

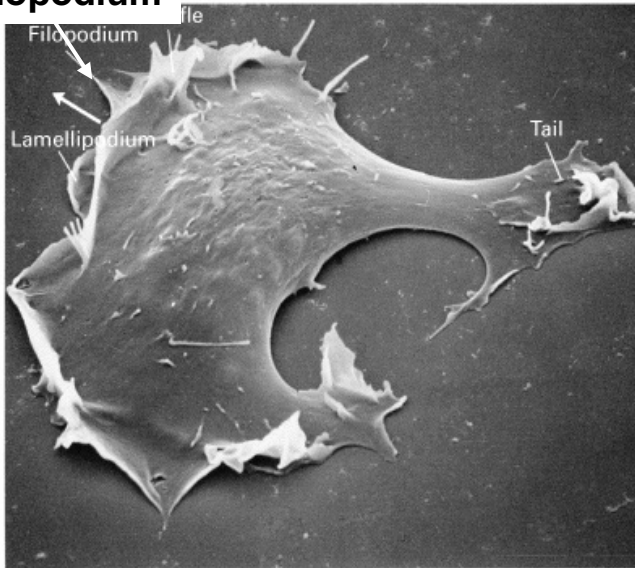
CYTOSKELET

- 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, tvorí 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.

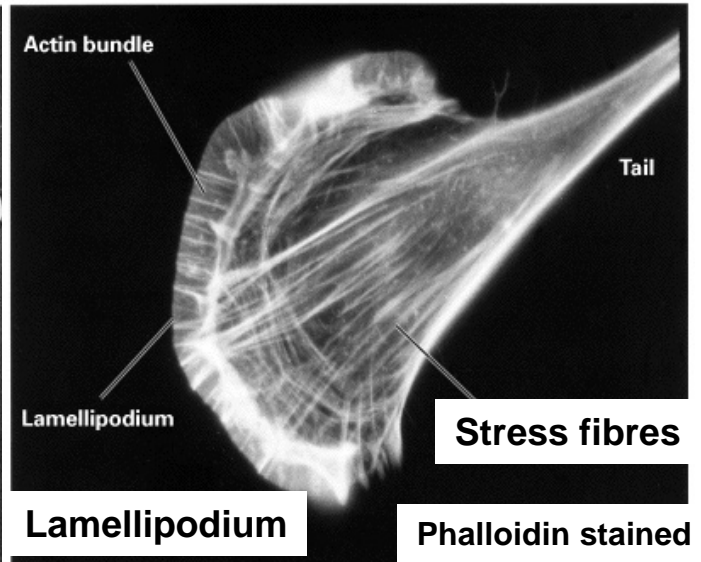
1. AKTINOVY CYTOSKELET (mikrofilamenta)

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

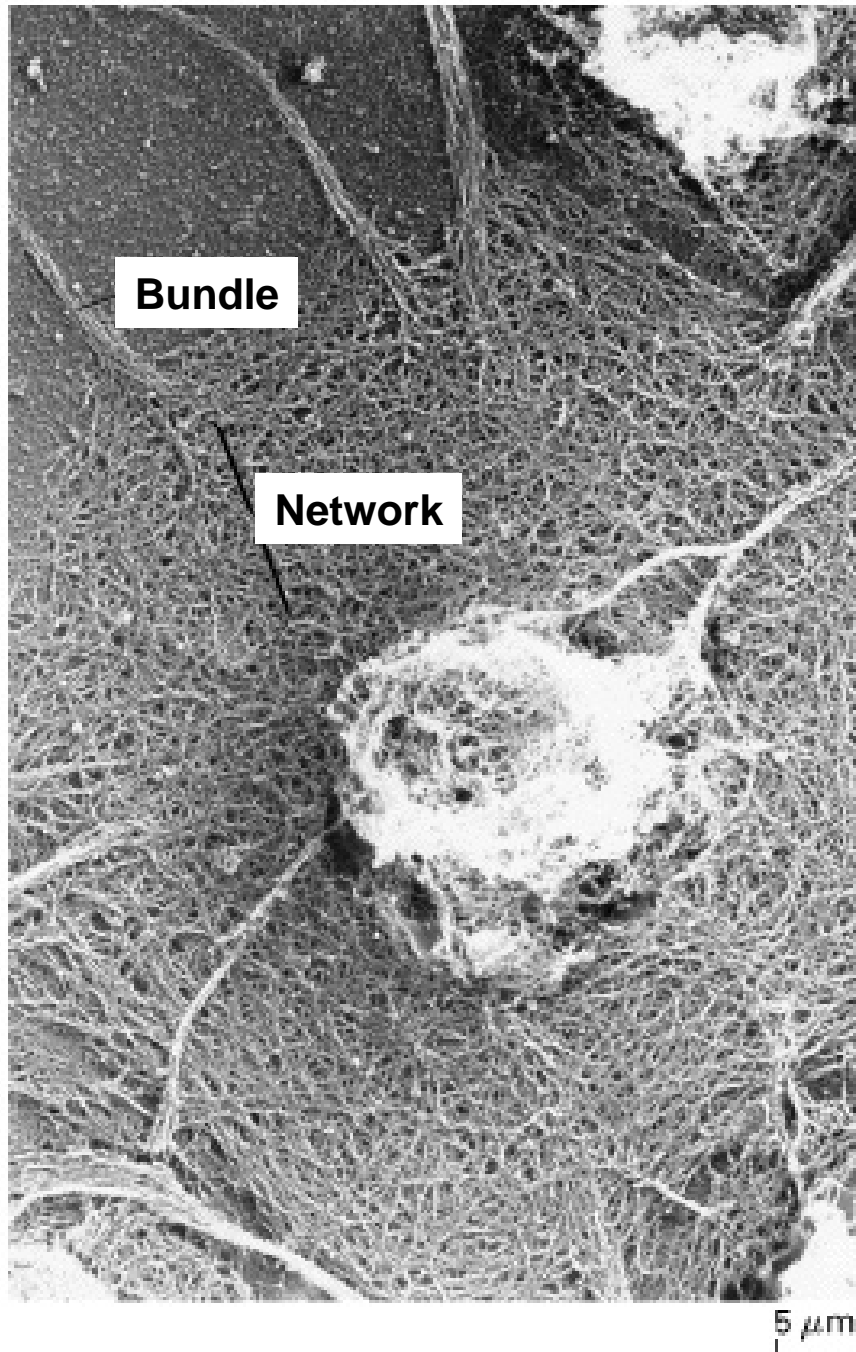
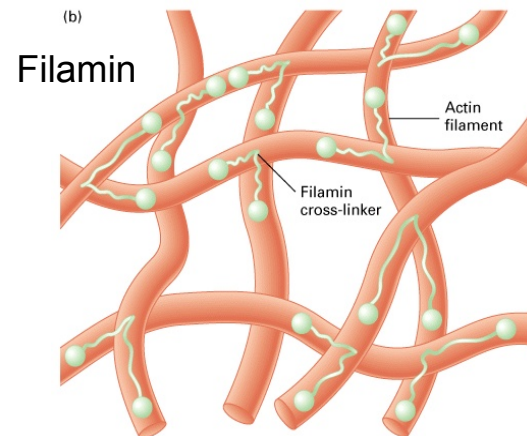
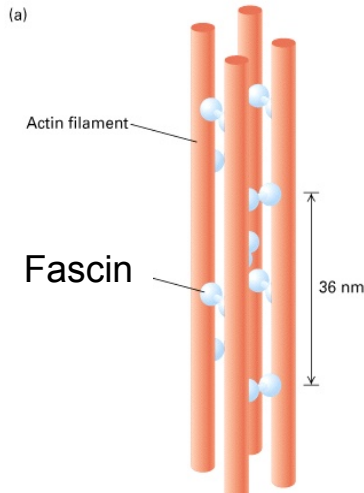
Bundles (svazky)

Networks (sítě)

- určují tvar buněk

Aktin-cross-linking proteins

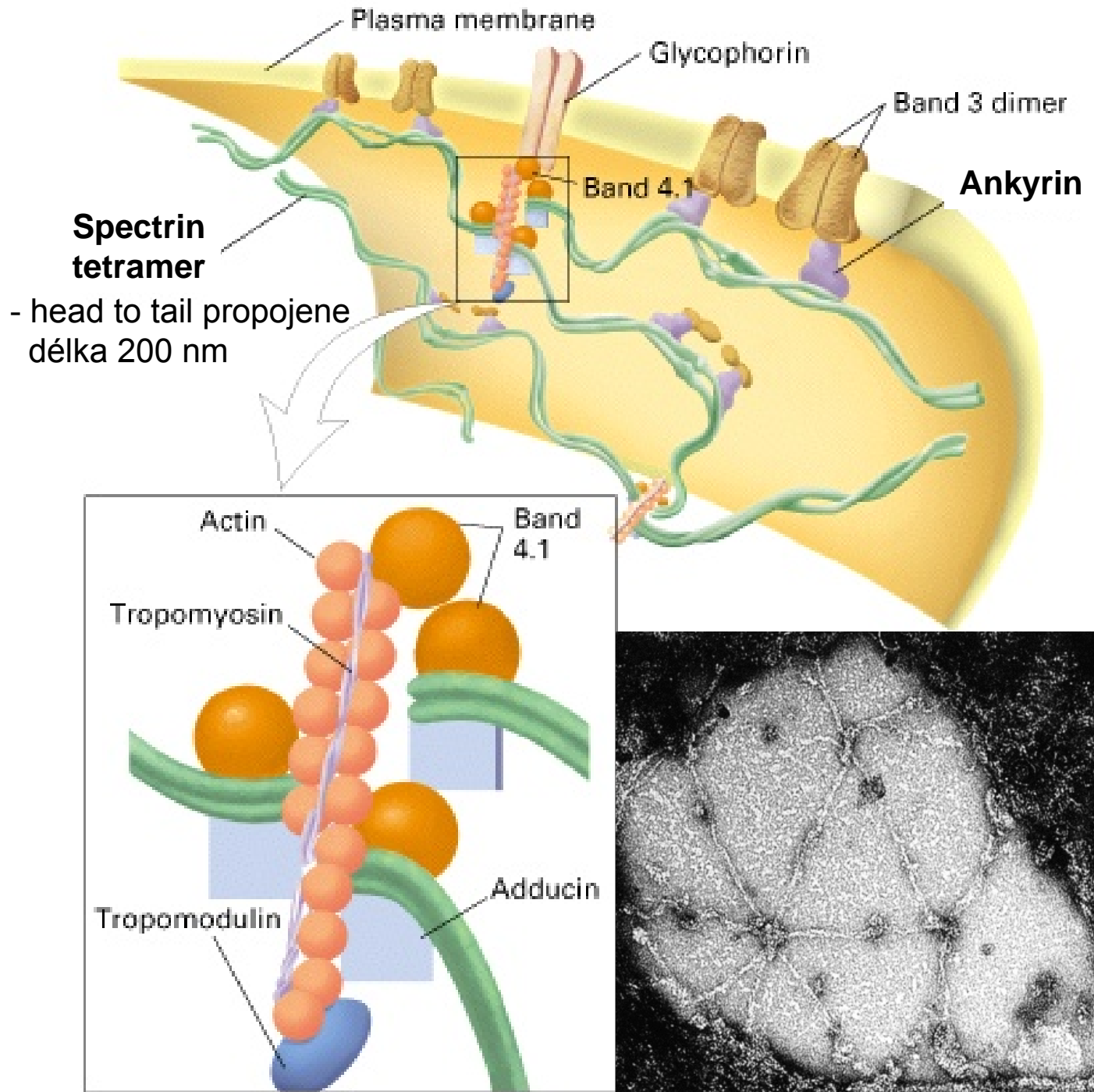
- 2 (nebo víc) aktin vazebná místa



Propojení filament k membráне

membrane-microfilament binding proteins, kortex - oblast pod membránou

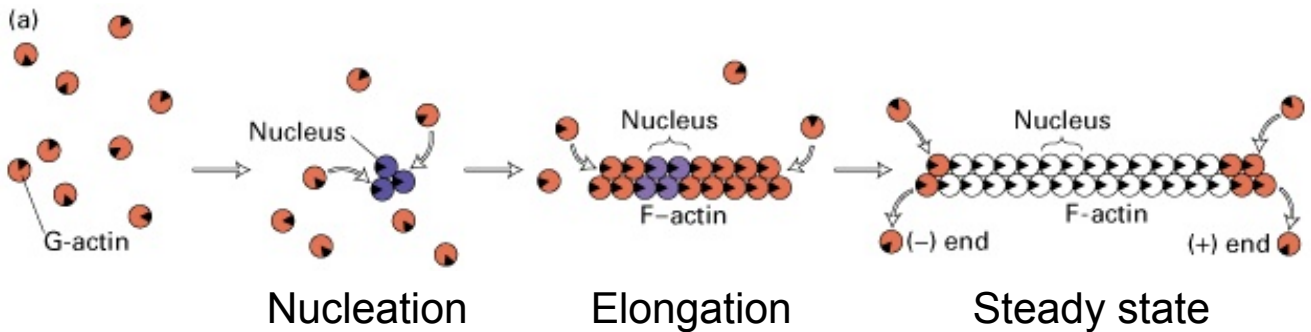
Erythrocyty



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 vyrovnění 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 $\beta 4$: 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 sítě - protein **gelsolin** a **cofilin**
 - mechanismus ? - vazba na podjednotky, změna jejich konformace a prerušení vazeb mezi nimi
 - po prerušení vazby zůstane “rozbíječ” protein vázán na + konci a brání prodluzování řetězce (**capping funkce**). - konec se zkracuje
- Stabilisace filament - **Actin-capping proteiny** (váží se na konce, neumožní filamenta rozbít)

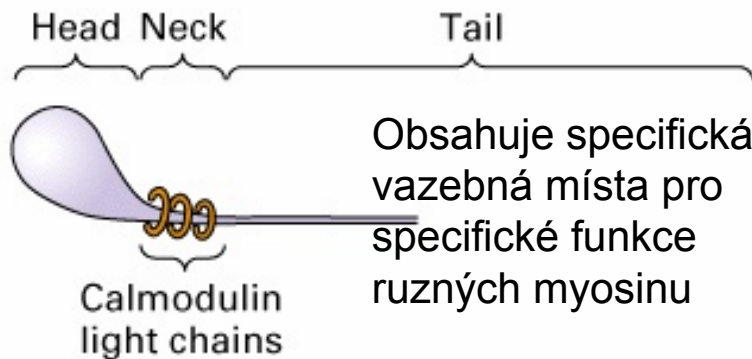
Aktin motor protein - Myosin

- 13 členů myosinové genové rodiny, myosin I a II nejčastější

1 nebo 2
těžké řetězce

Globulární hlava:
- actin a ATP
vazebná místa
konzervativní

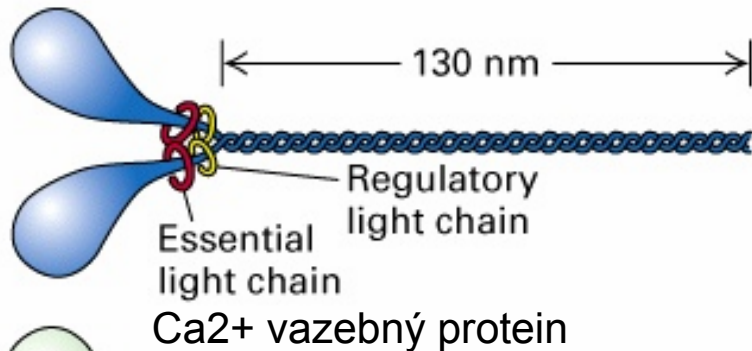
Myosin I
Monomer



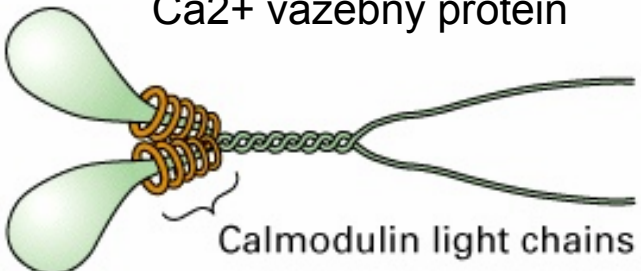
Různé lehké
řetězce

- calmodulin
- jiné Ca^{2+}
vazebné proteiny

Myosin II
Dimer



Myosin V
Dimer

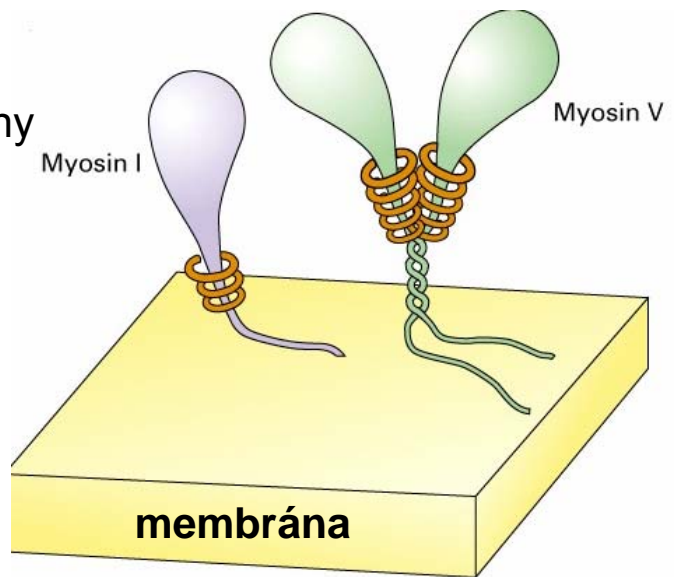


Všechny myosiny

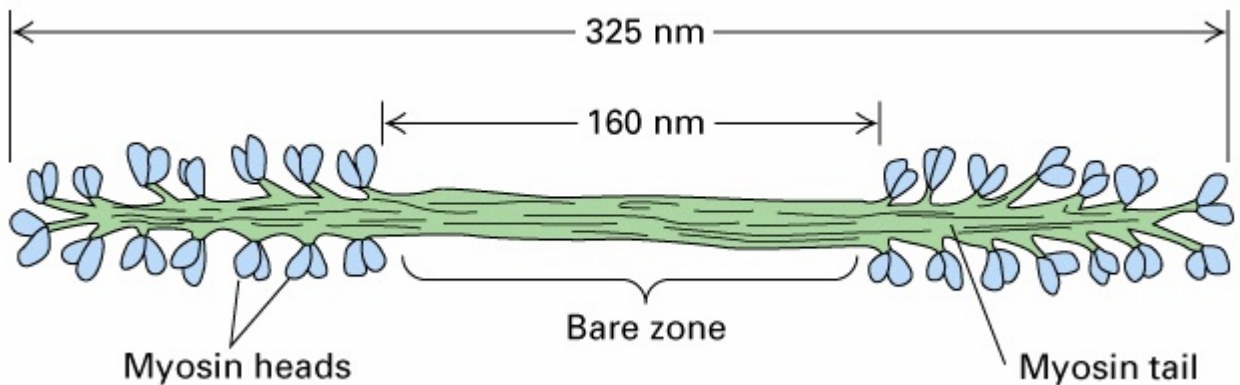
- regulovány nějak Ca^{2+}
X reagují odlišně na koncentraci Ca^{2+}

- ATPasová aktivita - aktivována aktinem (4-5x), lokalizována v globulární hlavě

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

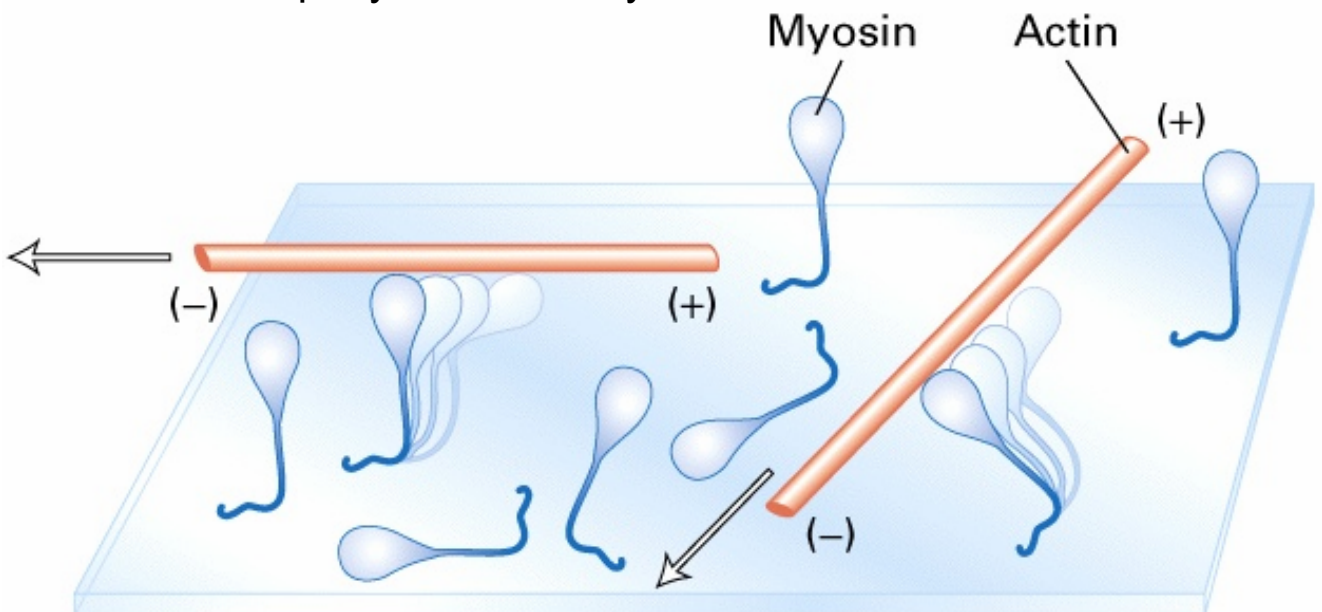


Tvorba silných filament-
 (myo II) - role při svalové
 kontrakci-
 - mnoho myosinových hlav
 může interagovat současně
 s aktinovými filamenty



Myosinové hlavy se pohybují podél aktinových filament

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



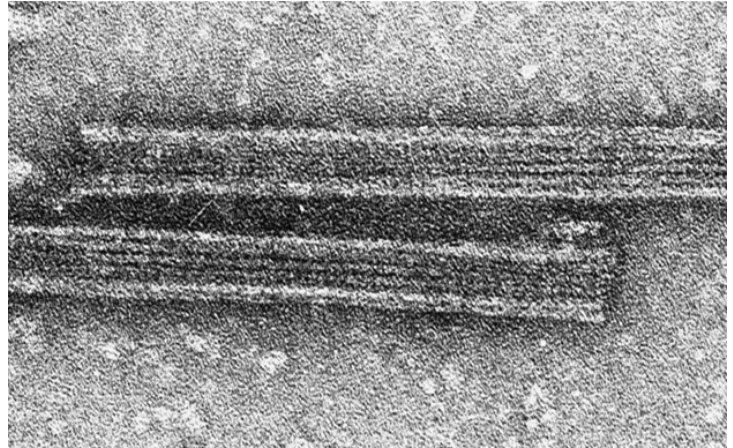
2. MIKROTUBULY A INTRAMEDIALNI FILAMENTA

- často se překrývají x plní různé funkce
- mikrotubuly - role v rade pohybu bunek I uvnitr bunek
- inermediální filamenta - strukturální funkce - vazba na plasmatickou membránu přes membránové proteiny, integrace bunek do tkání

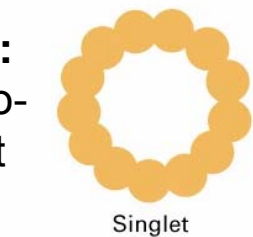
MIKROTUBULY

- polymery **tubulinu**
- heterodimer α a β tubulinu**
- velmi konservované
- α -tubulin - vazba GTP irever-
sibilne - nedochází k hydrolyse
- β -tubulin - vazba GTP reversi-
bilní, hydrolysa na GDP, muze
být vymeneno za GTP

γ -tubulin - není součástí
tubulinové subjednotky,
asi ji pomáhá tvorit

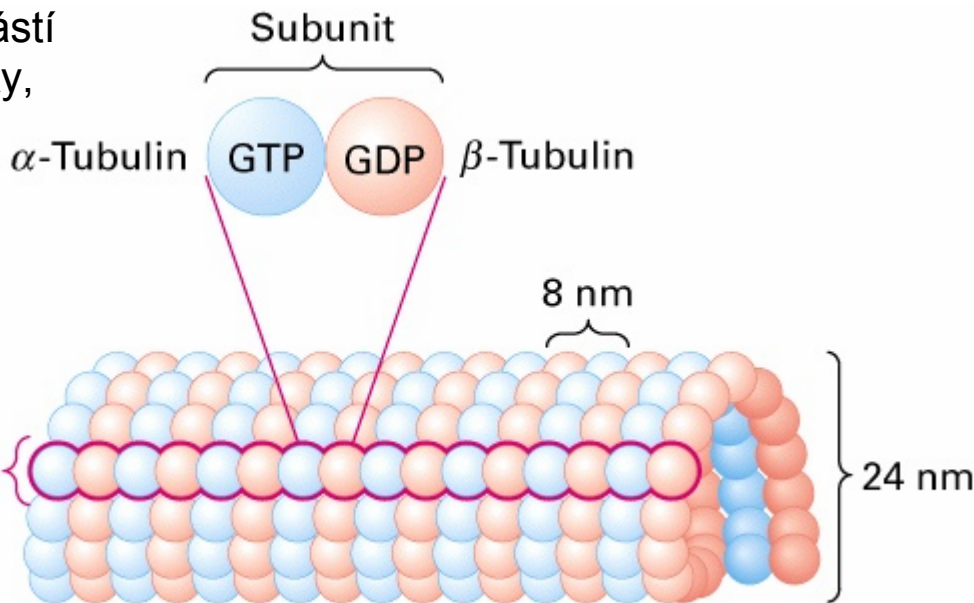


Singlet:
13 proto-
filament

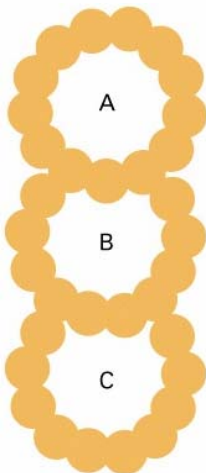


Singlet

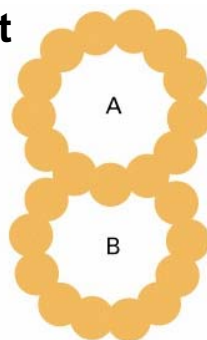
Protofilament



Triplet
centrioly
basální
telíska



Doublet
cilia
flagella



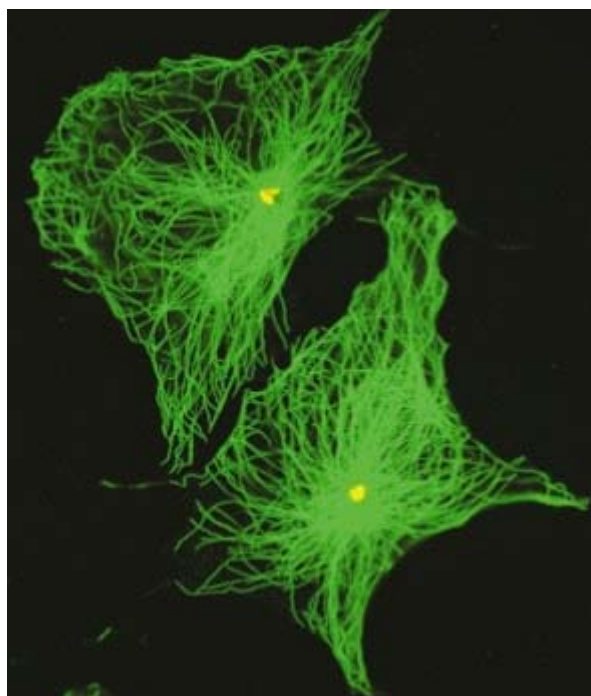
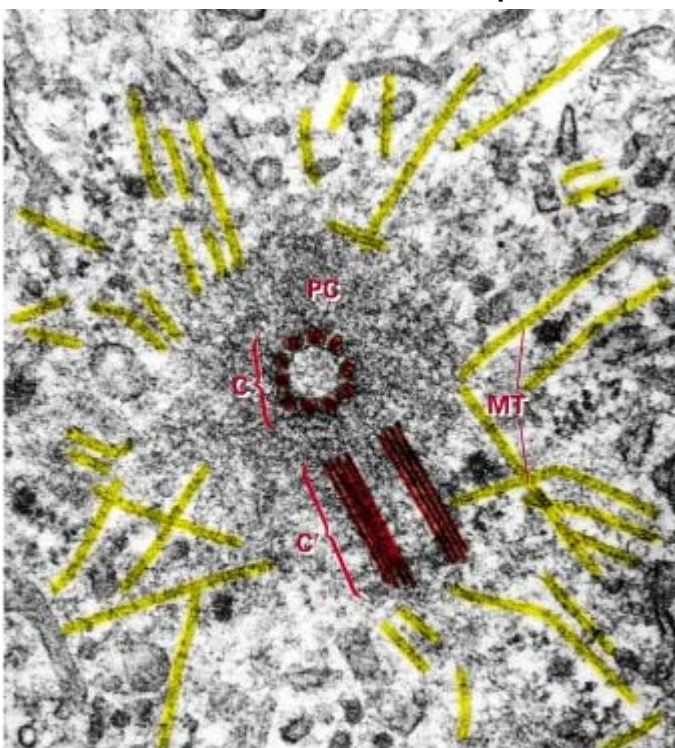
Mikrotubuly - polární
struktury - dáno
head to tail orientací
 α a β tubulinových
dimeru
 α -tubulinový konec
 β -tubulinový konec

MIKROTUBULY

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

assembly mikrotubulu:

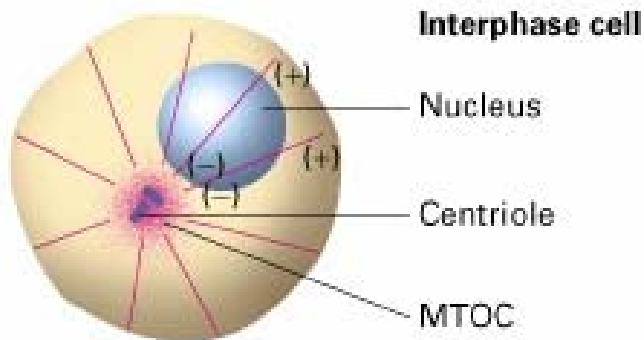
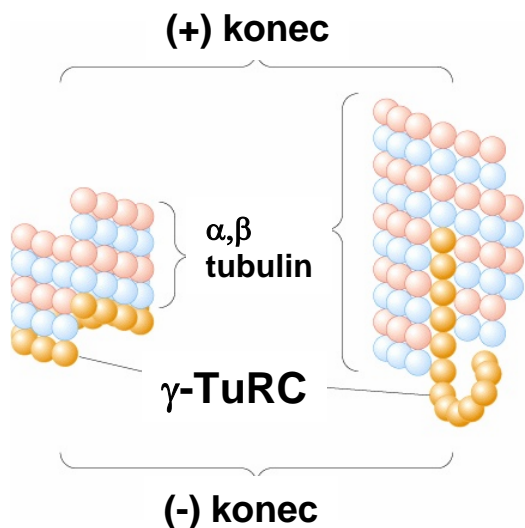
- **microtubule organising centre (MTOC)**
 - savčí bunky MTOC = centrosom
 - mikrotubule associated proteins



Polarisované bunky

- obsahují velké množství MTOC
- distribuovány uvnitř bunky

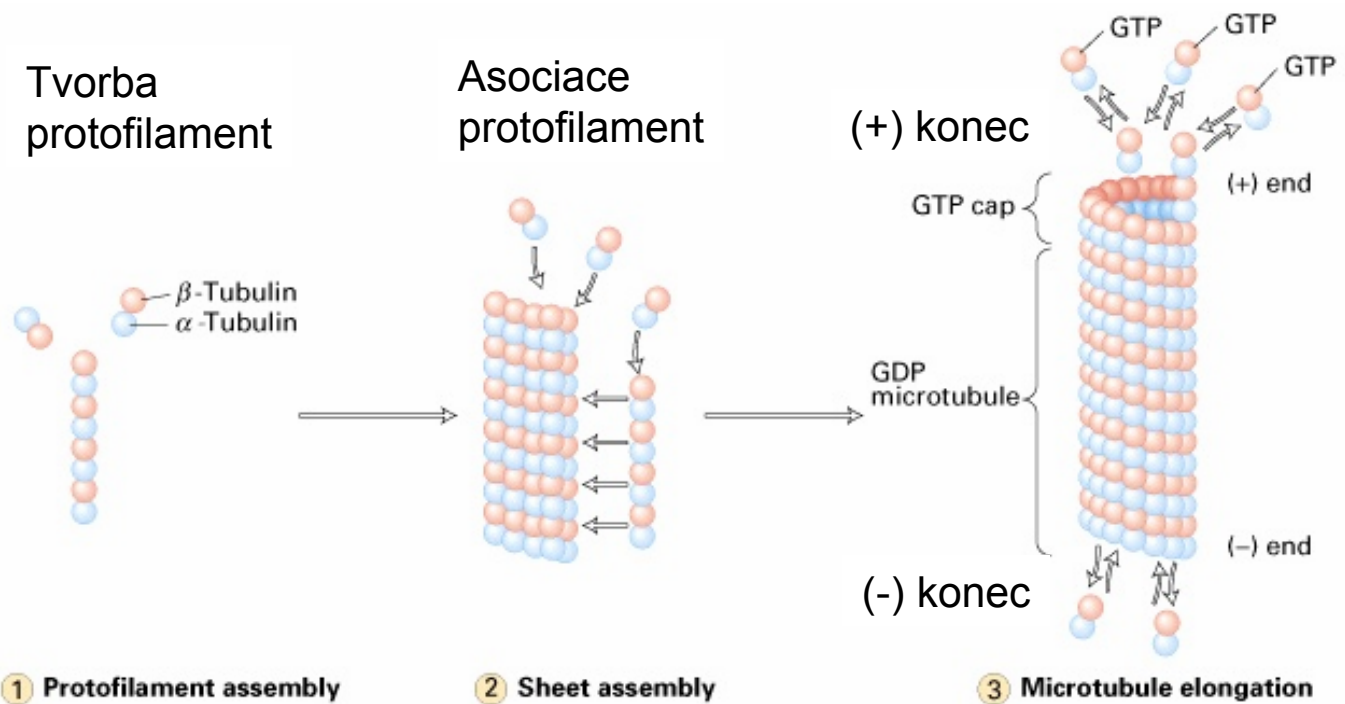
- konce mikrotubulu asociují s centrosomy, role v nukleaci assembly mikrotubulu
- nepolarisované bunky - MTOC je perinukleárně umístěn (v centru bunky)
- fixuje polaritu mikrotubulu - konec směrem k MTOC



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

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

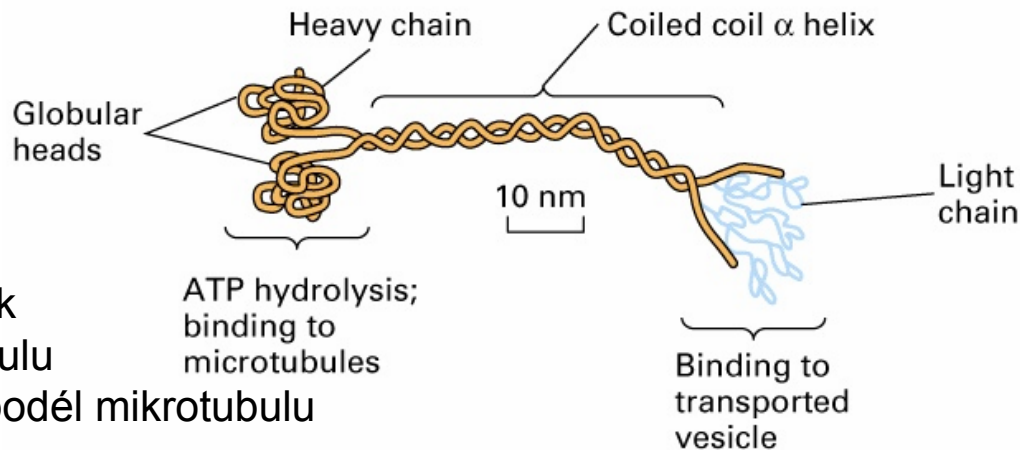
orientace pohybu k
(+) konci mikrotubulu

transport vesiklu podél mikrotubulu

2 typy kinesinu

a) cytosolické (transport vesiklu a organel)

b) spindle (podílejí se na assembly spindle a segregaci chromosomu)

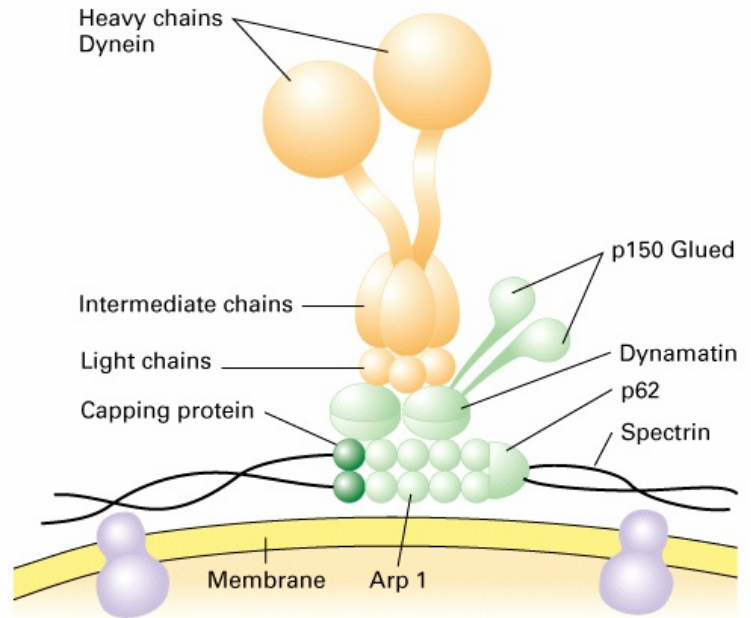


1) Dynein - pohyb smerem k (-) polu mikrotubulu, multimerní proteiny
2 skupiny:

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

