

Kristijan Jezernik¹, Mateja Erdani Kreft²

Tesnostične pregrade v našem telesu

Tight Junction Barriers in Our Body

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: tesni stik, pregrada – bariera, bolezni

Tesni stiki so odločilni medcelični stiki, ki gradijo epitelijske pregrade. Oblikujejo molekularnim poram podobne strukture, ki obkrožajo vrhove posameznih celic. Nadzirajo prehajanje malih molekul med apikalnimi in bazolateralnimi kompartmenti. Oblikujejo razvejane mreže pečatnih povezav iz transmembranskih proteinov, kot so okcludin in klavdini, katerih zunajcelične domene se med seboj neposredno povezujejo. Na citosolni strani plazmaleme pa so v povezavi z različnimi submembranskimi proteini, ki posredujejo povezavo z aktinskim citoskeletom. To delo podaja pregled spoznanj o zgradbi in funkciji proteinov, ki gradijo tesne stike ali so z njimi povezani. Zbrani so podatki o tesnostičnih proteinih v epitelijskih sesalcev ter o njihovih vlogah pri nekaterih boleznih. Razpravljamo tudi o možnostih koriščenja spoznanj o tesnih stikih za namene izboljšane tarčnega vnosa učinkovin v telo.

ABSTRACT

KEY WORDS: tight junction, barrier, diseases

Tight junctions comprise a crucial part of epithelial barriers by forming a molecular pore like structure that encircles the apex of individual cells. They control the passage of small molecules between apical and basolateral compartments. Junctions are composed of a branching network of sealing strands. Each strand is formed from a row of transmembrane proteins namely occludin and claudins, embedded in both plasma membranes, with extracellular domains joining one another directly. These associate with different peripheral membrane proteins located on the intracellular side of plasma membrane, which anchor the strands to the actin cytoskeleton. This overview gives a detailed survey about the proteins associated with tight junctions, their structure and functions including a wealth of the relevant literature. We summarize our knowledge about tight junction proteins in mammalian epithelial tissue and their involvement in some diseases. Their putative suitability as new targets for improving drug delivery is discussed.

¹ Prof. dr. Kristijan Jezernik, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana; kristijan.jezernik @mf.uni-lj.si

² Doc. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

ZGRADBA TESNIH STIKOV

Epitelijska tkiva imajo vlogo pregrad ali barier, ki ločujejo različne predelke ali kompartmente (telo od zunanosti in od notranjih telesnih votlin). Tesni stiki pa so glavne sestavine epitelijskih celic, ki v veliki meri prispevajo k pregradni vlogi epitelijskih celic. Nameščeni so tako, da obkrožajo vrhove posameznih celic kot neke vrste poram podobne strukture in tako nadzirajo potovanje majhnih molekul in ionov med luminalnim (apikalnim) in seroznim (bazolateralnim) kompartmentom. Prepustnost za ione je različna za različne vrste epitelijskih celic in je v osnovi določena z molekularno sestavo tesnega stika (1).

Tesni stiki spenjajo lateralne plazmaleme sosednjih celic, od tod tudi prvotno ime v latinskem jeziku *zonulae occludentes*. Na površini plazmaleme so vidni kot preplet – mreža anastomoznih, verigi podobnih povezav (slika 1). Število, dolžina in medsebojna prepletenost teh povezav se med različnimi epitelijskimi vrstami močno razlikuje. Pod plazmalemo pa je opazen plak, ki ga označuje krožno potekajoč pas aktinskih filamentov (2). Tesni stik v osnovi gradijo transmembranski in submembranski proteini. Submembranski proteini se vežejo

na aktinske filamente in vključujejo tudi določene regulatorne proteine (slika 2).

Transmembranski proteini

Okludin je bil prvi znani stični membranski protein, ki je specifično lokaliziran v področju tesnega stika (3). Njegovo izražanje pa ni nujno potrebno za oblikovanje stičnega prepleta pa tudi njegova pregradna vloga v tem smislu ni popolnoma pojasnjena (4). Drugi pomemben protein je tricelulin. Ta bi lahko prevzemal pregradno funkcijo. Po zgradbi je zelo podoben okludinu (5). Posebno veliko ga je v področjih tromej med celicami (v t. i. tromejnih povezavah). Poleg dveh naštetih skupin proteinov so v stiku gotovo najpomembnejši od Ca^{2+} neodvisni proteini klavdini, ki so nujno potrebni za oblikovanje stičnih vezi (1, 6). Do danes je poznanih vsaj 24 različnih klavdinov v klavdinski družini, vsak z značilno razporeditvijo v organih in tkivih. Ionsko selektivnost določajo regije v zanki klavdina zunaj celice, ki imajo naboj in izražajo različne izoelektrične točke. Tako je ionska selektivnost različnih epitelijskih celic močno odvisna od vrste klavdinskih molekul, ki se izražajo v določenem epitelijskem tkivu (6). IgG-so-



Slika 1. Tesnostične povezave v celici obušesne slinavke so vidne kot mrežast preplet na površini plazmaleme.

TESNI STIKI V VLOGI PREGRADE IN EPITELIJSKA POLARNOST

Med oblikovanjem medceličnih stikov in vzpostavitev apikalno-bazolateralne polarnosti obstaja neodvisna povezanost (14). V oblikovanju polarnosti sodelujejo v področju tesnega stika nedavno odkriti multi-proteinski t. i. polarni kompleksi, kot sta Par in CRB (Crumbs), atipična proteinska kinaza (aPCK) ter kompleks Scribble. Kompleksi imajo antagonistične učinke in se nameščajo v ločena področja membranskih domen, torej apikalno ali bazolateralno. Kompleks CRB se namešča apikalno in delno v področju tesnega stika, kompleks Scribble pa lateralno. Apikalno nameščeni kompleksi izrivajo nameščanje lateralnih in obratno. Ta prehodna medsebojna izključitev v lokaciji nameščanja polarnih kompleksov vodi do vzpostavitev in vzdrževanja apikalno-bazolateralne polarnosti epitelija (15).

Tesni stiki predstavljajo zelo učinkovito pregrado za pasivni prehod tekočin, elektrolitov, makromolekul in tudi prehod celic po medcelični (paracelični) poti. Posledično nastane zaradi različne ionske sestave snovi v zunajceličnem prostoru in medceličnem prostoru določena upornost – paracelična upornost. Tesni stiki torej vzpostavljajo določeno upornost med svetlino (lumnom) in medceličnim prostorom. Ker pa večinoma snovi potujejo skozi apikalne površine v citoplazmo in po citoplazmi na bazo celic ter nato ven iz celic, torej čez celico (transcelična pot) in le delno po medcelični poti, je celokupna in seveda specifična čezepitelijska (transepitelijska) upornost določenega tkiva oziroma upornost skozi tkivo določena kot seštevek čezcelične (transcelične) in medcelične (paracelične) upornosti. Transcelično in tudi transepitelijsko upornost izražamo v ohmih cm^2 (Ωcm^2).

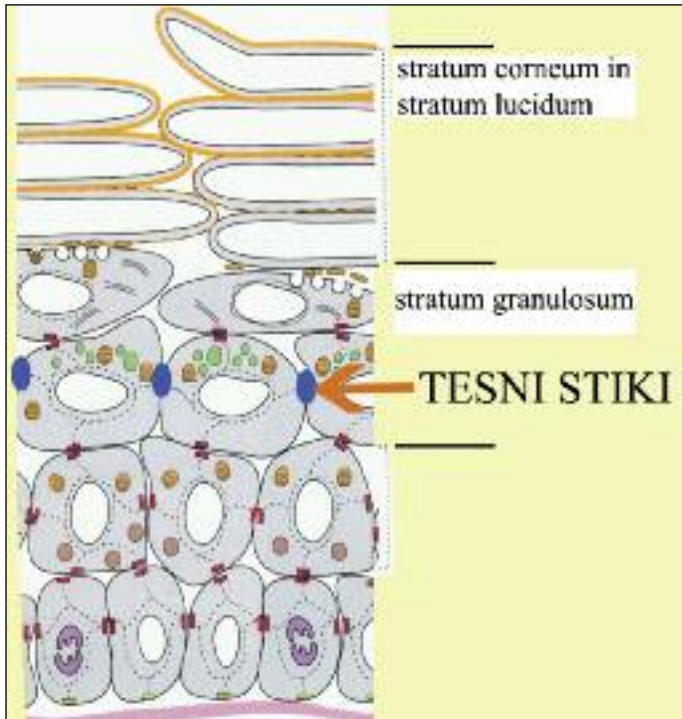
Glavnino transepitelijske upornosti v največji meri določajo tesni stiki v površinskih epitelijških celicah. Med tkiva z največjo vlogo pregrade gotovo spadata epitelij žolčnika in epitelij sečnega mehurja (urotelij). Zlasti slednji ima najmočnejši preplet tesnostičnih povezav, ki dejansko niso prehodne za vsebine v svetlini sečnega mehurja. Pregrada, ki je vzpostavljena v uroteliju, zagotavlja upornost med 10.000 in 100.000 Ωcm^2 .

Namestitev tesnostične pregrade v epitelijih

V osnovi velja, da so tesni stiki nameščeni vedno na meji apikalne in bazolateralne membranske površine enoskladnih, prehodnih in večskladnih epitelijev. Pri tem je zanimivo, da je bila v koži določena lokacija tesnih stikov in s tem pregrade šele nedavno. Dolgo časa sicer ni bilo znano, ali v večskladnih epitelijih tesni stiki sploh obstajajo. Tako so domnevali, da zlasti keratinizirani epiteliji vzdržujejo pregrado zaradi izločanja in nalaganja med seboj navzkrižno povezanih proteinov t. i. lamelarnih telesc v celicah (16). Vendar se je relativno pozno izkazalo, da so za nemoteno pregradno vlogo tudi v epidermisu (pokožnici) potrebni tesni stiki. Tesni stiki se v človeškem epidermisu nahajajo v zrnati plasti (lat. *stratum granulosum*) (slika 4) (17, 18). Tesni stiki in *stratum corneum* ter *stratum lucidum* tako skupaj ustvarjajo funkcionalno pregrado v večskladnem epiteliju. Pri tem imajo odločilno vlogo kinaze IKK1 ter signaliziranje prek NF κ B. Prek teh poti namreč potekajo vplivi na izražanje retinoično kislinskih tarčnih genov, ki so vključeni v zagotavljanje pregradne vloge epitelijev. Poleg tega je pomembno, da specifična lega tesnega stika v *stratum granulosum* zagotavlja tarčenje »apikalnih« proteinov in lipidnih mešičkov naravnost proti *stratum corneum*. Epidermis ni klasično apikalno-bazolateralno polarizirano tkivo, pač pa je polarizacija na apikalno in bazolateralno os epitelija dosežena s *stratum granulosum*, ki tako oblikuje vitalno apikalno mejo. Verjetno je oblikovanje tesnih stikov v nižjih plasteh epitelija zavrtlo zaradi zaviralnih signalov za oblikovanje stikov, ki prihajajo iz celic, ki nosijo tesne stike.

TESNI STIKI V VLOGI ZAVESE

Tesni stiki preprečujejo lateralno gibljivost membranskih molekul, zaradi česar te ne morejo prehajati iz apikalnih v bazolateralne površine ali obratno. V tem smislu so tesni stiki v vlogi zaves. To nazorno dokazujejo študije o vlogi teh stikov v regulaciji rasti celic. Zaradi namestitve tesnih stikov so namreč rastni dejavniki kot ligandi in njihovi receptorji med seboj fizično ločeni v različnih membranskih domenah, eni apikalno, drugi



Slika 4. Tesni stiki (modra) so v epidermisu nameščeni v zrnati plasti (lat. stratum granulosum).

bazolateralno. Tako je na primer v dihalnem epiteliju receptor Erb3/4 lokaliziran v bazolateralni membranski domeni, njegov ligand pa se nahaja v apikalni membranski domeni (19). V primeru motnje delovanja stika in njegove vloge v smislu zavese in pregrade ter s tem tudi celične polarnosti (na primer ob poškodbi – rani ali zaradi različnih vnetnih dejavnikov) je omogočena vezava liganda in receptorja. Premiku receptorja v apikalno domeno sledi njegova aktivacija, ki lahko pripelje do intenzivne proliferacije celic.

V vzdrževanju polarnosti ima odločilno vlogo okludin. Znano je, da je izguba polarnosti zaradi epiteljsko-mezenhimskega prehoda, ki jo povzročata transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF- β), posledica interakcij TGF- β , okludina, polarnih proteinov Par6 in različnih regulatornih molekul. Prav interakcije med transmembranskimi in citoplazemskimi molekulami, skupaj s citoskeletom, pa modulirajo obe temeljni vlogi tesnega stika – vlogo pregrade in zavese.

SIGNALIZIRANJE, KI POTEKA IZ TESNEGA STIKA

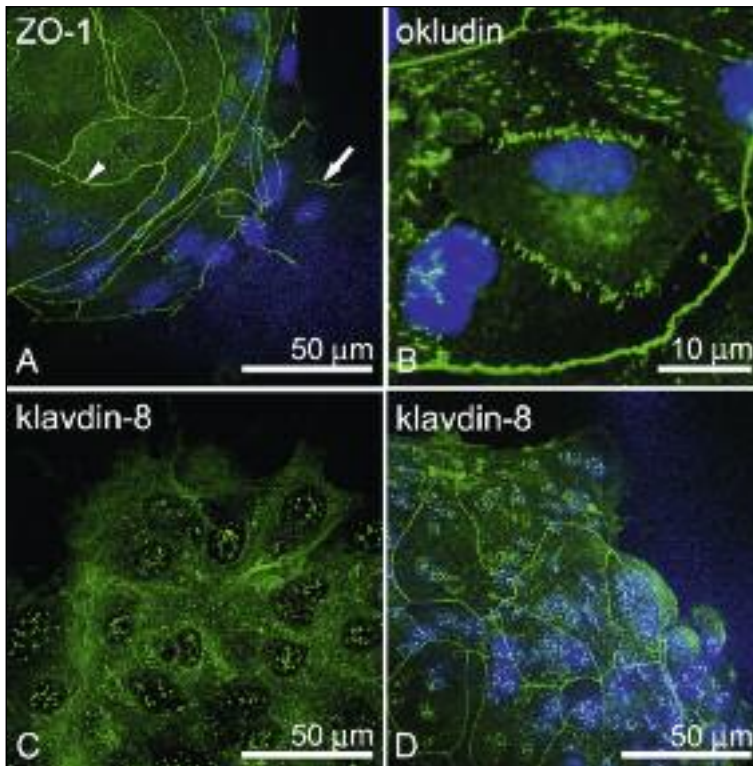
Netransformirane (normalne) celice tudi preko stikov dobivajo signale za terminalno diferenciacijo in se posledično prenehajo gibati. Ta pojav na splošno označujemo kot kontaktna inhibicija in je v povezavi z izgubo sposobnosti preraščanja celic ter posredno tudi s preprečitvijo epiteljsko-mezenhimskega prehoda. V to signaliziranje so vključene komponente tesnega stika in aktivnosti jedrnih transkripcijskih dejavnikov. Tako β -katenin (zbran v adherentnem in tesnem stiku) kot tudi p120 preko transkripcijskih dejavnikov in sprememb v zgradbi kromatina vplivata na izražanje genov. Tako na primer p120 zavre transkripcijske represorje (20). Gradbene komponente tesnega stika pa tudi neposredno regulirajo aktivnost transkripcijskih dejavnikov. Proteini ZO-1 se vežejo na določene transkripcijske dejavnike, zlasti v jedrih celic z nedokončno zgrajenimi tesnimi stiki, na pri-

mer med celjenjem ran (21). Podobno naj bi tudi ZO-2 vplival na transkripcijske dejavnike, torej imajo proteini ZO podobno vlogo kakor katenini.

TESNI STIKI IN CELJENJE RAN

Tesni stiki so nujni za ponovno vzpostavitev in vzdrževanje zajezivne vloge epitelijev po poškodbi. Ob celjenju ran poteka izražanje in potovanje različnih tesnostičnih proteinov usklajeno glede na različne fiziološke ali tudi patološke dejavnike. Znano je, da se med fiziološko samoobnovo epitelijev stare, odmrle celice odstranjujejo in nadomeščajo z novimi celicami, ne da bi se pri tem spremenila funkcionalnost epiteljske pregrade (22). Poš-

kodbi različnih epitelijev (kože, črevesa, pljuč, žil, sečnega mehurja) sledi celjenje ran, pri katerem se torej kontrolirano izražajo tesnostični proteini (23). Na primer, na *in vitro* modelih večplastnih poškodb urotelija sečnega mehurja, ki mu sledi celjenje rane, je pomembno dogajanje na t.i. rastočem ali vodilnem robu. Na tem mestu sta zgodnja celična dogodka proliferacija in gibanje celic, ki ju spremlja izražanje proteinov tesnih stikov. Že v enoskladnem uroteliju so prisotni proteini ZO-1, okludin in klavdin-4, kar je predpogoj za oblikovanje funkcionalne krvno-urinske permeabilnostne pregrade (slika 5). Ker je ZO-1 le submembranski ogrodni protein, ki se povezuje z okludinom ali posameznim klavdinom, prisotnost ZO-1 torej ni



Slika 5. Izražanje in razporejanje tesnostičnih proteinov med obnovo urotelija *in vitro*. Imunofluorescenca ZO-1, okludina in klavdina-8. A – ZO-1 je prisoten na mejah med sosednjimi celicami na vodilnem robu (puščica) ter v neprekinjenih linijah na apikalno-bazolateralnih delih plazmaleme (glava puščice) površinskih celic v dvoskladnem uroteliju za vodilnim robom. B – Okludin se nahaja v neprekinjenih linijah med površinskimi celicami v dvoskladnem uroteliju in v prekinjenih linijah na mejah med bazalnimi celicami. C – Klavdin-8 v enoskladnem uroteliju na vodilnem robu ni prisoten. D – Klavdin-8 je izražen na mejah med površinskimi urotelijskimi celicami v dvo- do triskladnem uroteliju za vodilnim robom.

pogojena tudi s funkcionalnimi tesnimi stiki (24). Novejše raziskave potrjujejo, da tudi vsi klavdini niso ključni za funkcionalnost tesnih stikov. V obnavljajočem se uroteliju po poškodbi je klavdin-8 tisti, ki se izrazi nazadnje in je prisoten v tesnih stikih med diferenciranimi površinskimi urotelijskimi celicami (slika 5) (25). Predvideva se, da je v uroteliju prav klavdin-8 tisti, ki je odgovoren za izredno visoko transepitelijsko upornost.

Zanimivo je, da lahko v primerih površinskih poškodb urotelija k hitrejšemu celjenju poškodbe prispevajo tudi že obstoječe, dokončno diferencirane površinske urotelijske celice, in sicer na dva načina. Prvič, v stiku z novimi, še ne dokončno diferenciranimi površinskimi celicami razvijejo tesne stike že eno uro po poškodbi, in drugič, z zalogami apikalne plazmaleme v veziklih, shranjenih v apikalni citoplazmi, lahko povečajo površino apikalne plazmaleme celo do trikrat, s čimer zelo hitro in učinkovito prekrijejo obsežen del površinske poškodbe (26).

TESNI STIKI IN BOLEZNI

Tesni stiki v osnovi preprečujejo izgubo tekočin iz telesa, vstop vsebine iz notranjih telesnih svetlin v telo in tudi prodiranje bakterij med celicami epitelijev globlje v telo. V določenih primerih so spremembe v zgradbi tesnega stika osnovni vzrok za nekatere bolezni. So pa stanja, kjer ni trdnih zagotovil, ali so spremembe v tesnih stikih vzrok ali posledica bolezni. Pri pojavljanju bolezni so gotovo ključni klavdini, ki so v povezavi s čisto določenimi spremembami v pregradni vlogi tesnih stikov. Mutacije klavdinov lahko namreč privedejo do specifičnih bolezni pri človeku, npr. mutacije klavdina-16 povzročajo dedno hipomagneziemijo, mutacije klavdina-14 in/ali tricolulina pa gluhost (1, 6). Mutacije klavdina-1 v večskladnih epitelijih so vzrok neonatalnega sindroma *ichthyosis sclerosis cholangitis*. Do mutacije pride v genu na 3. kromosomu (3q28-q29), ki kodira klavdin-1 in se deduje avtosomno recesivno. Bolezen se izrazi z luskvico, pojavom levkocitinih vakuol, alopecije in kroničnim jetrnim obolenjem – skleroznim holangitisom.

Za mnoge viruse in bakterije je znano, da zlorabijo spremembe tesnih stikov za vstop

v celico. Nekateri, zlasti virusi, uporabljajo tesnostične komponente kot receptorje, spet drugi spreminjajo strukturo tesnih stikov. Tako retrovirusi delujejo preko proteina JAM. Bakterija *Helicobacter pylori* pa se s proteinom CagA veže na ZO-1, Jam-A in nekatere proteine, ki določajo celično polarnost. CagA-pozitivni sevi so krivi za gastritise in adenokarcinom (27, 28). Podobno se dogaja tudi v primeru Crohnove bolezni, pri atopičnem dermatitisu ali luskavici (29, 30). Znano je, da lahko vnetni citokini, kot sta npr. tumorski nekrozni faktor α (TNF- α) ali interferon γ , povzročijo internalizacijo tesnostičnih komponent in spremembo aktomiozinskega citoskeleta ter tako spremenijo pregradno vlogo celic. Tako tudi mutacija filagrina, ki je ključni epidermalni pregradni protein, povzroči vnetje kože in atopični dermatitis.

Tesni stiki torej ustvarjajo v telesu različne pregrade med polariziranimi celicami epitelov in endotelov. Pregradna vloga, ki jo vzdržujejo tesni stiki v epitelijih in endotelijih, je ključna za homeostatsko delovanje tkiv. Le tako zagotavljajo normalno delovanje celic in tkiv v njih in preprečujejo specifična obolenja. Nekatere teh pregrad so dandanes že dobro preučene in med pomembnejšimi so gotovo pregrada med krvjo in zrakom v pljučih, možganovino, urinom, testisi in mrežnico.

Pregrada med krvjo in zrakom v pljučih ali alveolo-kapilarna bariera

Pregrada je nameščena v področju izmenjave plinov v pljučih. Gradijo jo tesni stiki med prevmcitici tipa 1 v alveolarnih stenah, endotelijevih celic kapilar in bazalna lamina pod celicami. Tovrstna pregrada je seveda propustna za pline, kot so kisik, ogljikov dioksid, ogljikov monoksid in mnoge druge. Pregrada je kljub izredno tanki strukturi (lahko samo 200 nm) mehansko izjemno močna, stabilna in omogoča zadovoljivo izmenjavo plinov z difuzijo. Kljub tej trdnosti pa se pri tlaku okrog 40 mmHg lahko poruši, do česar prihaja v primeru izredno povišanega krvnega tlaka.

Ker so tesni stiki neposredno vključeni v regulacijo prehajanja ionov in makromolekul tako v epitelijevih kot endotelijevih celicah, ponuja moduliranje te njihove zaporne vloge in s tem posredno tudi prepustnosti

med celicami možnost, da tako vplivamo na vnos in tudi povečamo vnos farmakoloških učinkovin kot tudi genskih vektorjev. Dihalni epitelij je neprehoden za makromolekule, ki bi vstopale z apikalne strani. Snovi, ki se uporabljajo za spreminjanje prepustnosti tesnih stikov, kot so na primer EGTA, natrijeve soli, nasičene maščobne kisline, lizofosfatidilholin, resnično povečajo prepustnost tesnega stika, vendar tudi vplivajo na mnoge proteine v tesnem stiku ter izzovejo vnetje. Za zmanjšanje vnetnega odgovora, ki ga povzročajo omenjene snovi, pa je mogoča alternativna strategija zdravljenja, in sicer preko vplivov le na določene molekule tesnega stika. Ti postopki zdravljenja ciljajo neposredno na specifične tesnostične proteine. Takšno tarčo predstavlja predvsem okludin (31). Z vplivanjem nanj se tako nudi možnost manjše toksičnosti za dihalni epitelij in doseže večji specifični odgovor.

Pregrada med krvjo in možganovino ali krvno-možganska bariera

Bakteriolog Paul Ehrlich (1854–1915), ki je injiciral anilinska barvila v živali, je opazil, da ostanejo možgani neobarvani. Tako je bil Ehrlich prvi, ki je empirično opisal krvno-možgansko pregrado. Delo je nadaljeval leta 1913 njegov študent Edwin Goldmann, ki je barvilo vnesel v spinalno tekočino in opazil, da se v tem primeru možgani obarvajo, vendar ne preostalo telo. Takrat so menili, da so za pojav te pregrade odgovorne krvne žile, kajti v sistemu, ki so ga preučevali, niso opazili nobene membrane. Koncept krvno-možganske pregrade pa je dejansko bil potrjen šele leta 1960 s pomočjo presevne elektronske mikroskopije. Krvno-možganska pregrada, imenovana tudi hematoencefalna pregrada, je osnovana na celični ravni v centralnem živčnem sistemu. V principu omejuje prehajanje različnim snovem in mikroorganizmom med krvjo in živčnim tkivom. Pri tem pa omoogoča prehod snovi, ki so nujno potrebne za metabolno funkcijo živčnega tkiva (npr. kisik). Ta pregrada je posledica tesnih stikov med endotelijskimi celicami in centralnim živčnim sistemom. Na stičišču krvi in možganovine se povezujejo endotelijske celice in astrociti, na teh mestih se oblikujejo tesni stiki. Krv-

no-možgansko pregrado sestavlja v osnovi izjemna gostota celic, ki je nekajkrat večja kakor med endotelijskimi celicami drugod v telesu. Podaljški astrocitov (imenovani tudi glia meja) obdajajo endotelijske celice krvno-možganske pregrade in poskrbijo za izmenjavo snovi za živčne celice. Krvno-možganska bariera se loči od sorodne krvno-cerebrospinalne tekočinske bariere, ki jo določajo povezave med celicami horoidnega plexusa.

Krvno-možganska pregrada je zelo učinkovita prepreka med krvjo in možganskim tkivom, ki ima pomembno vlogo zlasti pri varovanju možganov pred številnimi bakterijskimi okužbami. Zaradi te vloge so bakterijske okužbe možganov zelo redke, vendar pa nekateri virusi lažje kakor bakterije prehajajo to pregrado. Ker je torej le-ta zgrajena izredno trdno in tesno, se pojavljajo težave v primeru nekaterih zdravljenj, ki zahtevajo vnos protiteles. Protitelesa so namreč zelo velike molekule, ki težko prehajajo pregrado, zato so okužbe možganov povezane z zelo resnimi in hkrati težko ozdravljivimi obolenji.

Prehod krvno-možganske pregrade za potrebe vnosa terapevtskih učinkovin za zdravljenje možganskih okvar je zato v določen predel možganov zelo težaven. Terapevtske molekule in geni, ki bi lahko bili zelo učinkoviti v diagnosticiranju in zdravljenju možganskih obolenj, ne prehajajo krvno-možganske pregrade v zadostnih količinah. Zaradi tega se uporabljajo različni sistemi za vnos sestavin v možgane. Mnogi od teh obidejo pregrado (receptorsko pogojena transcitoza, intracerebralna implantacija, metode za lokalno porušenje pregrade). Zelo obetaven vnos snovi čez krvno-možgansko pregrado predstavljajo novejša tehnologija, kot je na primer nanotehnologija. Z razvojem in uporabo nanodelcev, vgrajenih v liposome, je mogoč lažji prehod čez omenjeno pregrado. Liposomi z nanodelci tako predstavljajo možnost tarčnega uničevanja celic v možganih in so potencialno uporabni pri zdravljenju možganskih tumorjev. V novejšem času pa je predlagan predvsem mehanizem prehajanja preko bariere med možgani in krvjo s pomočjo mikroveziklov.

Prenos učinkovin čez to pregrado pa vendar predstavlja eno najbolj obetavnih aplikacij nanotehnologije v klinični nevroznanosti.

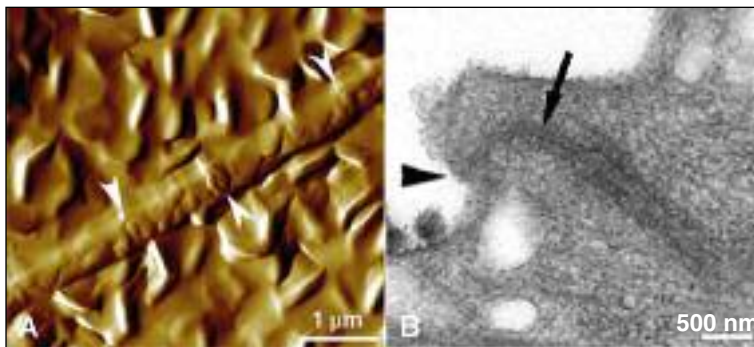
Nanodelci lahko potencialno rešujejo mnoge naloge, ki so zelo pomembne za sproščanje in prenos učinkovin čez to pregrado. Tako v novejšem času preskušajo nekatere antineoplastične učinkovine proti tumorjem centralnega živčevja, kot je tretiranje s polietilenglikolom prekrute heksadecilcianakrilatne nanokroglice, ki tarčijo in se zbirajo (poskusi pri podganah) v gliosarkomu. Vedeti pa je treba, da so žilne endotelijske celice in periciti v tumorjih pogosto abnormalni in pregrada v možganskih tumorjih ni vedno neokrnjena, tako da lahko tudi drugi dejavniki, kot so astrociti, vplivajo na odpornost možganskih tumorjev na takšna zdravljenja.

Pregrada med krvjo in urinom ali krvno-urinska bariera

Tesni stiki med površinskimi urotelijskimi celicami in specializirana apikalna plazmalema površinskih celic, tako njena lipidna kot tudi proteinska sestava, zagotavljajo najmočnejšo pregrado v našem telesu, to je krvno-urinsko pregrado (32–34). Upornost urotelija je med 10.000 in celo več kot 100.000 Ωcm^2 . Ocenjeno je, da tesni stiki med površinskimi urotelijskimi celicami zagotavljajo paracelično upornost, ki lahko izjemoma preseže celo vrednost 300.000 Ωcm^2 . Razlog za visoko transepitelijsko upornost urotelija je predvsem v molekularni sestavi apikalne plazmaleme površinskih urotelijskih celic in v tesnih stikih. V apikalni plazmalemli so v visokem deležu prisotni transmembranski proteini

uroplakini (UPIa, UPIb, UPII, UPIII), katerih velika zunajcelična domena je razlog, da je apikalna plazmalema v površinskih urotelijskih celicah debelejša kot pri ostalih celicah. Kar v 90% je njena debelina 12 nm in le v preostalem odstotku je debelina običajnih 7 nm. Uroplakini skupaj z lipidi, ki jih najdemo tudi v mielinu, npr. sfingolipidi in holesterol, učinkovito zmanjšujejo prepustnost apikalne plazmaleme (34). Dodatno k temu prispeva tudi značilno zmanjšana apikalna endocitoza v diferenciranih površinskih urotelijskih celicah. V primerjavi z ledvičnimi epitelinimi celicami MDCK imajo površinske urotelijske celice kar 5–15-krat nižjo endocitotsko aktivnost (35). Nedavno so Kreplak in sodelavci (2007) s pomočjo mikroskopa na atomsko silo ugotovili, da k transepitelijski upornosti prispevajo tudi značilni prepleti med sosednjimi celicami (slika 6). Ti prepleti oziroma zajede ene celice v drugo (označeno s puščicami). Orientacija teh zajed se izmenično spreminja. B – Preplet (glava puščice) in nižje ležeči tesni stik (puščica) med dvema sosednjima celicama. Slikano s presevnim elektronskim mikroskopom.

S krvno-urinsko pregrado je vsebina odpadnih snovi, med katerimi so nekatere tudi toksične in potencialno kancerogene, skladiščena v svetlini sečnega mehurja do mikcije in tako varno ločena od bazolateralnega prostora, ki je izmenljiv s krvjo. Pod vplivom patogenov ali pri določenih obolenjih sečnega mehurja, kot so vnetje sečnega mehurja (cistitis), vezikouretralni refluks ali neoplastna transformacija, se na površini urotelija izpostavijo manj diferencirane celice s slabše raz-



Slika 6. Povezave med površinskimi urotelijskimi celicami. A – Z mikroskopom na atomsko silo slikane medcelične povezave, ki so vidne kot prepleti oz. zajede ene celice v drugo (označeno s puščicami). Orientacija teh zajed se izmenično spreminja. B – Preplet (glava puščice) in nižje ležeči tesni stik (puščica) med dvema sosednjima celicama. Slikano s presevnim elektronskim mikroskopom.

vitimi tesnimi stiki. V takih primerih je funkcionalnost krvno-urinske pregrade okrnjena.

Uropatogena *Escherichia coli* (UPEC), ki povzroča več kot 80 % vseh okužb urinarnega trakta, se z adhezinom FimH, ki se nahaja na koncu fimbrij tipa 1, veže na UPIa na apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic. Najnovejše raziskave s krio-elektronsko mikroskopijo so pokazale, da FimH ob vezavi na receptor (UPIa) sproži zvišanje znotrajcelične koncentracije kalcija in fosforilacijo citoplazemskega repa UPIIIa, kar povzroči prerezporeditev citoskeleta in vstop bakterije v urotelijsko celico (37). Obenem UPEC na še nepoznan mehanizem povzroči prekinitve tesnih stikov. Prekinitvi tesnostičnih in tudi ostalih medceličnih vezi sledi intenzivno luščenje površinskih urotelijskih celic. To ima za posledico porušitev krvno-urinske bariere in vdor toksičnih snovi po medceličnem prostoru v globlje plasti urotelija. Takšne spremembe vodijo v nastanek vnetij, posledično sprožajo intenzivnejšo proliferacijo celic, kar lahko kasneje vodi tudi v neoplastno transformacijo. Zaradi vsega tega je krvno-urinska bariera ključnega pomena za normalno delovanje sečnega mehurja.

Pregrada med krvjo in testisi ali bariera med testisi in krvjo

Oblikujejo jo tesnostične povezave med Sertolijevimi celicami kot opornimi celicami v semenskih kanalčkih in spermatogoniji (38). Osnovni namen te bariere je preprečitev prehajanja citotoksičnih snovi (toksičnih molekul ali infekcijskih celic v testisove kanalčke). Pregrada se lahko prekinja zaradi travmatičnih dogodkov ali mehanskih poškodb testisov ali zaradi kirurškega posega – vazektomija. V primeru porušitve lahko spermiji vstopajo v krvožilje, kar izzove imunski odgovor oziroma avtoimunski odgovor. Protitelesa, usmerjena proti spermijem, se lahko vežejo na številna antigenska vezavna mesta na površini spermijev. Če se vežejo na glavico spermija, je okrnjena oploditvena sposobnost z jajčno celico. Prav tako je možnost za oploditev manjša

v primeru, če se protitelesa vežejo na rep spermija.

Pregrada med krvjo in mrežnico v očesu ali krvno-očesna bariera

Pregrada med krvjo in mrežnico je del obsežne krvno-očesne bariere. Sestoji iz nefenestriranih kapilar, ki gradijo krvožilni sistem mrežnice, in tesnih stikov med retinalnimi pigmentnimi epitelijem (39). Tako je preprečen vstop določenim snovem iz tkiv v mrežnico oziroma je preprečeno prehajanje velikih molekul iz horio-kapilarnega prepleta v mrežnico. Ta pregrada ima dve sestavni komponenti: mrežnično-vezikularni endotelij in retinalni pigmentni epitelij. V bistvu kapilare v mrežnici, ki so podobne kapilaram v možganih, vzdržujejo notranjo krvno očesno pregrado. Tesni stiki so neprehodni za številne označevalce, zaradi česar številne snovi ne morejo prehajati v očesno beločnico. V primeru sladkorne bolezni je porušena krvno-očesna pregrada, kar posledično privede do okvar oči in obolenja, imenovanega diabetična retinopatija. Rizični dejavnik predstavlja tudi povečan krvni pritisk, saj postane v tem primeru ta pregrada prepustnejša.

ZAKLJUČEK

Tesni stiki so zelo pomembna vrsta povezav med celicami, saj v osnovi ločujejo naše telo od zunanosti in od notranjih telesnih votlin. Posledično vzpostavljajo in vzdržujejo mnoge pregrade v telesu in čeznje omejujejo prosto prehajanje snovem ali ga povsem preprečijo. Pregrade so pogoj za normalno delovanje celic in tkiv. Znanje o molekularni sestavi, nastitvi in vlogi tesnostičnih pregrad v telesu je dandanes že zelo temeljito. Ravno pregradna vloga stika pa hkrati predstavlja tudi težavo pri vnosu določenih učinkovin v telo. Razvija se pomembne nove strategije ciljnega vnosa učinkovin v telo preko tesnostične pregrade, kar že predstavlja bistven doprinos pri zdravljenju nekaterih obolenj.

LITERATURA

1. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68: 403–29.
2. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963; 17: 375–412.
3. Fujimoto K. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immuno gold labelling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci.* 1995; 108: 3443–9.
4. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 1998; 141: 397–408.
5. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, et al. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 2005; 171: 939–45.
6. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occludin junctions of human and flies. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 181–8.
7. Rehder D, Iden S, Nasdala I, et al. Junctional adhesion molecule-a participates in the formation of apico-basal polarity through different domains. *Exp Cell Res.* 2006; 312: 3389–403.
8. Gliki G, Ebneth K, Aurrand-Lions M, et al. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion module C. *Nature.* 2004; 421: 320–4.
9. Scheeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol.* 2004; 286: C1213–28.
10. Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* 2002; 16: 1835–7.
11. Stevenson BR, Begg DA. Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDVK epithelial cells. *J Cell Sci.* 1994; 107: 367–75.
12. Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, et al. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell.* 2006; 125: 535–48.
13. Vestweber D. Regulation of endothelial cell contracts during leukocyte extra vasation. *Current Opinion Cell Biol.* 2002; 14: 587–93.
14. Nelson WJ. An adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature.* 2003; 422: 766–74.
15. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 207–35.
16. Orleando RC, Lacy ER, Tobey NA, et al. Barriers to paracellular permeability in rabbit esophagal epithelium. *Gastroenterology.* 1992; 102: 910–23.
17. Tsuruta D, Green KJ, Getsios S, et al. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends in Cell Biol.* 2002; 12: 355–8.
18. Schluter H, Wepf R, Moll I, et al. Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. *Eur J Cell Biol.* 2004; 83: 655–65.
19. Vermeer PD, Einwalter LA, Moninger TO, et al. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature.* 2003; 422: 322–6.
20. Daniel JM. Dancing in and out of the nucleus: p120 (ctm) and the transcription factor Kaiso. *Biochem Biophys Acta.* 2007; 1773: 59–68.
21. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, et al. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 10779–84.
22. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004; 116: 769–78.
23. Malminen M, Koivukangas V, Peltonen J, et al. Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol.* 2003; 149 (2): 255–260.
24. Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, et al. Catenins and Zonula Occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol.* 1996; 132: 451–463.
25. Kreft M, Sterle M, Jezernik K. Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125: 475–85.
26. Kreft ME, Sterle M, Veranič P, et al. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial differentiation. *Histochem Cell Biol.* 2005; 123: 529–39.
27. Krueger S, Hundertmark T, Kuster D, et al. *Helicobacter pylori* alters the distribution of ZO-1 and p120ctm in primary human gastric epithelial cells. *Pathol Res Pract.* 2007; 203: 433–44.
28. Saadat I, Higashi H, Obuse C, et al. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature.* 2007; 447: 330–3.
29. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol.* 2006; 169: 1901–9.
30. Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006; 22: 85–9.
31. Everett RS, Vanhook MK, Barozzi N, et al. Specific Modulation of Airway Epithelial Tight Junctions by Apical Application of an Occludin Peptide. *Mol Pharmacol.* 2006; 69: 492–500.

32. Hicks RM. The fine structure of the transitional epithelium of the rat ureter. *J Cell Biol.* 1965; 26: 25-48.
33. Jezernik K, Pipan N. Blood-urine barrier formation in mouse urinary bladder development. *Anat Rec.* 1993; 235: 533-8.
34. Hu P, Deng FM, Liang FX, et al. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *J Cell Biol.* 2002; 151 (5): 961-71.
35. Kreft ME, Romih R, Kreft M, et al. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation.* 2009; 77 (1): 48-59.
36. Kreplak L, Wang H, Aebi U, et al. Atomic force microscopy of mammalian urothelial surface. *J Mol Biol.* 2007; 374 (2): 365-73.
37. Wang H, Min G, Glockshuber R, et al. Uropathogenic *E. coli* adhesin-induced host cell receptor conformational changes: implications in transmembrane signaling transduction. *J Mol Biol.* 2009; v tisku.
38. Russell LD. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat.* 1977; 148: 313-28.
39. Viores SA. Assessment of blood-retinal barrier integrity. *Histol Histopathol.* 1995; 10 (1): 141-54.

Prispelo: 16. 7. 2009