSN: 1476-4679 (led. 2004).
57. V. Korinek *et al.*, Two Members of the Tcf Family Implicated in Wnt/ β -Catenin Signaling during Embryogenesis in the Mouse. en, *Molecular and Cellular Biology* **18**, 1248–1256, ISSN: 0270-7306, 1098-5549 (břez. 1998).

58. E. R. Koslov, P. Maupin, D. Pradhan, J. S. Morrow, D. L. Rimm, α -Catenin Can Form Asymmetric Homodimeric Complexes and/or Heterodimeric Complexes with β -Catenin*. en, *Journal of Biological Chemistry* **272**, 27301–27306, ISSN: 0021-9258 (říj. 1997).
59. M. Kuwahara, M. Hatoko, H. Tada, A. Tanaka, E-Cadherin Expression in Wound Healing of Mouse Skin. en, *Journal of Cutaneous Pathology* **28**, 191–199, ISSN: 1600-0560 (2001).
60. S. Le *et al.*, Mechanotransmission and Mechanosensing of Human Alpha-Actinin 1. en, *Cell Reports* **21**, 2714–2723, ISSN: 2211-1247 (pros. 2017).
61. Q. le Duc *et al.*, Vinculin Potentiates E-Cadherin Mechanosensing and Is Recruited to Actin-Anchored Sites within Adherens Junctions in a Myosin II-Dependent Manner. *Journal of Cell Biology* **189**, 1107–1115, ISSN: 0021-9525 (červ. 2010).
62. J. M. Leerberg, A. S. Yap, Vinculin, Cadherin Mechanotransduction and Homeostasis of Cell–Cell Junctions. en, *Protoplasma* **250**, 817–829, ISSN: 1615-6102 (srp. 2013), **review**.
63. X. Liang, X. Huang, Y. Zhou, R. Jin, Q. Li, Mechanical Stretching Promotes Skin Tissue Regeneration via Enhancing Mesenchymal Stem Cell Homing and Transdifferentiation. en, *STEM CELLS Translational Medicine* **5**, 960–969, ISSN: 2157-6580 (2016).
64. H. Lickert, A. Bauer, R. Kemler, J. Stappert, Casein Kinase II Phosphorylation of E-Cadherin Increases E-Cadherin/ β -Catenin Interaction and Strengthens Cell-Cell Adhesion*. en, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5090–5095, ISSN: 0021-9258 (ún. 2000).
65. L. A. Ligon, S. Karki, M. Tokito, E. L. F. Holzbaur, Dynein Binds to β -Catenin and May Tether Microtubules at Adherens Junctions. en, *Nature Cell Biology* **3**, 913–917, ISSN: 1476-4679 (říj. 2001).
66. K. Mandai *et al.*, Afadin: A Novel Actin Filament–Binding Protein with One PDZ Domain Localized at Cadherin-Based Cell-to-Cell Adherens Junction. *Journal of Cell Biology* **139**, 517–528, ISSN: 0021-9525 (říj. 1997).
67. H. Marie *et al.*, The LIM Protein Ajuba Is Recruited to Cadherin-Dependent Cell Junctions through an Association with α -Catenin*. en, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1220–1228, ISSN: 0021-9258 (led. 2003).
68. V. Maruthamuthu, B. Sabass, U. S. Schwarz, M. L. Gardel, Cell-ECM Traction Force Modulates Endogenous Tension at Cell–Cell Contacts. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 4708–4713, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (břez. 2011).
69. R. S. Maul, D. D. Chang, EPLIN, Epithelial Protein Lost in Neoplasm. en, *Oncogene* **18**, 7838–7841, ISSN: 1476-5594 (pros. 1999).
70. R. S. Maul *et al.*, EPLIN Regulates Actin Dynamics by Cross-Linking and Stabilizing Filaments. *Journal of Cell Biology* **160**, 399–407, ISSN: 0021-9525 (ún. 2003).
71. A. McGregor, A. D. Blanchard, A. J. Rowe, D. R. Critchley, Identification of the Vinculin-Binding Site in the Cytoskeletal Protein Alpha-Actinin. *Biochemical Journal* **301**, 225–233, ISSN: 0264-6021 (čvc 1994).
72. A. R. Menkel *et al.*, Characterization of an F-Actin-Binding Domain in the Cytoskeletal Protein Vinculin. *Journal of Cell Biology* **126**, 1231–1240, ISSN: 0021-9525 (zář. 1994).
73. M. Molenaar *et al.*, XTcf-3 Transcription Factor Mediates β -Catenin-Induced Axis Formation in Xenopus Embryos. en, *Cell* **86**, 391–399, ISSN: 0092-8674 (srp. 1996).
74. P. J. Morin *et al.*, Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC. en, *Science* **275**, 1787–1790, ISSN: 0036-8075, 1095-9203 (břez. 1997).
75. M. T. Nieman, R. S. Prudoff, K. R. Johnson, M. J. Wheelock, N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-Cadherin Expression. *Journal of Cell Biology* **147**, 631–644, ISSN: 0021-9525 (lis. 1999).
76. J. E. Nieset *et al.*, Characterization of the Interactions of Alpha-Catenin with Alpha-Actinin and Beta-Catenin/Plakoglobin. en, *Journal of Cell Science* **110**, 1013–1022, ISSN: 0021-9533, 1477-9137 (dub. 1997).
77. N. K. Noren, B. P. Liu, K. Burrige, B. Kreft, P120 Catenin Regulates the Actin Cytoskeleton via Rho Family Gtpases. *Journal of Cell Biology* **150**, 567–580, ISSN: 0021-9525 (srp. 2000).
78. A. Nose, M. Takeichi, A Novel Cadherin Cell Adhesion Molecule: Its Expression Patterns Associated with Implantation and Organogenesis of Mouse Embryos. *Journal of Cell Biology* **103**, 2649–2658, ISSN: 0021-9525 (pros. 1986).

79. A. Nose, A. Nagafuchi, M. Takeichi, Expressed Recombinant Cadherins Mediate Cell Sorting in Model Systems. en, *Cell* **54**, 993–1001, ISSN: 0092-8674 (zář. 1988).
80. S. Orsulic, M. Peifer, An in Vivo Structure-Function Study of Armadillo, the Beta-Catenin Homologue, Reveals Both Separate and Overlapping Regions of the Protein Required for Cell Adhesion and for Wnt Signaling. *Journal of Cell Biology* **134**, 1283–1300, ISSN: 0021-9525 (zář. 1996).
81. H. Osada, G. Grutz, H. Axelson, A. Forster, T. H. Rabbitts, Association of Erythroid Transcription Factors: Complexes Involving the LIM Protein RBTN2 and the Zinc-Finger Protein GATA1. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 9585–9589, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (říj. 1995).
82. F. Osakada *et al.*, Wnt Signaling Promotes Regeneration in the Retina of Adult Mammals. en, *Journal of Neuroscience* **27**, 4210–4219, ISSN: 0270-6474, 1529-2401 (dub. 2007).
83. N. Osherov, A. Levitzki, Epidermal-Growth-Factor-Dependent Activation of the Src-Family Kinases. en, *European Journal of Biochemistry* **225**, 1047–1053, ISSN: 1432-1033 (1994).
84. M. Ozawa, R. Kemler, Ozawa M, Kemler R Molecular Organization of the Uvomorulin-Catenin Complex. *J Cell Biol* 116: 989-996. *The Journal of cell biology* **116**, 989–96 (břez. 1992).
85. S. M. Pang, S. Le, A. V. Kwiatkowski, J. Yan, Mechanical Stability of α T-Catenin and Its Activation by Force for Vinculin Binding. *Molecular Biology of the Cell* **30**, 1930–1937, ISSN: 1059-1524 (čvc 2019).
86. P. Panorchan *et al.*, Single-Molecule Analysis of Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion. en, *Journal of Cell Science* **119**, 66–74, ISSN: 0021-9533, 1477-9137 (led. 2006).
87. N. Pečina-Šlaus, Tumor Suppressor Gene E-Cadherin and Its Role in Normal and Malignant Cells. *Cancer Cell International* **3**, 17, ISSN: 1475-2867 (říj. 2003).
88. X. Peng, L. E. Cuff, C. D. Lawton, K. A. DeMali, Vinculin Regulates Cell-Surface E-Cadherin Expression by Binding to β -Catenin. en, *Journal of Cell Science* **123**, 567–577, ISSN: 0021-9533, 1477-9137 (ún. 2010).
89. J. Piedra *et al.*, P120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate Beta-Catenin Tyr-142 Phosphorylation and Beta-Catenin-Alpha-Catenin Interaction. eng, *Molecular and Cellular Biology* **23**, 2287–2297, ISSN: 0270-7306 (dub. 2003).
90. S. Pokutta, F. Drees, Y. Takai, W. J. Nelson, W. I. Weis, Biochemical and Structural Definition of the L-Afadin- and Actin-Binding Sites of α -Catenin*. en, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 18868–18874, ISSN: 0021-9258 (květ. 2002).
91. S. Pokutta, K. Herrenknecht, R. Kemler, J. Engel, Conformational Changes of the Recombinant Extracellular Domain of E-Cadherin upon Calcium Binding. en, *European Journal of Biochemistry* **223**, 1019–1026, ISSN: 1432-1033 (1994).
92. S. M. Powell *et al.*, APC Mutations Occur Early during Colorectal Tumorigenesis. en, *Nature* **359**, 235–237, ISSN: 1476-4687 (zář. 1992).
93. I. Puranam, A. Urs, B. Kirk, K. A. Newell-Litwa, B. Hoffman, A Molecular Tension Sensor for N-Cadherin Reveals Distinct Forms of Mechanosensitive Adhesion Assembly in Adherens and Synaptic Junctions. en, *bioRxiv*, 552802 (ún. 2019).
94. E. S. Rangarajan, T. Izard, Dimer Asymmetry Defines α -Catenin Interactions. *Nature structural & molecular biology* **20**, 188–193, ISSN: 1545-9993 (ún. 2013).
95. B. Ranscht, M. T. Dours-Zimmermann, T-Cadherin, a Novel Cadherin Cell Adhesion Molecule in the Nervous System Lacks the Conserved Cytoplasmic Region. en, *Neuron* **7**, 391–402, ISSN: 0896-6273 (zář. 1991).
96. A. B. Reynolds, L. Herbert, J. L. Cleveland, S. T. Berg, J. R. Gaut, P120, a Novel Substrate of Protein Tyrosine Kinase Receptors and of P60v-Src, Is Related to Cadherin-Binding Factors Beta-Catenin, Plakoglobin and Armadillo. English, *Oncogene* **7**, 2439–2445, ISSN: 0950-9232, 1476-5594 (pros. 1992).
97. A. B. Reynolds, D. J. Roesel, S. B. Kanner, J. T. Parsons, Transformation-Specific Tyrosine Phosphorylation of a Novel Cellular Protein in Chicken Cells Expressing Oncogenic Variants of the Avian Cellular Src Gene. en, *Molecular and Cellular Biology* **9**, 629–638, ISSN: 0270-7306, 1098-5549 (ún. 1989).

98. E. d. A. Ribeiro *et al.*, The Structure and Regulation of Human Muscle α -Actinin. en, *Cell* **159**, 1447–1460, ISSN: 0092-8674 (pros. 2014).
99. D. L. Rimm, E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci, J. S. Morrow, Alpha 1(E)-Catenin Is an Actin-Binding and -Bundling Protein Mediating the Attachment of F-Actin to the Membrane Adhesion Complex. en, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 8813–8817, ISSN: 0027-8424, 1091-6490 (zář. 1995).
100. B. Rubinfeld, I. Albert, E. Porfiri, S. Munemitsu, P. Polakis, Loss of β -Catenin Regulation by the APC Tumor Suppressor Protein Correlates with Loss of Structure Due to Common Somatic Mutations of the Gene. en, *Cancer Research* **57**, 4624–4630, ISSN: 0008-5472, 1538-7445 (říj. 1997).
101. S. Sakakibara, T. Maruo, M. Miyata, K. Mizutani, Y. Takai, Requirement of the F-Actin-Binding Activity of I-Afadin for Enhancing the Formation of Adherens and Tight Junctions. en, *Genes to Cells* **23**, 185–199, ISSN: 1365-2443 (2018).
102. S. Shibamoto *et al.*, Association of P120, a Tyrosine Kinase Substrate, with E-Cadherin/Catenin Complexes. *Journal of Cell Biology* **128**, 949–957, ISSN: 0021-9525 (břez. 1995).
103. K. L. Schmeichel, M. C. Beckerle, The LIM Domain Is a Modular Protein-Binding Interface. en, *Cell* **79**, 211–219, ISSN: 0092-8674 (říj. 1994).
104. K. Taguchi, T. Ishiuchi, M. Takeichi, Mechanosensitive EPLIN-Dependent Remodeling of Adherens Junctions Regulates Epithelial Reshaping. *Journal of Cell Biology* **194**, 643–656, ISSN: 0021-9525 (srp. 2011).
105. K. Takahashi *et al.*, Nectin/PRR: An Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule Recruited to Cadherin-Based Adherens Junctions through Interaction with Afadin, a PDZ Domain-Containing Protein. *Journal of Cell Biology* **145**, 539–549, ISSN: 0021-9525 (květ. 1999).
106. Y. S. Tao *et al.*, Beta-Catenin Associates with the Actin-Bundling Protein Fascin in a Noncadherin Complex. *Journal of Cell Biology* **134**, 1271–1281, ISSN: 0021-9525 (zář. 1996).
107. M. Watabe-Uchida *et al.*, α -Catenin-Vinculin Interaction Functions to Organize the Apical Junctional Complex in Epithelial Cells. *Journal of Cell Biology* **142**, 847–857, ISSN: 0021-9525 (srp. 1998).
108. A. S. Yap, C. M. Niessen, B. M. Gumbiner, The Juxtamembrane Region of the Cadherin Cytoplasmic Tail Supports Lateral Clustering, Adhesive Strengthening, and Interaction with P120ctn. *Journal of Cell Biology* **141**, 779–789, ISSN: 0021-9525 (květ. 1998).
109. S. Yonemura, Y. Wada, T. Watanabe, A. Nagafuchi, M. Shibata, α -Catenin as a Tension Transducer That Induces Adherens Junction Development. en, *Nature Cell Biology* **12**, 533–542, ISSN: 1476-4679 (červ. 2010).
110. S. Zhang *et al.*, EPLIN Downregulation Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Cells and Correlates with Clinical Lymph Node Metastasis. en, *Oncogene* **30**, 4941–4952, ISSN: 1476-5594 (pros. 2011).