

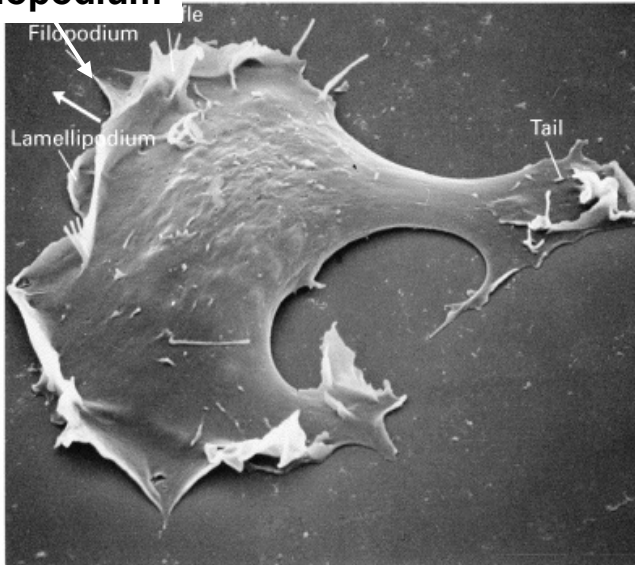
CYTOSKELET

- pohyb bunek, zmeny tvaru bunek
- pohyb organel, bunecné procesy (napr. separace chromosomu)
- vyžaduje energii (ATP)
- **CYTOSKELETON** = cytoplasmatický systém "vláken" - nutný pro bunecný pohyb, určuje tvar bunky, tvoří dráhy, podle kterých se pohybují organely, vesikly etc.,
- 3 typy cytosolických vláken: 1) mikrofilamenta (7-9 nm Ø), 2) intermediální filamenta (10 nm Ø), 3) mikrotubuly (24 nm Ø). 2) a 3) často asociovány
- **Pohyb**: 2 základní mechanismy tvorby pohybu:
 - 1) Motorové proteiny, potřebují ATP nebo GTP,
 - 2) Assembly a disassembly mikrofilament a mikrotubulu.

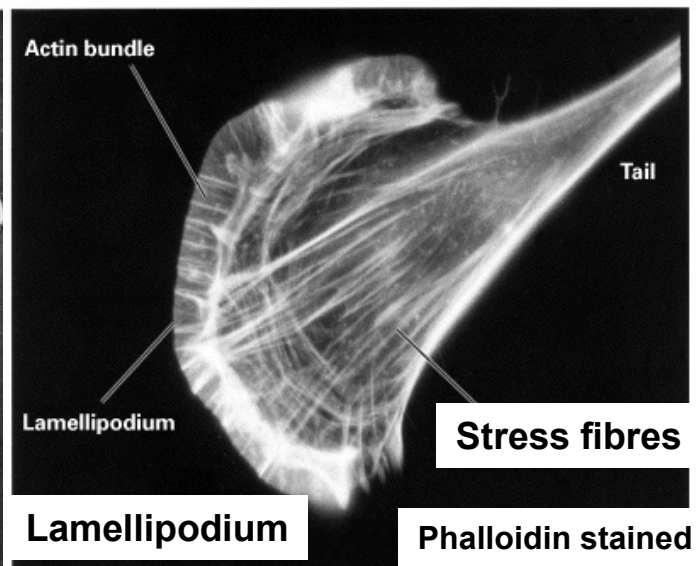
1. AKTINOVÝ CYTOSKELET (mikrofilamenta)

Bunecný pohyb - koordinace pohybu v různých částech bunky

Filopodium



(b)



Aktinové struktury fibroblastu

Aktin: nejhojnější vnitrobunecný protein EB (cca 10 % váhy celkových proteinu ve svalu; 1-5 % ostatní bunky ~ 0.5 mM)
napr. jaterní bunka 2×10^4 molekul insulinového receptoru X
 5×10^8 aktinových molekul
kódován konservativní skupinou genu (napr. lidský genom 6 genu
kvasinky 1 gen)

Arps geny (actin-related proteins) - cca 50 % homologie s aktiny

Struktura mikrofilament

Formy aktinu: G-aktin = globulární monomer

F-aktin = filamentární polymer - mikrofilamenta

- každá molekula aktinu obsahuje Mg^{2+} ion +ATP nebo ADP
tj. 4 stavy aktinu **ATP-G aktin**, ADP-G aktin, ATP-F aktin, **ADP-F aktin**
- přidání iontu (Mg^{2+} , K^+ , Na^+) indukuje polymeraci G-aktinu do filament F-aktinu (reversibilní), provazeno hydrolyzou ATP

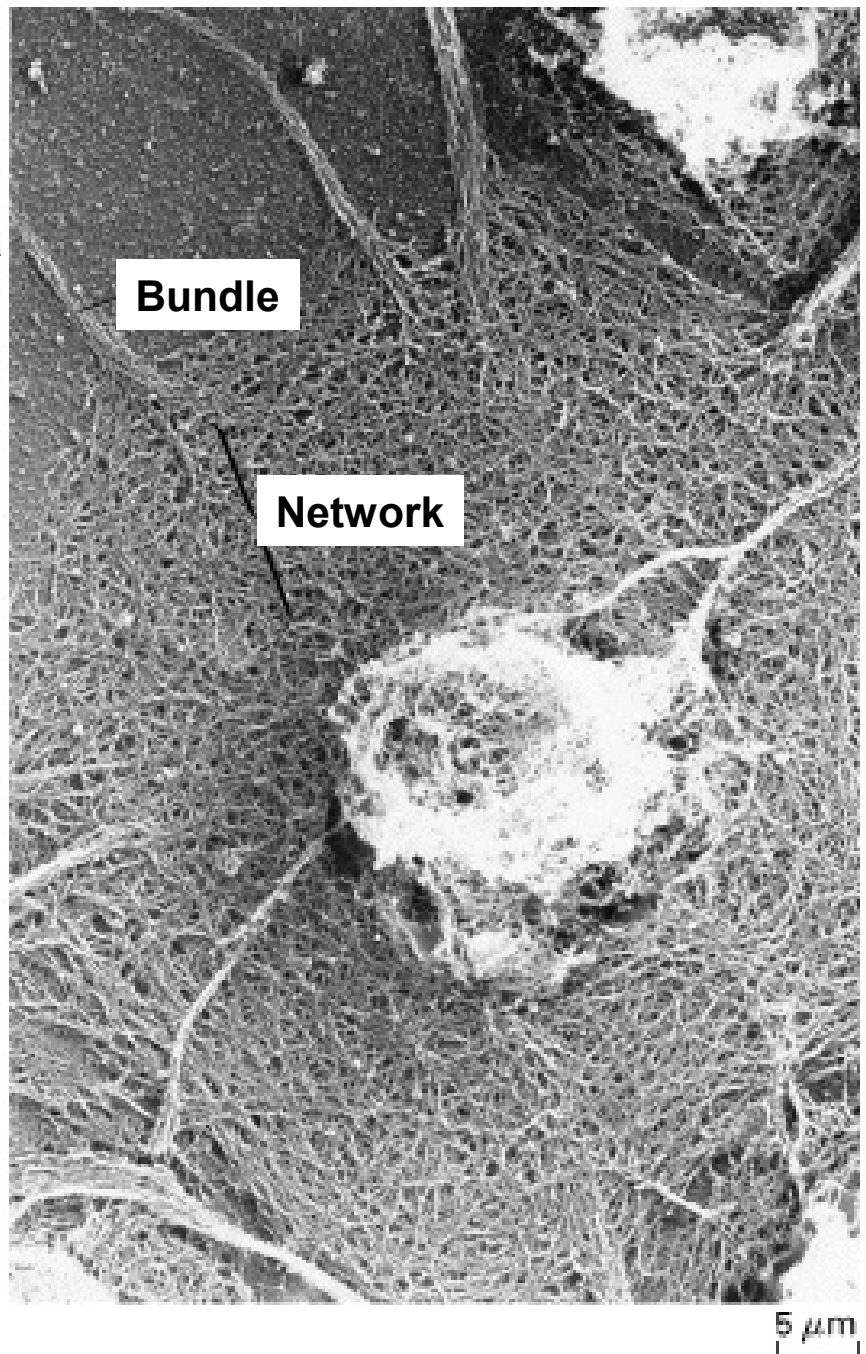
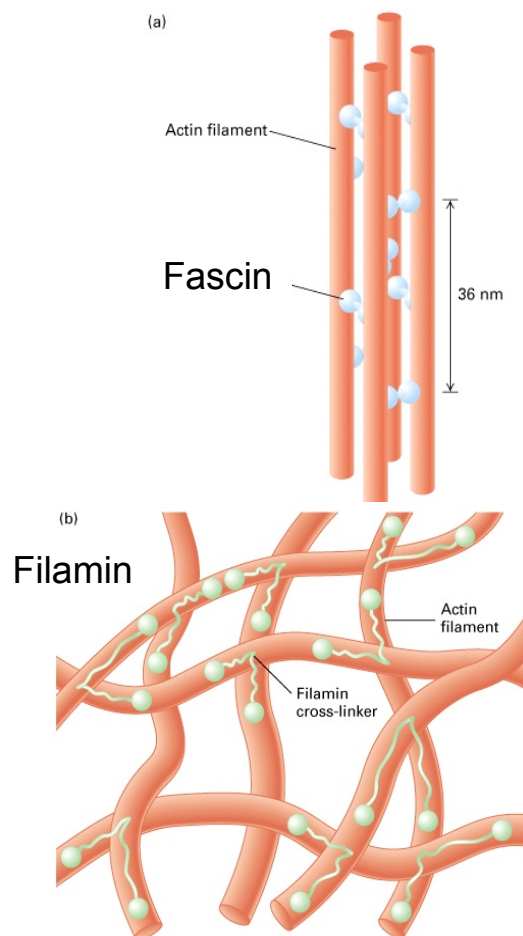
Bundles (svazky)

Networks (sítě)

- určují tvar bunek

Aktin-cross-linking proteins

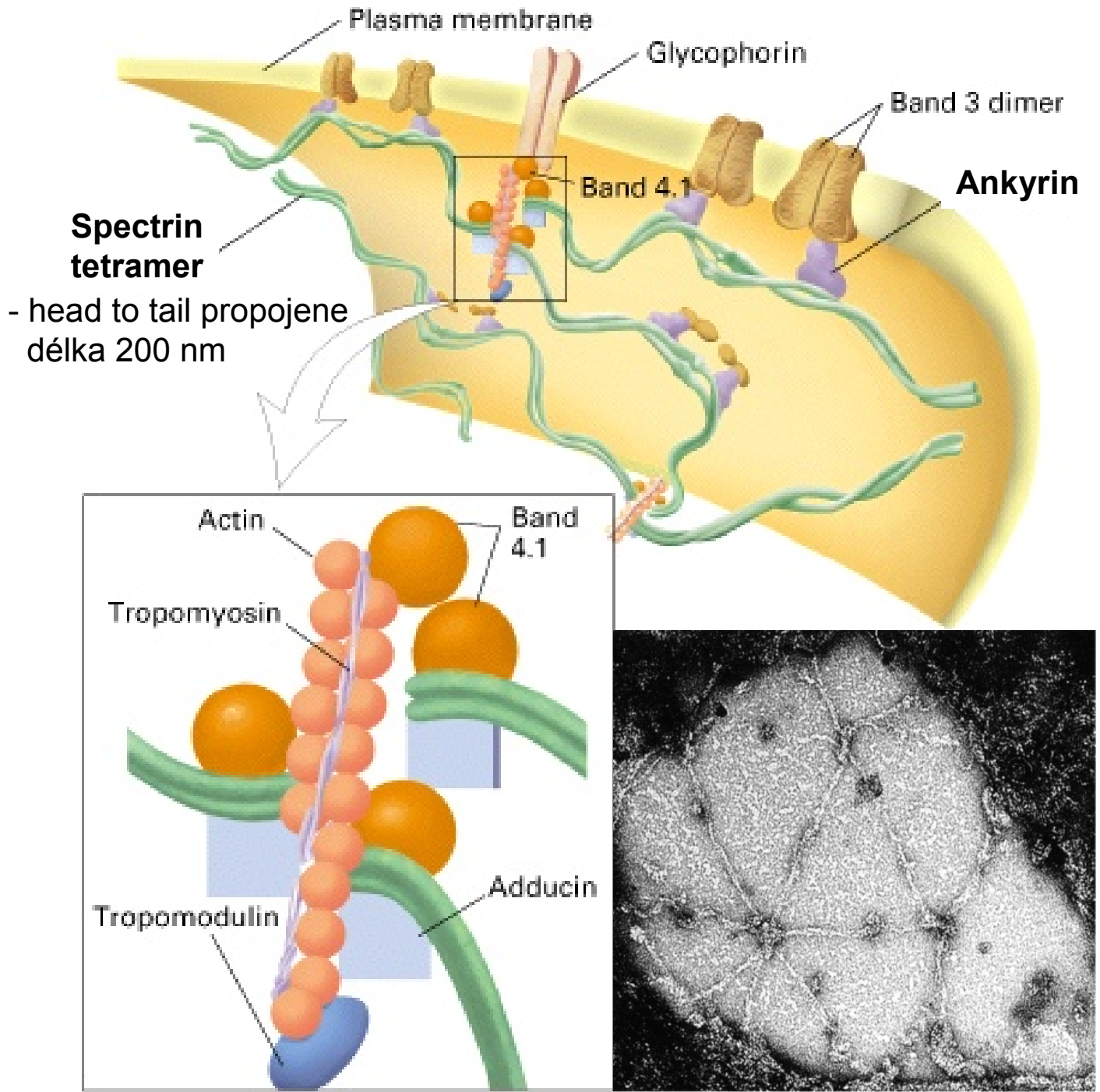
- 2 (nebo víc) aktin vazebná místa



Propojení filament k membránu

membrane-microfilament binding proteins, kortex - oblast pod membránou

Erythrocyty

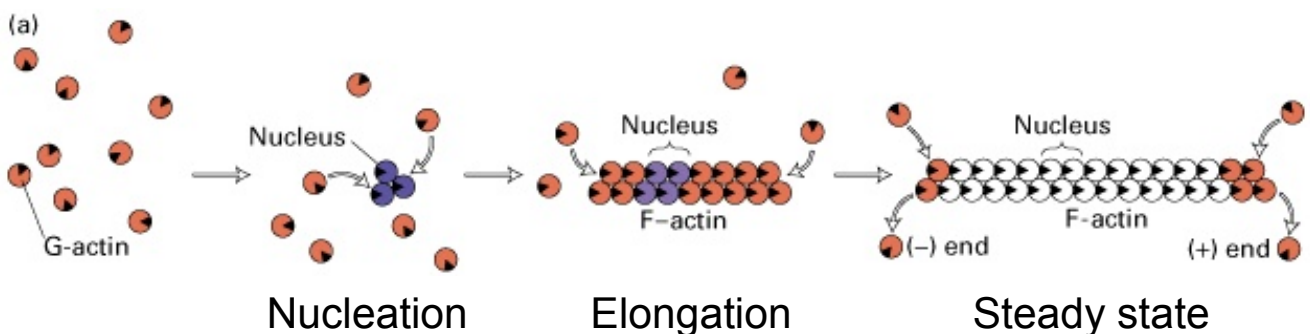


Junctional complexes

Actin assembly

3 fáze:

- 1) Lag period - G-aktin agreguje do krátkých, nestabilních oligomerů fungujících jako “nukleacní centrum”
- 2) Fáze rychlé elongace do filamenta (aktinové monomery se přidávají k oběma koncům). Koncentrace G--aktinu klesá až do vyrovnání s koncentrací filamentárního aktinu.
- 3) Fáze “steady state” - G-aktin monomery vyměňují podjednotky na konci filamentu X délka filamentu se nemění,
Rovnovážná koncentrace = “Kritická koncentrace” (C_c) *in vitro* = $0.1\mu\text{M}$



- Po inkorporaci ATP-G-aktinu - pomalá hydrolyza ATP. Tj. Většina filamentu je z ADP-F-aktinu X na koncích ATP-F-aktin
- ATP hydrolyza není esenciální pro polymeraci (ADP-G-aktin polymeruje)
- F-aktin - polární: + konec se prodlužuje 5-10 x rychleji než - konec.
Dáno rozdílnou C_c na obou koncích

Kritická koncentrace závisí na tom, zda jsou monomery vázány s ATP nebo ADP. Při inkorporaci ADP-monomeru - oba konce se prodlužují pomaleji (jako - konec)

Regulace polymerace aktinu:

Thymosin β_4 : inhibice assembly, váže ATP-G-aktin, který nemůže pak polymerovat

Profilin: podporuje assembly:

- 1) váže ATP-G-aktin - pomáhá připojování monomeru k + konci aktinového filamenta, poté disociuje z komplexu
- 2) Profilin interaguje s membránovými komponentami b. signalisace (PIP2)
? Kontrola assembly na plasmatické membráně, PIP2-profilin se neváže na G-aktin.
- 3) Profilin funguje jako nucleotide-exchange faktor. Jediný aktin vazebný protein, který umožňuje výměnu ADP za ATP.

Kontrola délky filament

- koncentrace aktinu preferuje tvorbu filament - pro "rozbití" existujících filament a jejich síte - protein **gelsolin** a **cofilin**
- mechanismus ? - vazba na podjednotky, změna jejich konformace a prerušení vazeb mezi nimi
- po prerušení vazby zůstane "rozbíjejí" protein vázán na + konci a brání prodluzování retezce (**capping funkce**). - konec se zkracuje

Stabilisace filament - **Actin-capping proteiny** (váží se na konce, neumí filamenta rozbíjet)

Aktin motor protein - Myosin

- 13 clenu myosinové genové rodiny, myosin I a II nejcastejsí

1 nebo 2 (a)
tezké retezce

Globulární hlava:
- actin a ATP
vazebná místa
konservativní

Ruzné lehké
retezce
- calmodulin
- jiné Ca^{2+}
vazebné proteiny

Vsechny myosiny
- regulovány nejak Ca^{2+}
X reagují odlišne na koncentraci Ca^{2+}
- ATPasová aktivita - aktivována aktinem (4-5x), lokalizována v globulární hlavě

Myosin I
Monomer

Myosin II
Dimer

Myosin V
Dimer

Head Neck Tail

Obsahuje specifická
vazebná místa pro
specifické funkce
různých myosinu

Calmodulin
light chains

130 nm

Regulatory
light chain

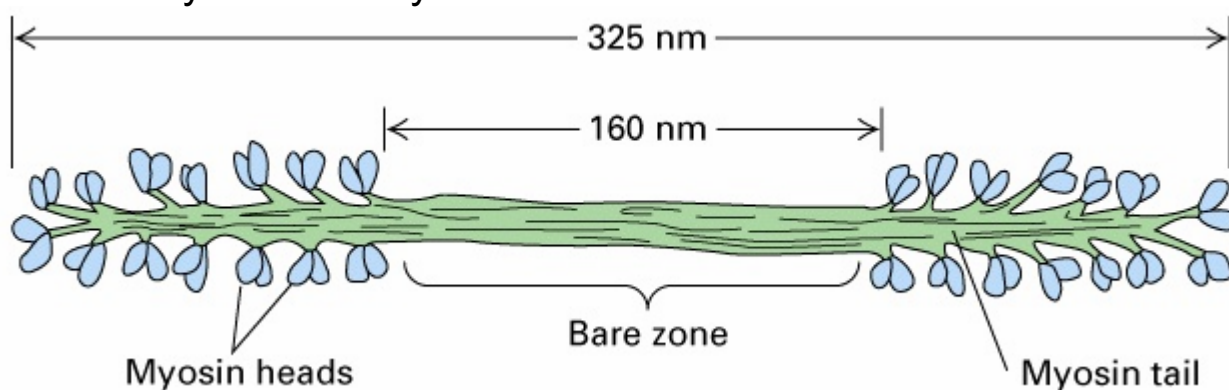
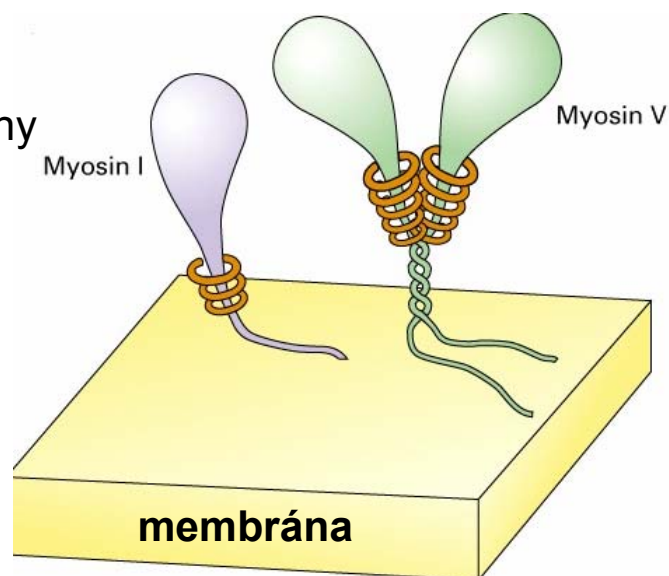
Essential
light chain

Ca^{2+} vazebný protein

Calmodulin light chains

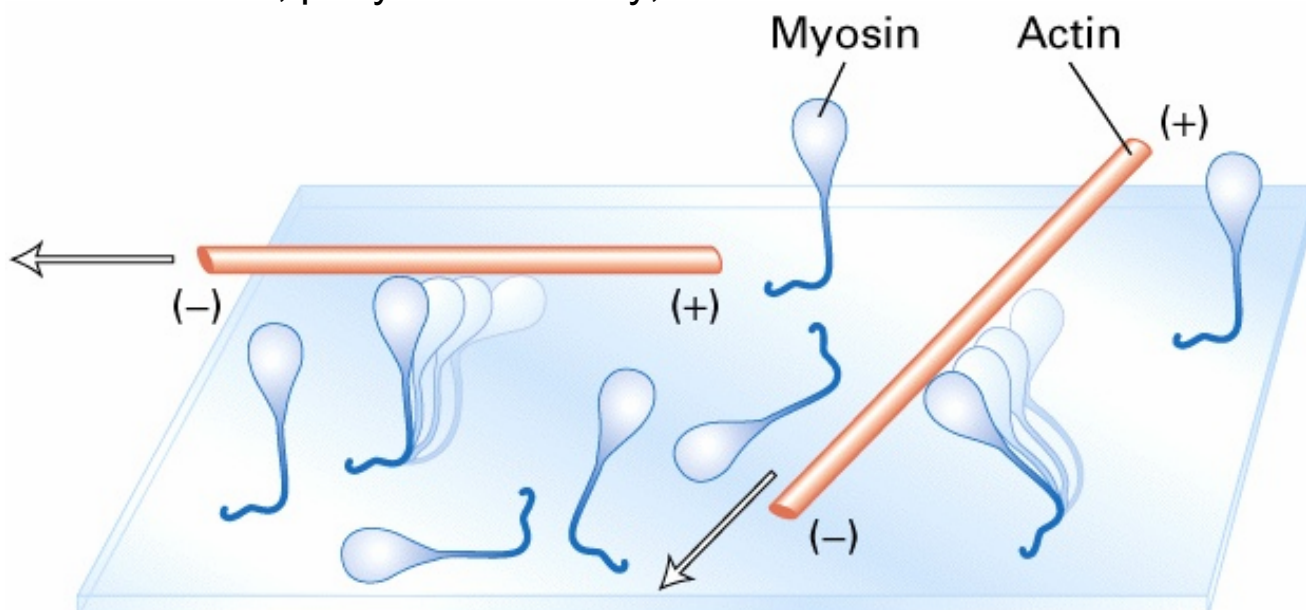
Ocásek - určuje roli myosinu
 Myosin I a II - vazba na membrány
 Myo I včetně membrán GA -
 ? Transport vesiklu

Tvorba silných filament-
 (myo II) - role při svalové
 kontrakci-
 - mnoho myosinových hlav
 muze interagovat soucasne
 s aktinovými filamenty



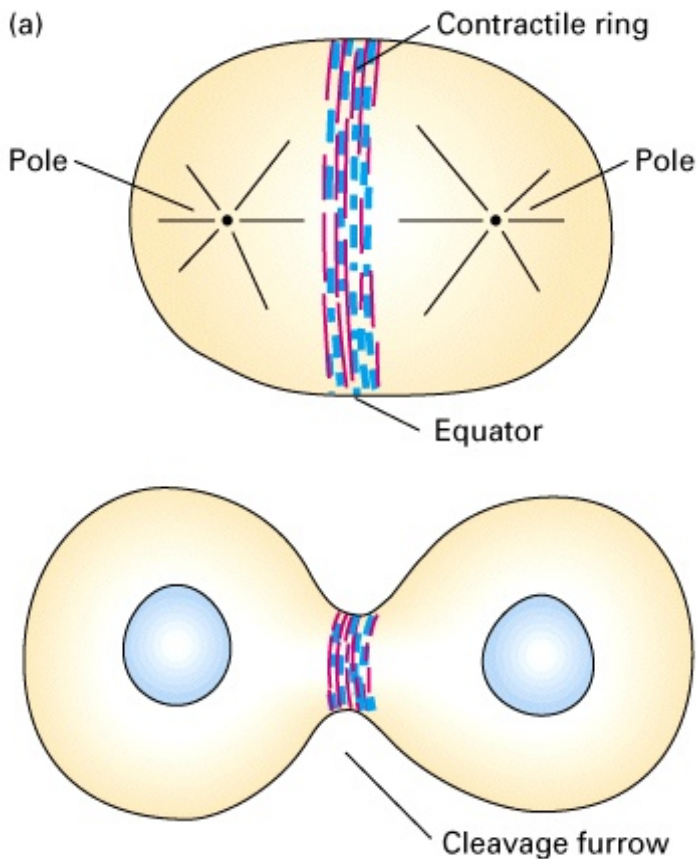
Myosinové hlavy se pohybují podél aktinových filament

Pohyb na sklicku - fixace myosinu - pohybují se aktinová vlákna při
 dodání ATP, pohyb orientovaný, smerem k - konci

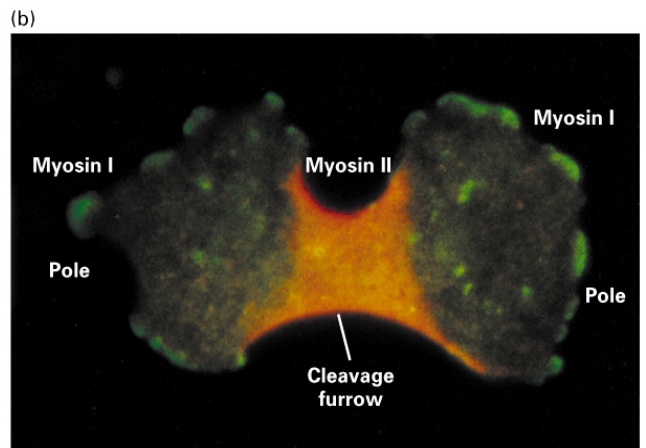


Aktin a myosin II důležité pro cytokinesi

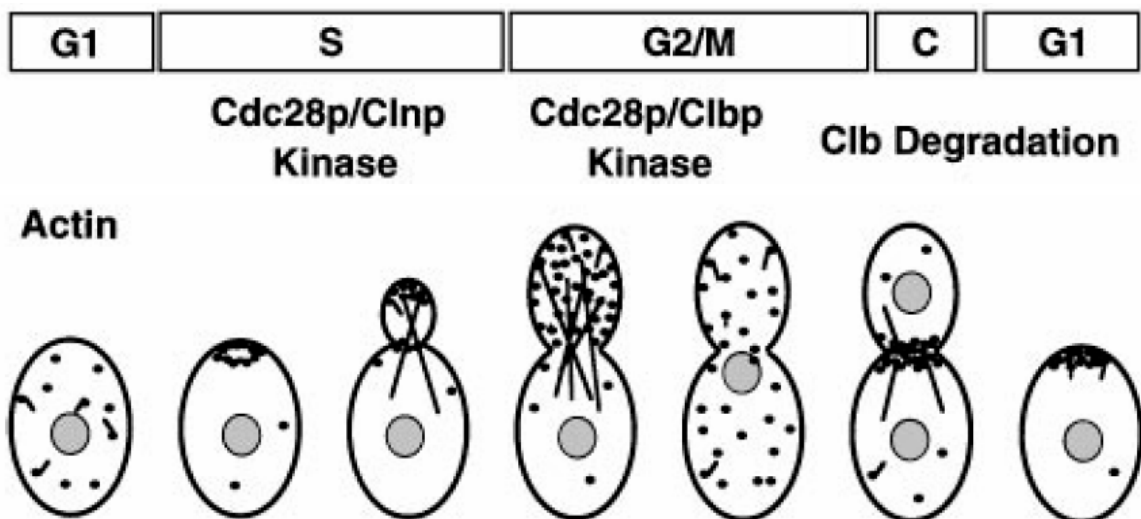
Savčí buňky



Při mitose aktin a myosin II akumulace ve středu dělící se buňky - **KONTRAKTILNÍ RING** - zkracování při cytokinesi



Kvasinky

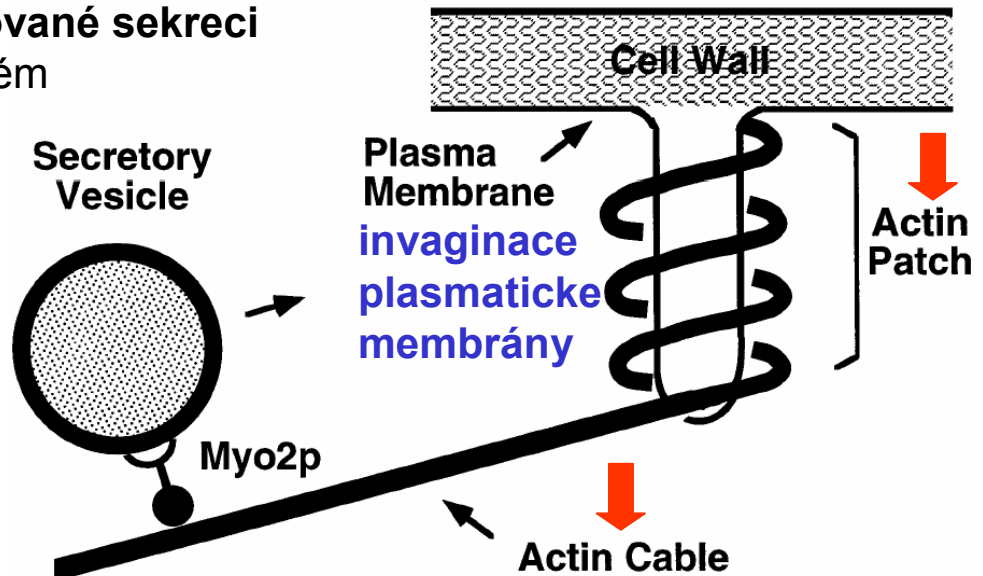


AKTIN \Rightarrow Dynamická lokalisace během buněčného cyklu \Rightarrow regulace Cdk kinasami

Pohyb vesiklů podél aktinu (myosin I a V)

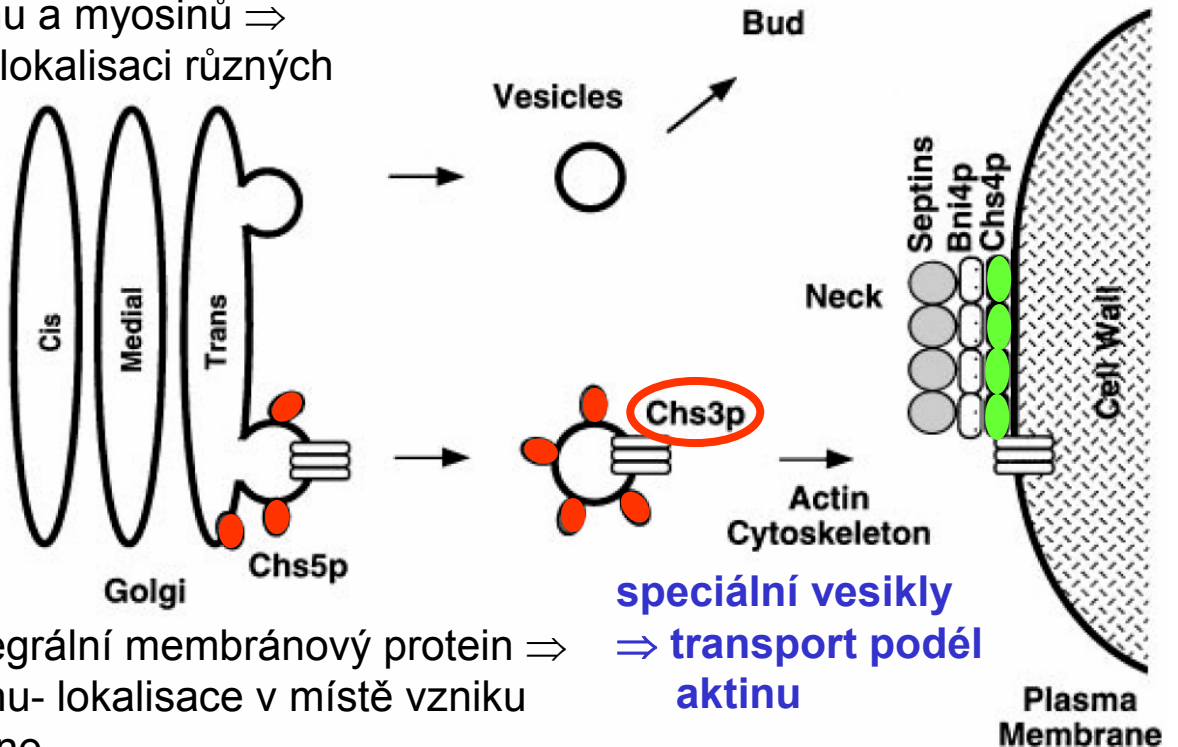
AKTIN \Rightarrow 2 formy \Rightarrow “actin patches” a actin “cables” (prochází podél buňkou)

Role při **polarizované sekreci**
např. při buněčném cyklu



Kvasinky

Mutanty aktinu a myosinů \Rightarrow různě ovlivní lokalizaci různých vesiklů



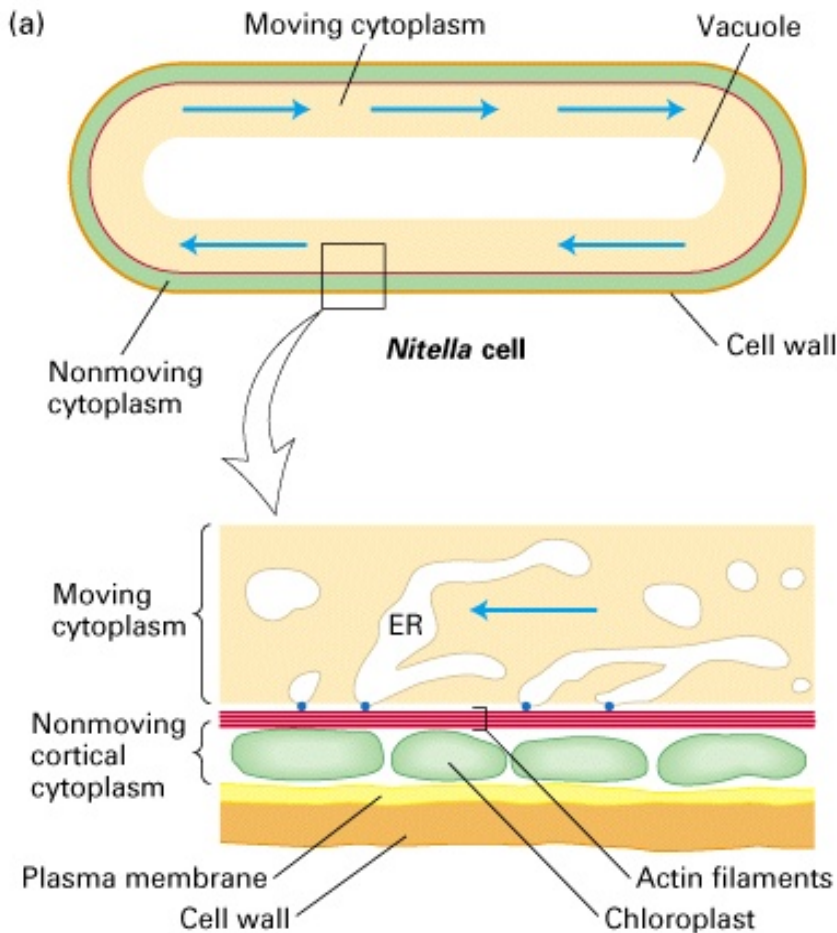
Chs3p \Rightarrow integrální membránový protein \Rightarrow syntéza chitinu- lokalizace v místě vzniku nového pupene

speciální vesikly
 \Rightarrow transport podél aktinu

Chs5p \Rightarrow nutný pro lokalizaci Chs3p (protein GA) + **role Myo2p**

Chs4p \Rightarrow součást komplexu v místě tvorby pupene \Rightarrow interakce s Chs3p

Pohyb cytoplasmy



Membránově vázaný myosin - důležitý pro fenomen "cytoplasmic streaming" - zelené řasy Nitella, Chara)
- pohyb cytoplasmy - cca 4.5 mm/min

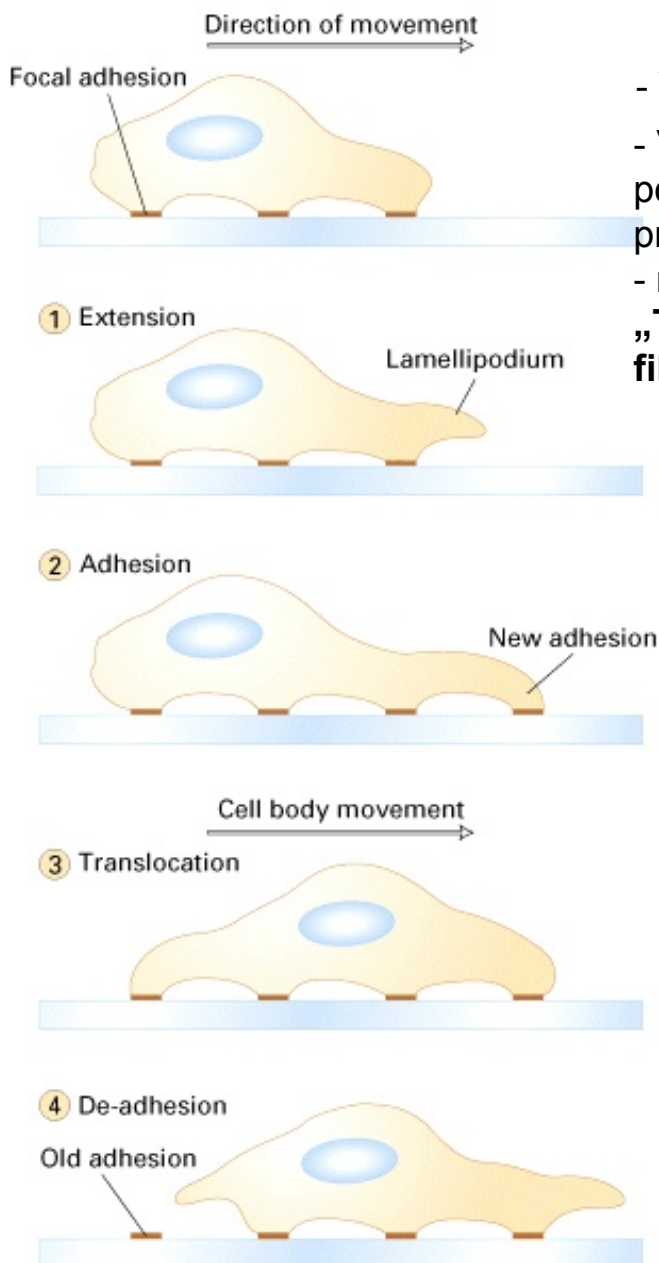
- mechanismus distribuce buněčných metabolitů (především u velkých buněk - rostlinné buňky, amoeby)

Pohybující se cytosol - také pohyb ER, vesikul

Pohyb nejpomalejší v centru - zvyšuje se k povrchu b.- motor generující pohyb leží u membrány - svazky aktinových filament vedle chloroplastů vázaných na membránu, na ně vázány vesikly ER
- myosiny vázané na ER - pohyb cytosolu

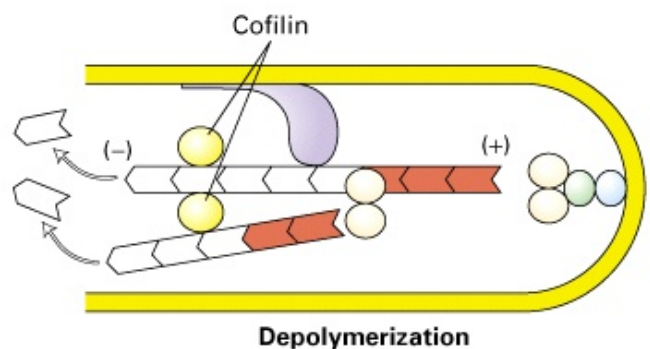
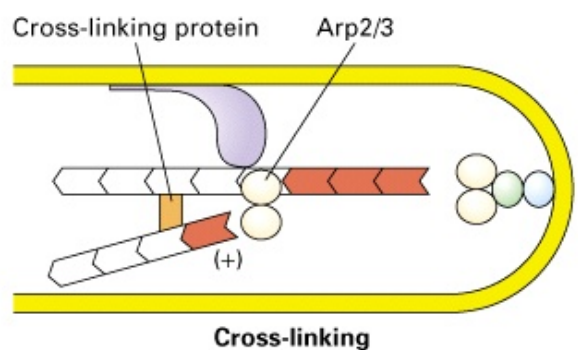
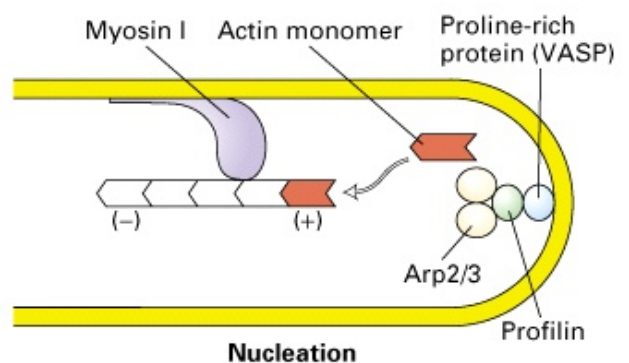
BUNĚČNÝ (AKTINOVÝ) POHYB

- pohyb buněk po pevném povrchu
- Keratinocyty a fibroblasty - změny morfologie - vazba na substrát, pohyb cytosolu, tvorba lamelipodia



- Vazba na substrát
- Vysunutí lamelipodia - kontrolovaná polymerace aktinových filament a jejich propojení do svazků a sítí
- regulace „vychlípení“ membrány ?
- „**Tlaková**“ síla polymerujících aktinových filament ?

- polymerace aktinu na + konci stimulována profilinem lokalizovaným na membráně (- vychlípení membrány) + role dalších proteinů v regulaci směru assembly (Vasp, Arp2/3)
- + role myosin - vazba na membránu



Po vychlípení membrány - vazba na pevný povrch - nové adhesní místo (ukotvení aktinových svazků) - vazba na povrch a zabránění se retrakci.
- Uvolnění starého adhesního místa

POHYB AMOEB

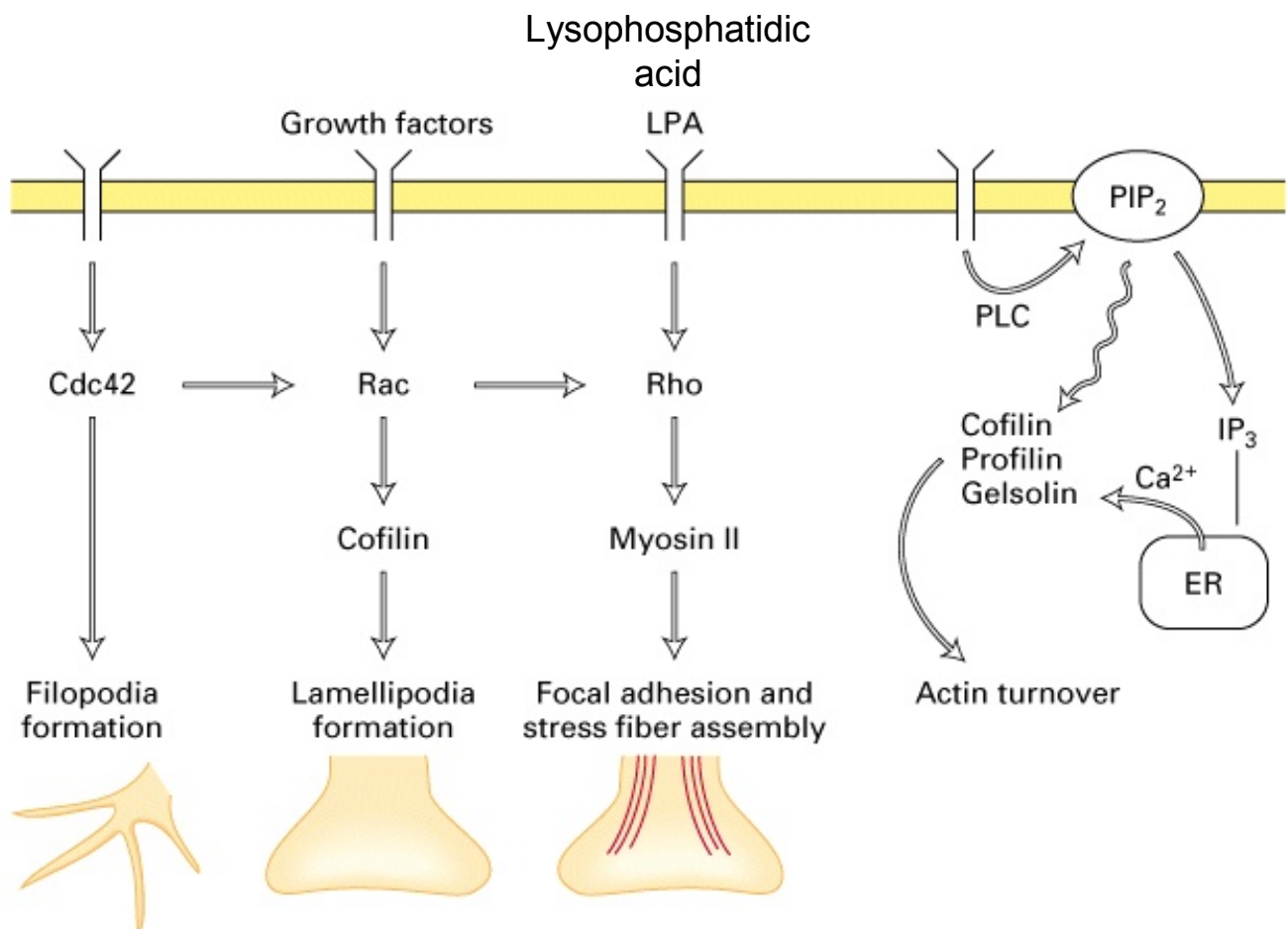
- vysunutí pseudopodií (podobné lamelipodiím),
- pohyb porvázen změnami viskozity cytosolu (sol-gel přechod) - assembly a disassembly aktinových sítí

REGULACE POHYBU BUNĚK

Buněčná polarita - směr pohybu, otočení buňky (změna směru pohybu) - změny směru tvorby lamelipodia nebo pseudopodia,
 - mutanty myosinu I - tvorba lamel všemi směry - buňky neschopné směrovaného pohybu

Signály koordinující procesy probíhající „vpředu“ buňky s procesy, které jsou „vzadu“ v buňce.

Ras related proteiny - Rac, Rho, Cdc42

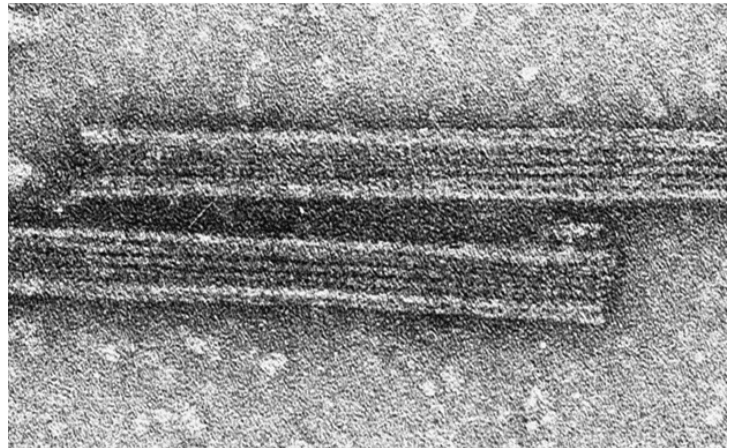


2. MIKROTUBULY A INTRAMEDIALNI FILAMENTA

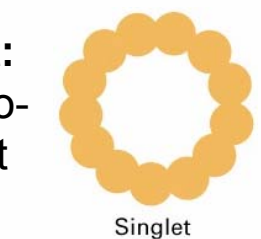
- často se překrývají x plní různé funkce
- mikrotubuly - role v řadě pohybu buněk i uvnitř buněk
- inermediální filamenta - strukturální funkce - vazba na plasmatickou membránu přes membránové proteiny, integrace buněk do tkání

MIKROTUBULY

- polymery **tubulinu**
- heterodimer α a β tubulinu**
- velmi konservované
- α -tubulin - vazba GTP ireverzibilně - nedochází k hydrolyse
- β -tubulin - vazba GTP reversibilní, hydrolysa na GDP, může být vymeněno za GTP
- γ -tubulin** - není součástí tubulinové subjednotky, asi ji pomáhá tvořit

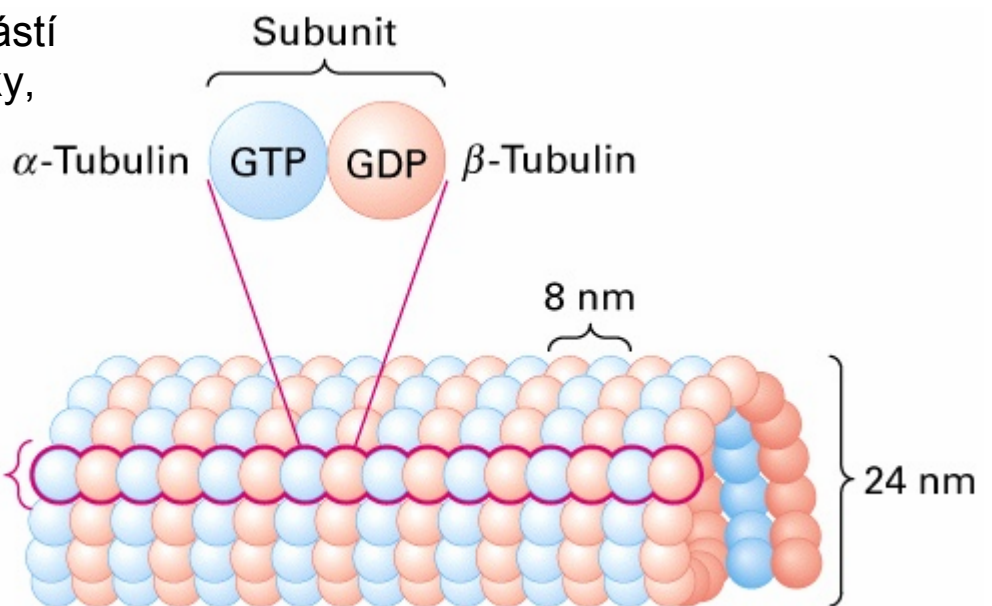


Singlet:
13 proto-filament

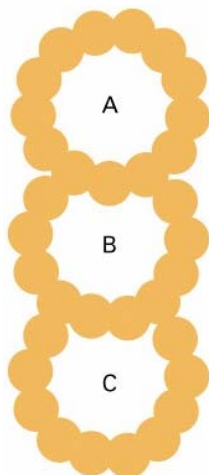


Singlet

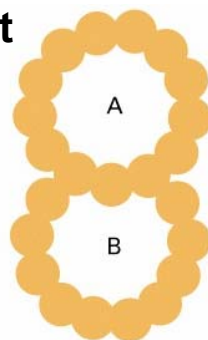
Protofilament



Triplet
centrioly
basální
telíska



Doublet
cilia
flagella



Mikrotubuly - polární struktury - dány head to tail orientací α a β tubulinových dimeru
 α -tubulinový konec
 β -tubulinový konec

MIKROTUBULY

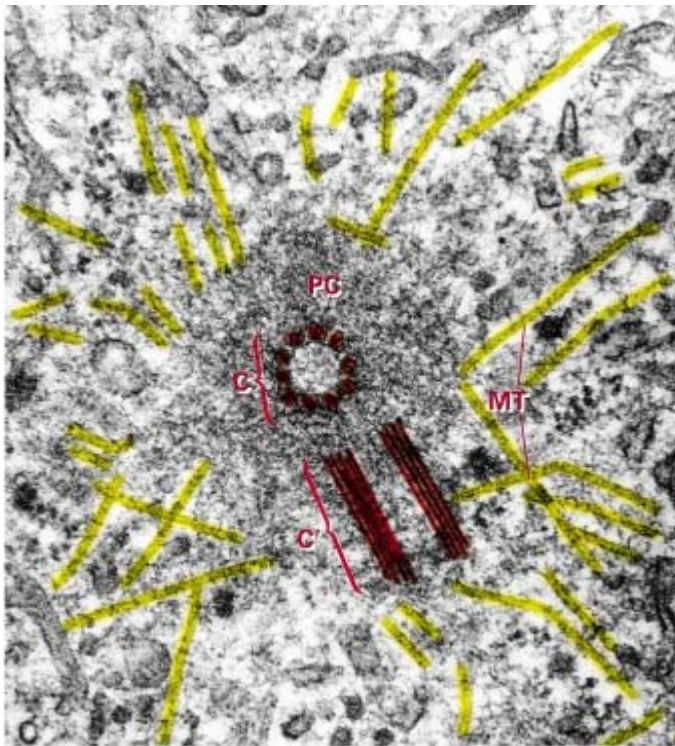
- 2 populace - **stabilní** (dlouhá doba existence) a **nestabilní** (krátká doba existence)

assembly mikrotubulu:

- **microtubule organising centre (MTOC)**

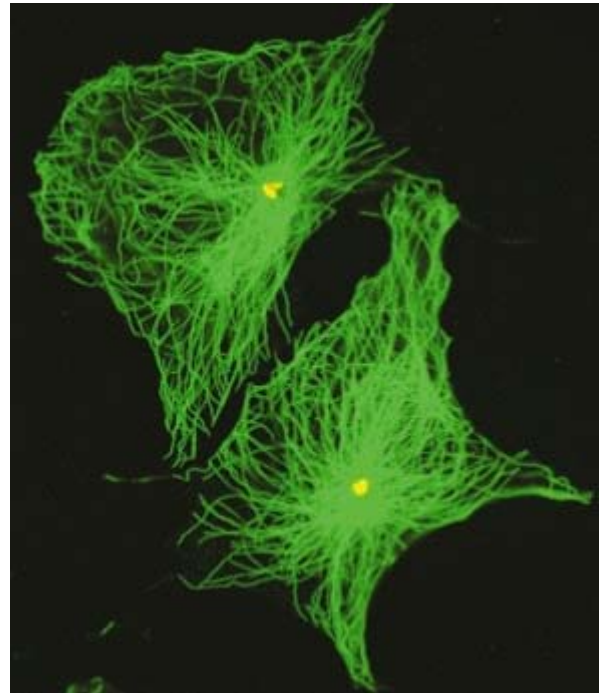
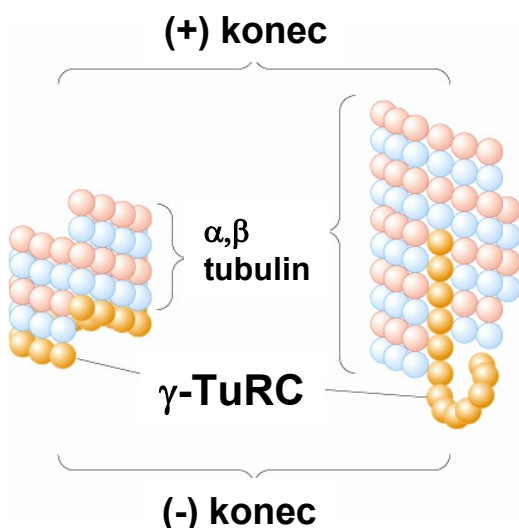
savčí bunky MTOC = centrosom

- mikrotubule associated proteins

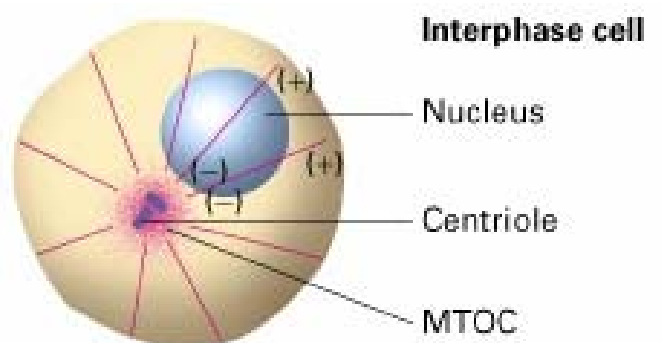


Polarisované bunky

- obsahují velké množství MTOC
- distribuovány uvnitř buněk

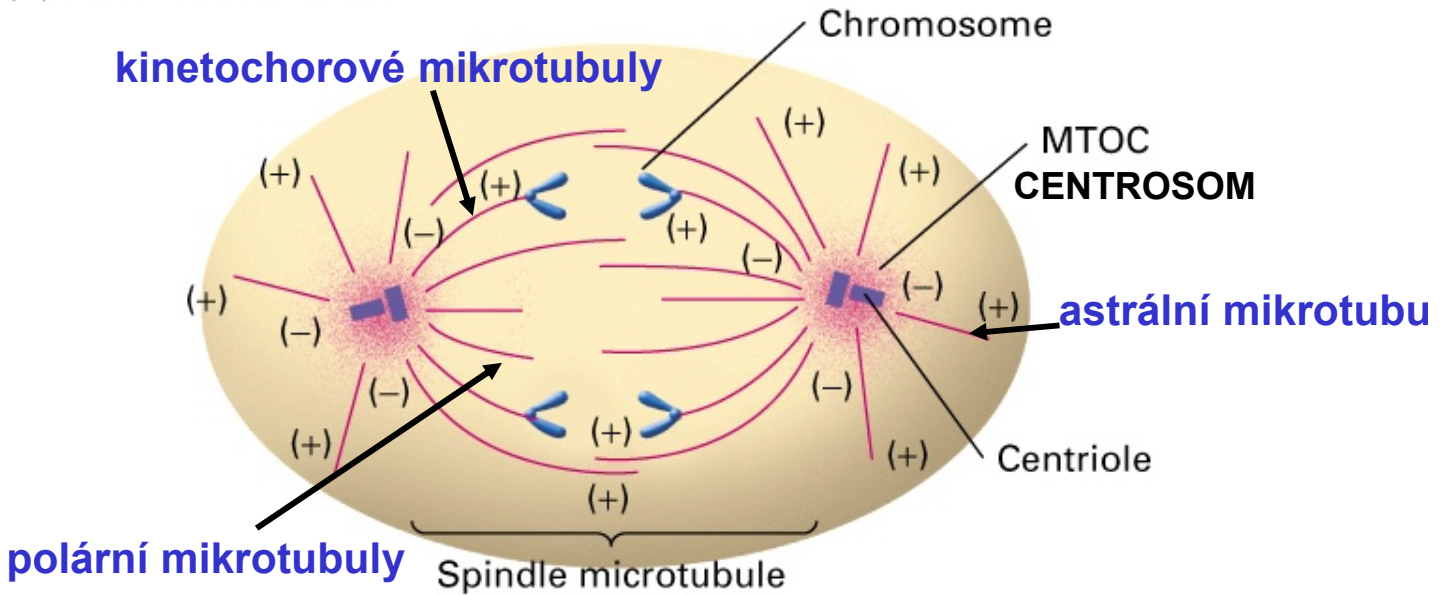


- konce mikrotubulu asociují s centrosomy, role v nukleaci assembly mikrotubulu
- nepolarisované bunky - MTOC je perinukleárně umístěn (v centru buňky)
- fixuje polaritu mikrotubulu - konec směrem k MTOC



γ -tubulin - lokalizován v MTOC - nutný pro nukleaci tubulinových podjednotek
 γ -tubulin ring complex (γ -TuRC)

(b) **Mitotic animal cell**



KVASINKY

Mitotický spindle

⇒ bipolární struktura:

spindle pole body (SPB) (jaderný obal) (analogie centrosomů vyšších EB = cytoplasmaticky lokalizované)

mikrotubuly ⇒ polarisace ⇒

“-” konec (“nerostoucí”)

⇒ asociovaný s SPB

“+” konec (“assembly”) ⇒ chromosomy

Spindle mikrotubuly: 3 třídy

“kinetochorové mikrotubuly”

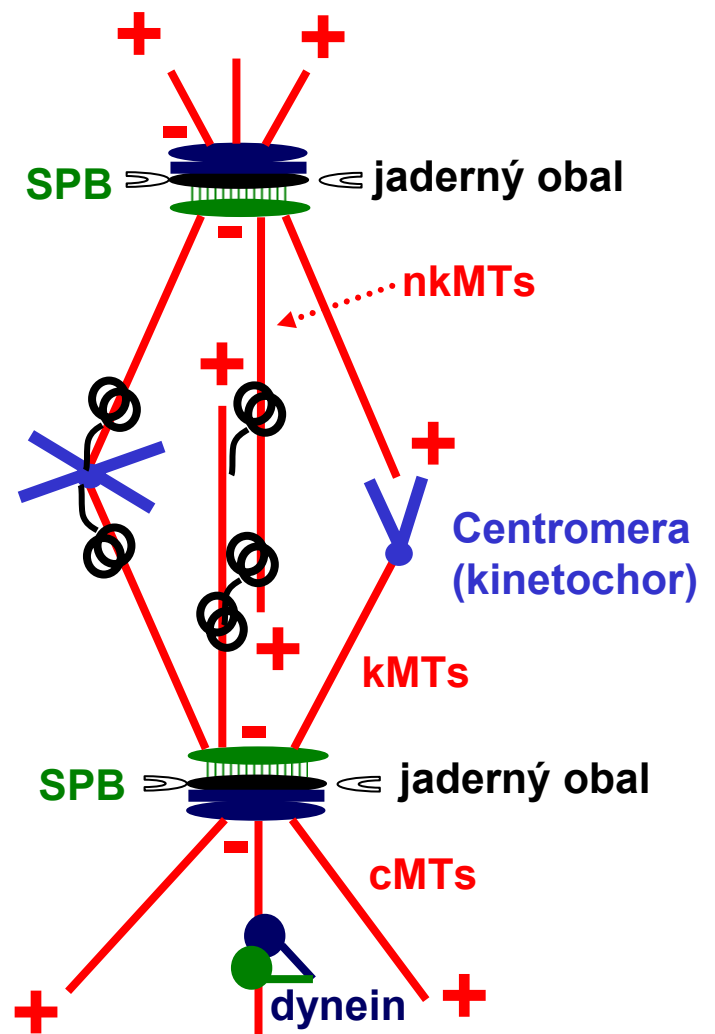
(kMTs) ⇒ terminace na kinetochorech (centromerach)

“ne-kinetochorové mikrotubuly”

(nkMTs) ⇒ interakce s antiparalelními nkMTs z opačného pólu

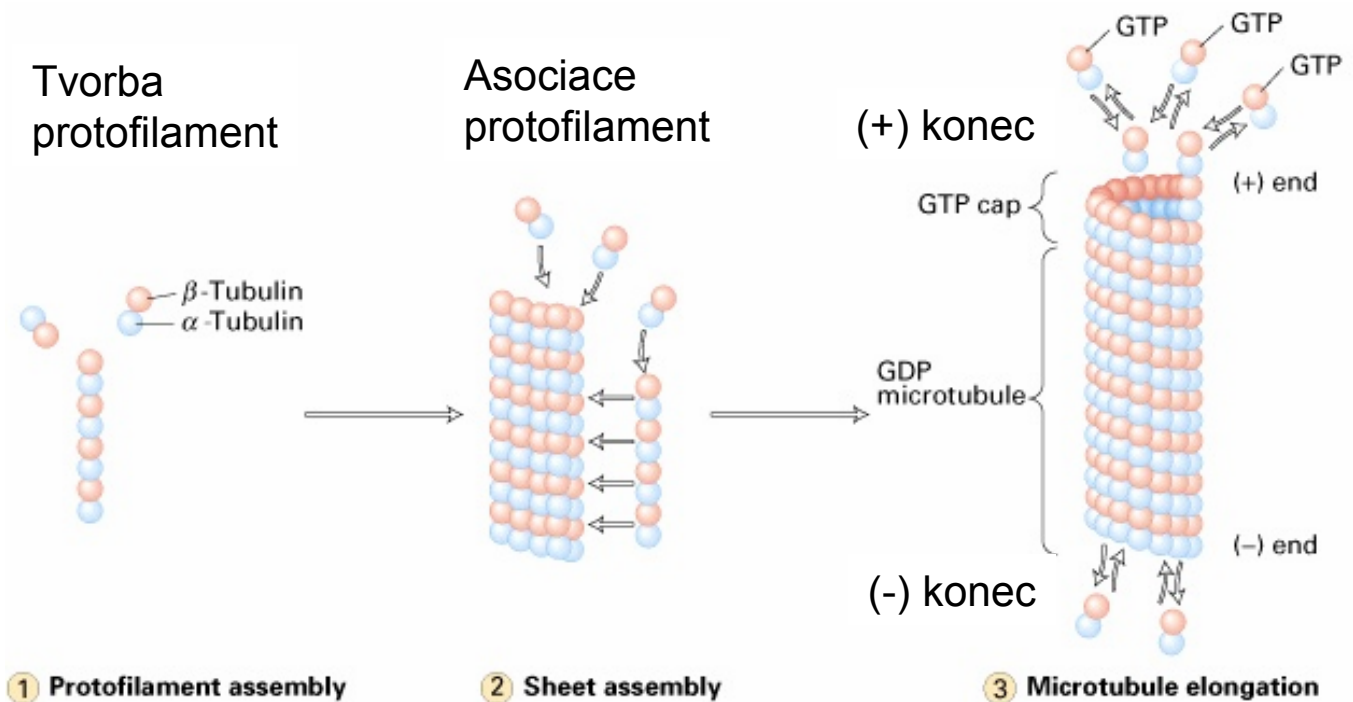
“cytoplasmatické mikrotubuly”

(cMTs) = astrální MT u vyšších EB



Dynamika mikrotubulu a asociované proteiny

- mikrotubuly - oscilace mezi fází růstu a zkracování
- assembly a disassembly - probíhá prednostne na (+) konci
- Kritická koncentrace (podobne jako u mikrofilament)



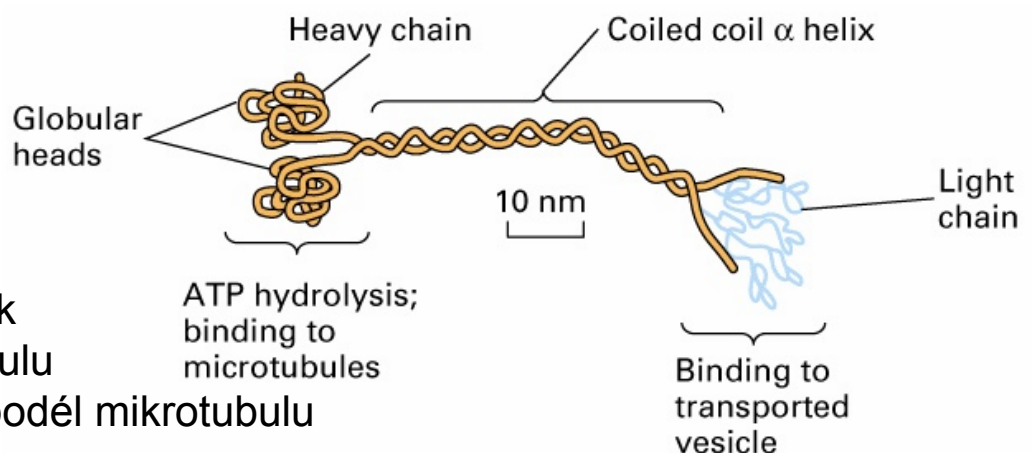
Microtubule associated proteins (MAPs)

- “Assembly MAPs”** - zodpovedné za cross-linking mikrotubulu v cytosolu - basická mikrotubule vazebná doména + acidická doména (vazba na membrány, intermediální filamenta, jiné mikrotubuly ..)
- mohou ovlivňovat dynamiku mikrotubulu

Motor proteiny

1) Kinesin -

- dimer 2 těžkých řetězcu + 2 lehké řetězce
- orientace pohybu k (+) konci mikrotubulu
- transport vesiklu podél mikrotubulu
- 2 typy kinesinu



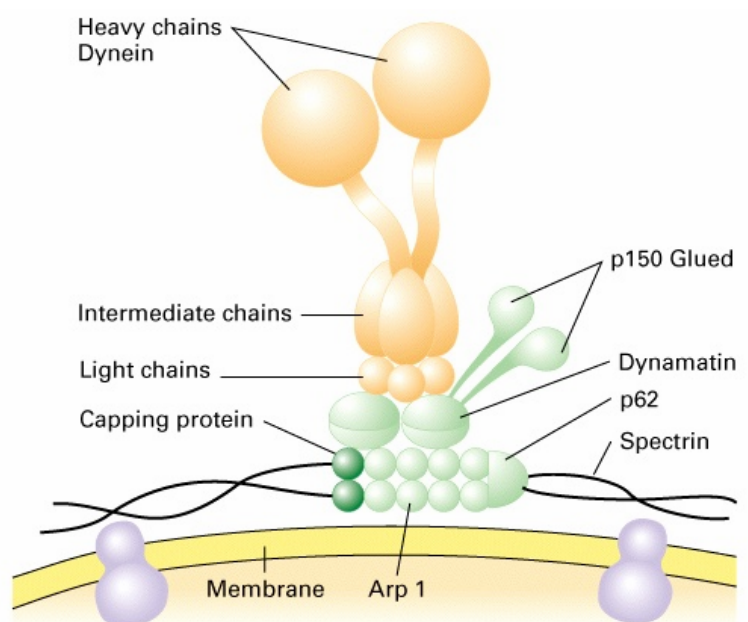
- cytosolické (transport vesiklu a organel)
- spindle (podílejí se na assembly spindle a segregaci chromosomu)

1) Dynein - pohyb smerem k (-) polu mikrotubulu, multimerní proteiny
2 skupiny:

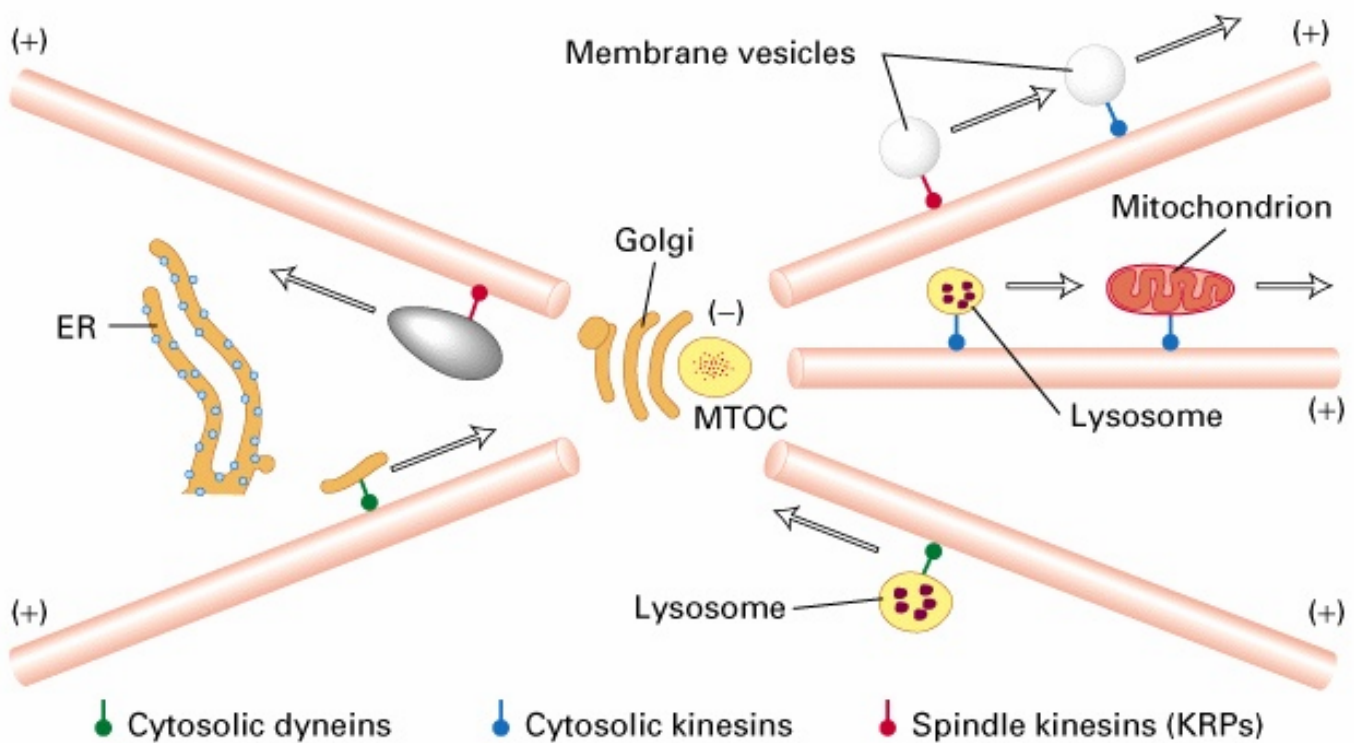
a) cytosolické dyneiny (pohyb vesiklu a chromosomu)

b) axonemální dynein (pohyb cilií a flagel)

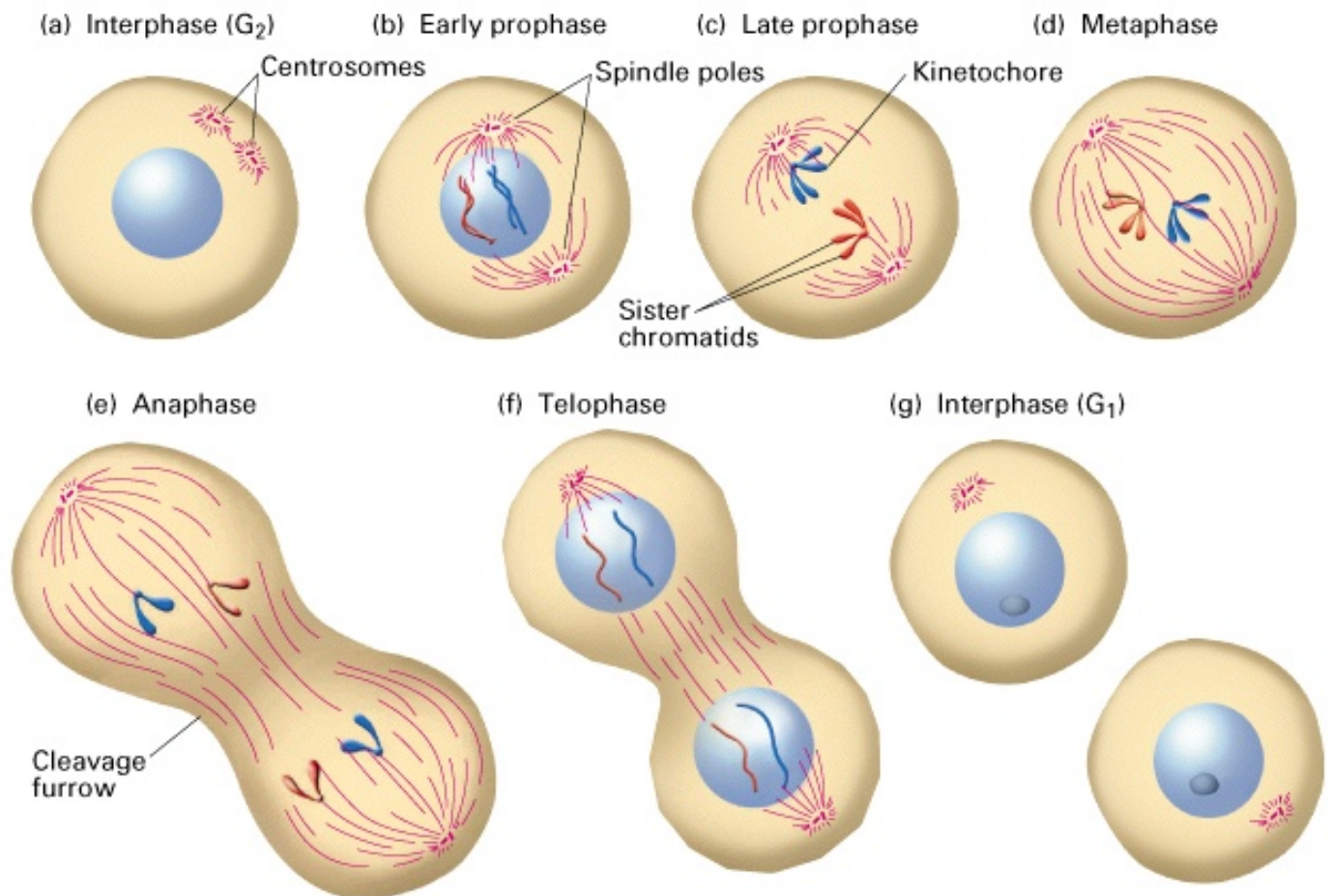
- pohyb pomocí dyneinu
vyžaduje komplex s
mikrotubuly vazanými
proteiny - napr. komplex
dynactin



Kinesiny a dyneiny zprostředkovaný transport

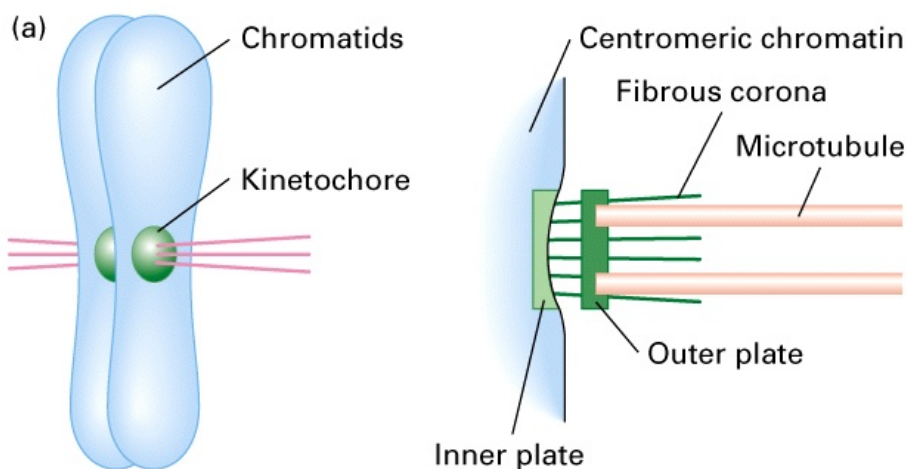


MIKROTUBULY A MOTOROVÉ PROTEINY PŘI MITOSE

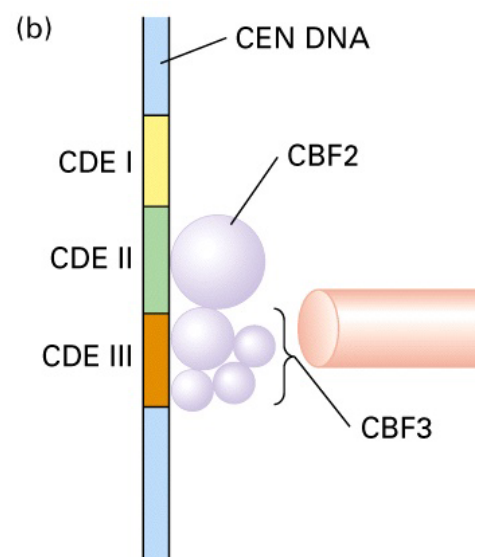


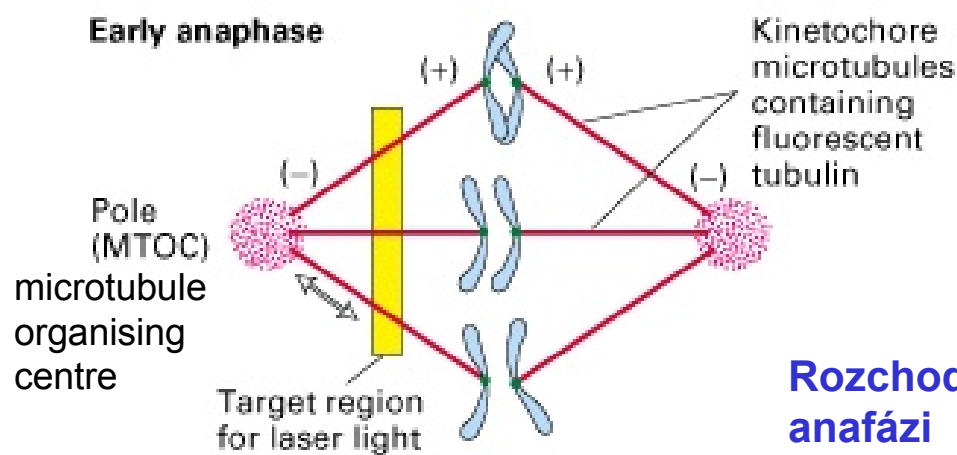
Kinetochoř a centromera

Savčí buňky a nižší rostliny - kinetochoř 3 vrstvy - váže + konec mikrotubulů

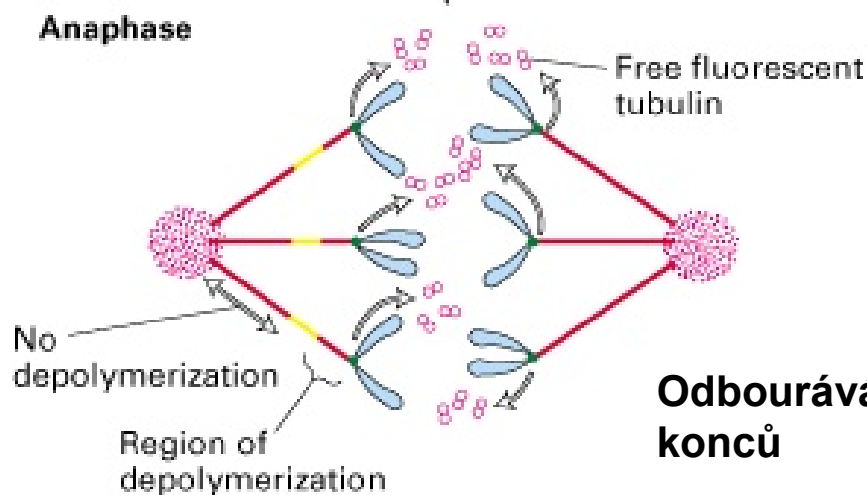
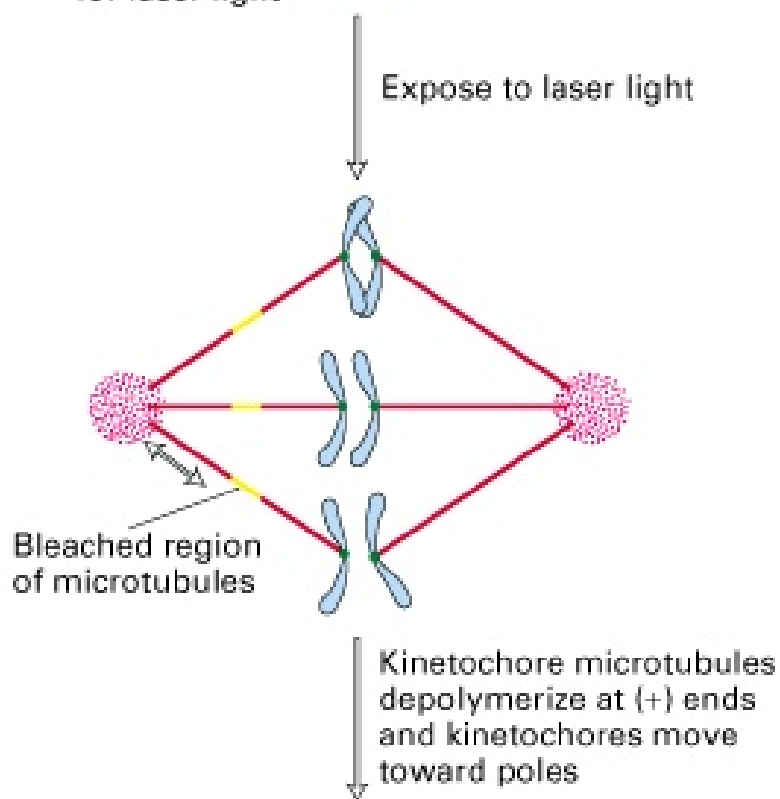


Kvasinkové centromery





Rozchod chromosomů při anafázi



Odbourávání z kinetochorových konců

INTERMEDIÁLNÍ FILAMENTA

- u všech mnohobuněčných eukaryot, ? Nižší EB
- epidermální buňky a axony neuronů - 10 x víc IF než mikrotubulů a mikrofilament
- Strukturní funkce - zpevnění buněk a jejich organizace do tkání, mechanická podpora membráně
- neparticipují na buněčné motilitě
- velmi stabilní - i při extrakcích (x mikrotubuly a mikrofilamenta se rozpadnou)
- tloušťka 10 nm (mikrotubuly 24 nm, mikrofilamenta 7 nm)
- IF podjednotky neváží nukleotidy a jejich assembly nevyžaduje GTP nebo ATP hydrolysu

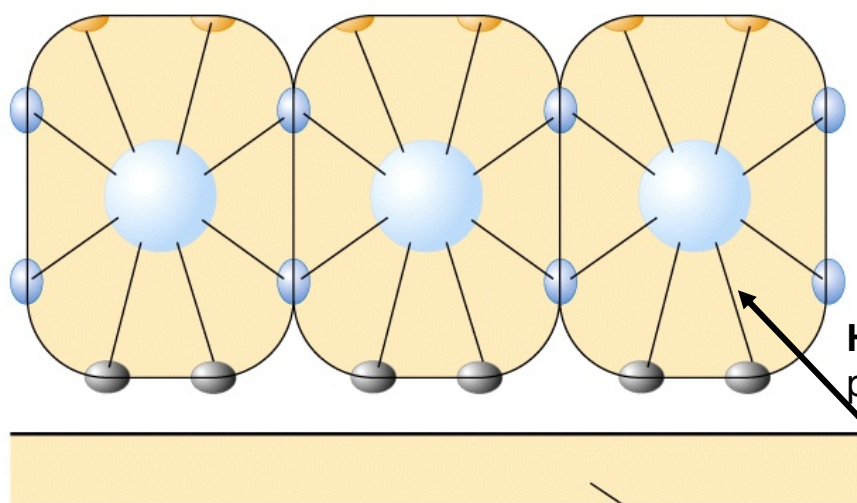
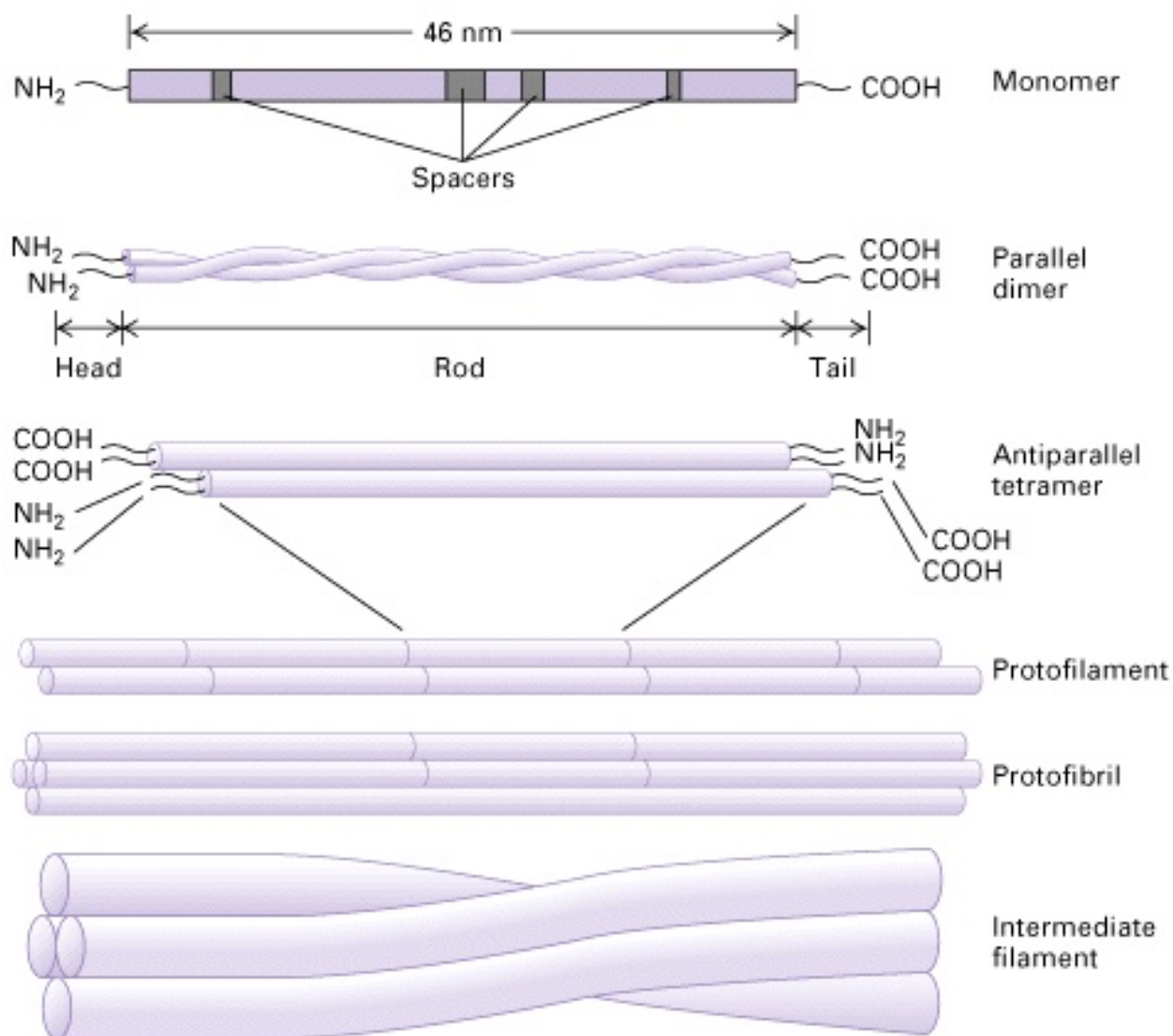
IF proteiny: tvoří homo nebo heteropolymerní IF filamenta

TYP I a II: Kyselé a basické keratiny - epiteliální buňky, různé typy keratinů

TYP III: vimentin (nejčastější - „podpora“ buněčných membrán, jádra), desmin (buňky svalů), peripherin,

TYP IV: neuronální axony - neurofilamenta

TYP V: laminy - jaderné



Epitheliální buňky - propojeny specialisovanými buněčnými spoji - desmosomy, hemidesmosomy

Desmosomy - buněčná adheze

Hemidesmosomy - adheze k podkladu

Propojení IF

Extracellular matrix