

Buněčný cytoskelet



Milan Bartoš

Přednáška Biologie 2024

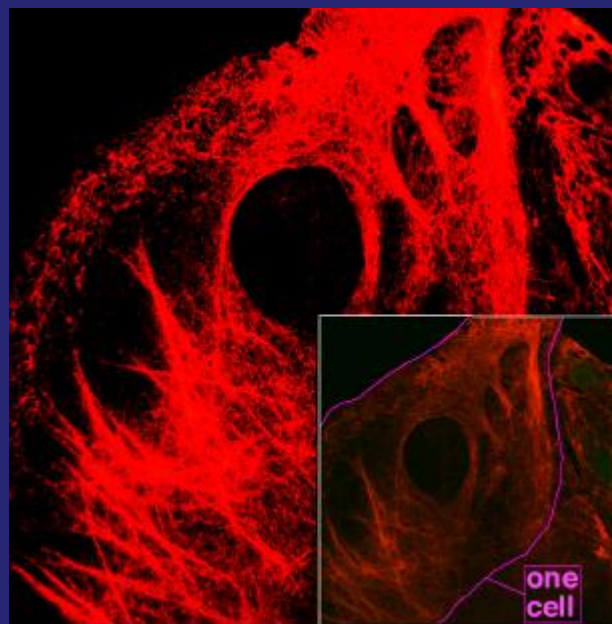
Obsah přednášky

- 1. Chemická a fyzikální struktura buněčného skeletu**
- 2. Střední filamenta, mikrotubuly, centrozóm, aktiniová vlákna**
- 3. Samosestavování a dynamická struktura cytoskeletárních filament**
- 4. Regulace tvorby cytoskeletárních struktur**
- 5. Molekulární motory**

Přínos brněnských vědců



prof. MUDr. Oldřich Nečas, DrSc.



Nečas, O et al.: Cytoskelet. Academia, 1991

Cytoskelet – fibrilární struktury

Cytoskelet

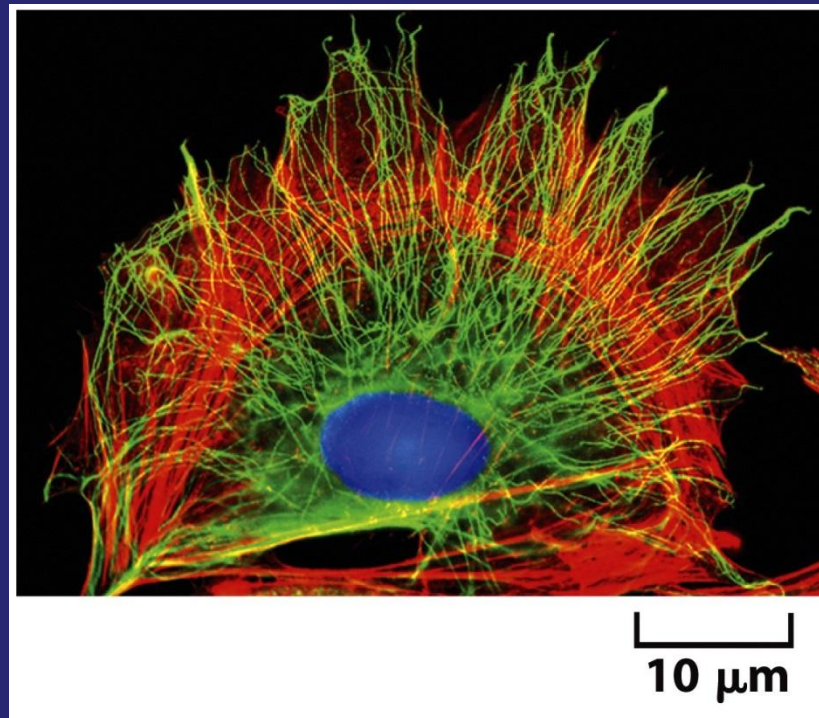
je systém proteinových vláken a tubulů, jejichž hlavní funkcí je transport látek a buněčných komponent, opora buňky a účast na jejím dělení

Je to soustava vláken situovaná v **cytoplasmě** a **jádře**

Pohled na fibrilární struktury

Zafixovaná a značená buňka z buněčné kultury

Mikrotubuly
(zeleně)



Aktinová
filamenta
(červeně)

DNA v jádře
(modře)

Hlavní typy struktur v cytoskeletu

Mikrotubuly

(určují pozici membránou ohraničených organel a řídí transport v jádře)

Mikrofilamenta, aktinová filamenta

(určují tvar buněčných povrchů a pohyb buňky)

Střední, intermediární filamenta

(poskytují mechanickou oporu)

Cytoskelet – dynamický nebo rigidní?



?



Cytoskelet – fibrilární struktury

Cytoskelet

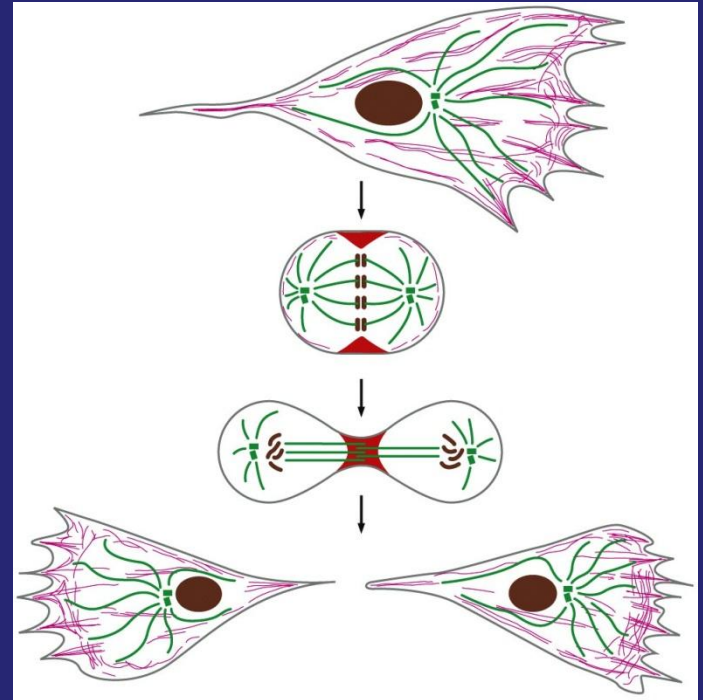
je **dynamický** systém proteinových vláken a tubulů, jejichž hlavní funkcí je transport látek a buněčných komponent, opora buňky a účast na jejím dělení.

Je to soustava vláken situovaná v **cytoplasmě** a **jádře**

Rychlé změny cytoskeletu

Cytoskelet

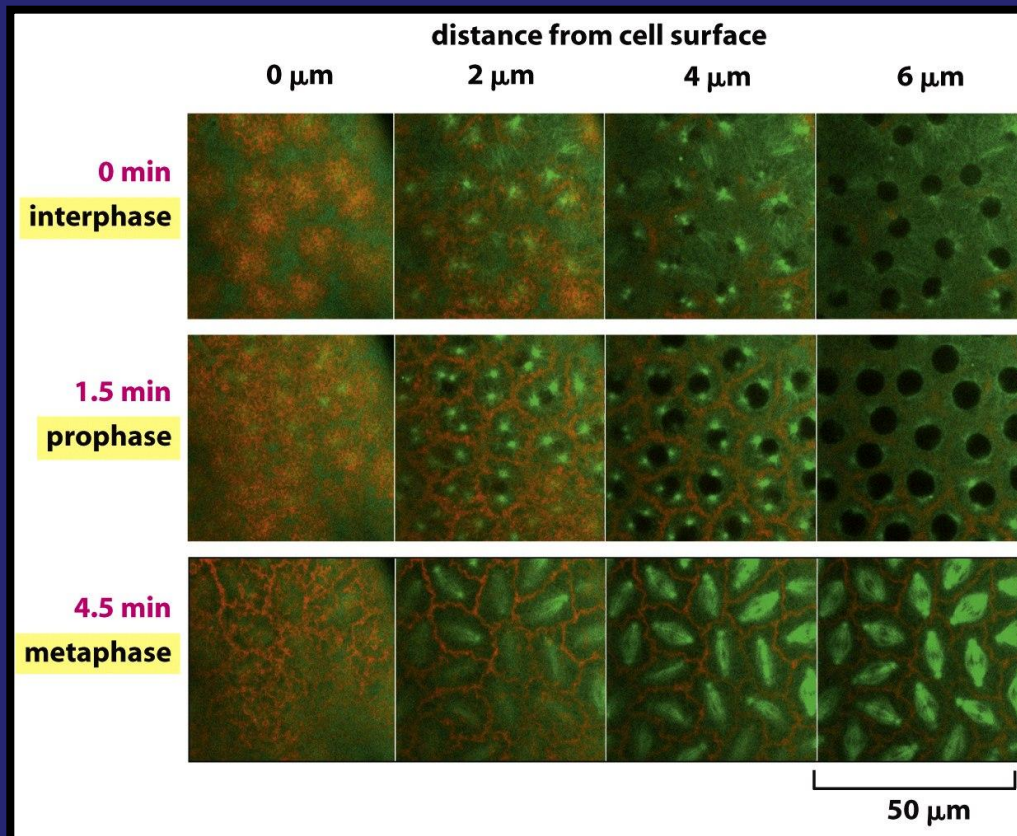
Je reorganizován v průběhu rychlých změn, např. při dělení buňky



Pohybující se fibroblast s vyznačeným polarizovaným dynamickým aktinovým cytoskeletem (červeně). Polarizace je podporována mikrotubuly cytoskeletu (zeleně). Chromozómy jsou vyznačeny hnědě.

Rychlé změny cytoskeletu

Rychlé změny ve struktuře cytoskeletu pozorované během vývoje časného embrya *Drosophila*



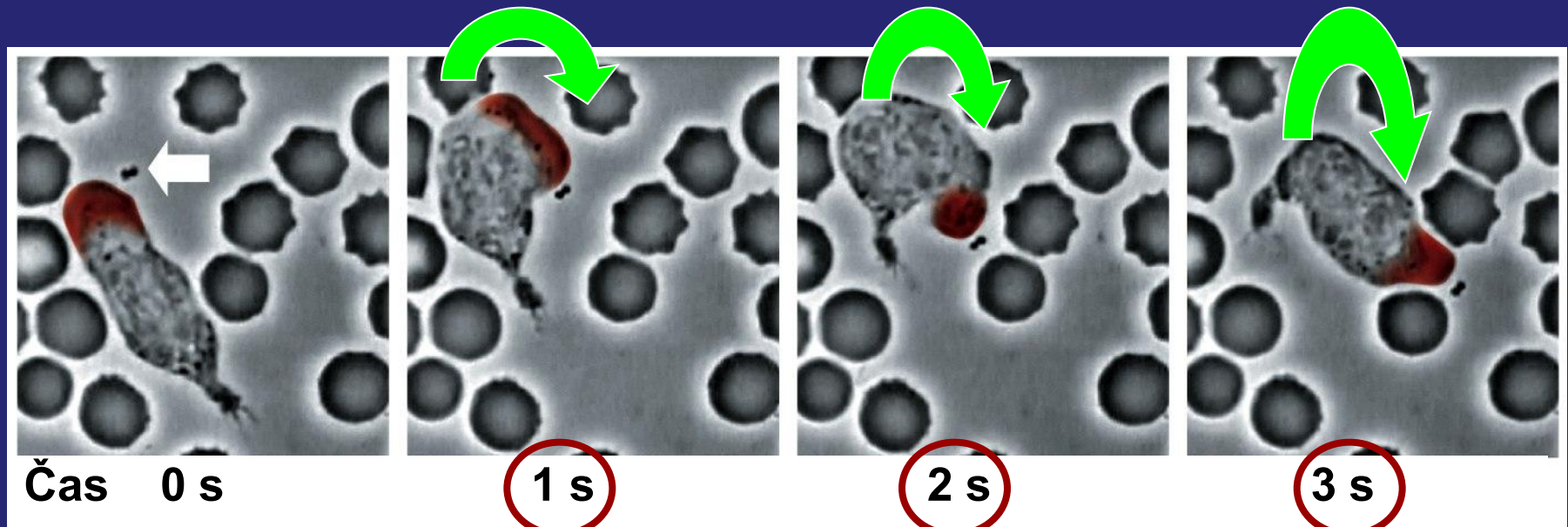
**Aktinová
filamenta
(červeně)**

**Mikrotubuly
(zeleně)**

Neutrofil pronásledující bakterie

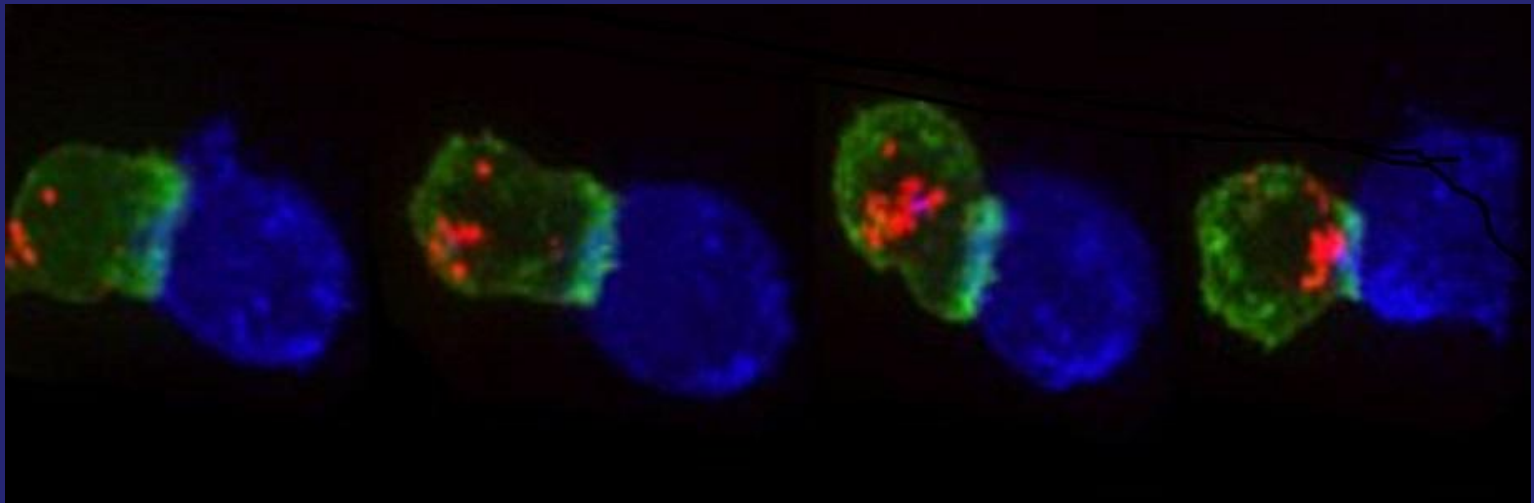
Shluk bakterií (bílá šipka) je pohlcován neutrofilem

Podle toho, jak se bakterie pohybuje, neutrofil rychle přestavuje svoji hustou **aktinovou síť** na předním okraji (**červeně**) tak, aby se mohl tlačit směrem k místu, kde se bakterie nacházejí



Likvidace nádorových buněk

Sekreční granule cytotoxické T-buňky připravující smrtelnou dávku jedu (červeně). Aktinová vlákna (zeleně) je přesunují na frontovou linii, místa odkud zahájí útok na modře zbarvenou rakovinu



Cytoskelet tvoří také stabilní struktury

- Stabilní struktury jsou typické pro takové buňky, které dosáhly **stabilní, diferencované** morfologie
- Typickým příkladem jsou **neurony** nebo **buňky epitelů**

Svazky aktinových vláken musí udržovat stabilní organizaci po celý život živočicha, zůstávají jednotlivá vlákna pozoruhodně dynamická, neustále se přeměňují a nahrazují průměrně každých 48 hodin

Cytoskelet je zodpovědný za buněčnou polaritu

Polarizace je druhou vlastností cytoskeletu vedle vytváření stabilních specializovaných povrchových buněčných struktur

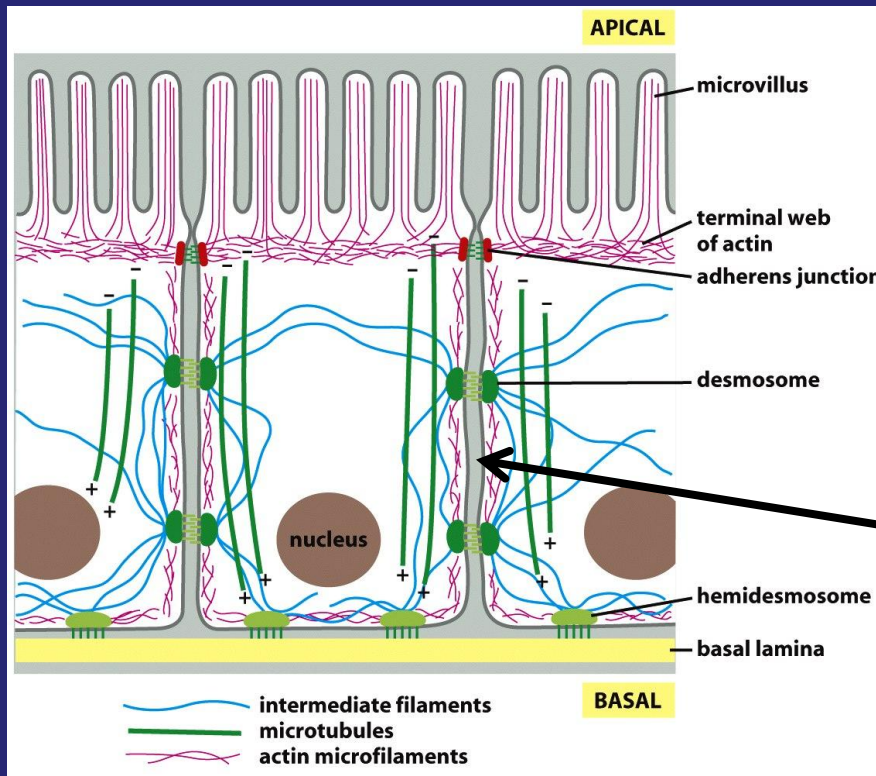
Polarizace umožňuje buňkách odlišit, co je

- **nahoře a dole**
- **vpředu a vzadu**

Polarizované buňky epitelu udržují funkce mezi

- **Apikální části povrchu = přijímá potravu**
- **Bazolaterálním povrchem = přenáší potravu přes plasmatickou membránu do krevního řečiště**

Cytoskelet v polarizovaném epitelu



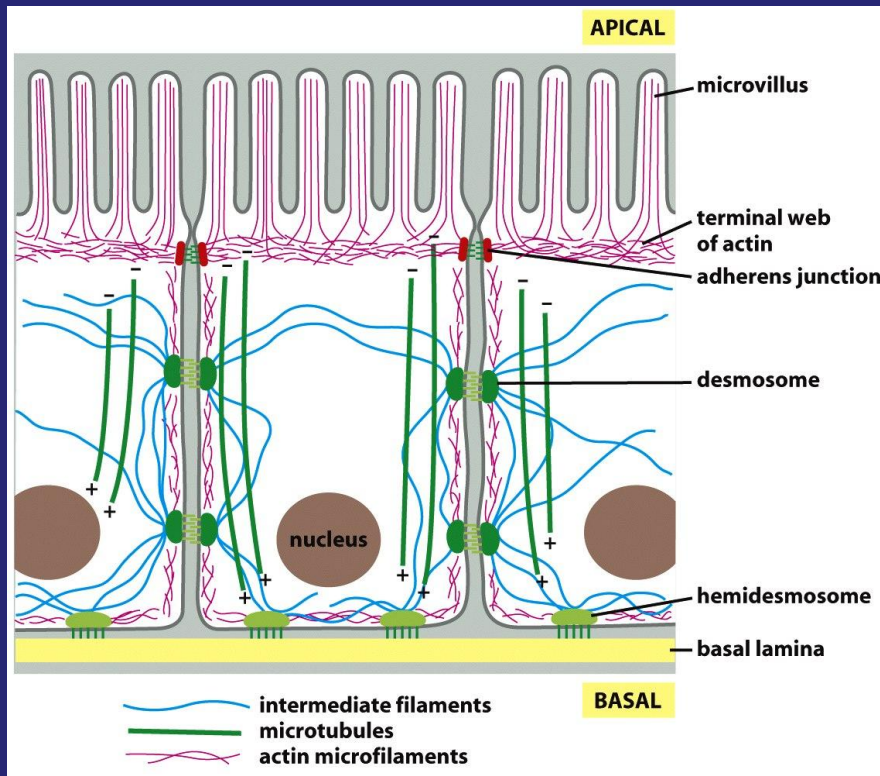
V apikální části se vytvářejí řasinky, které zvyšují buněčný povrch (tvořený aktinovými filamenti, červeně)

Zespodu se k řasinkách připojují aktinová filamenta vytvářející mezibuněčné spoje

Střední filamenta (modře) jsou napojena na další struktury

Všechny složky cytoskeletu kooperují a vytvářejí charakteristické tvary specializovaných buněk

Cytoskelet v polarizovaném epitelu



V apikální části se vytvářejí řasinky, které zvyšují buněčný povrch (tvořený aktinovými filamenti, červeně)

Zespodu se k řasinkách připojují aktinová filamenta vytvářející mezibuněčné spoje

Střední filamenta (modře) jsou napojena na další struktury

Mikrotubuly (zeleně) poskytují globální koordinační systém

Funkce cytoskeletu

Strukturní opora eukaryotické buňky

- **mechanickou pevnost buňky**
- **tvár buňky**
- **vnitřní uspořádání organel**

Zajišťuje pohyb buňky

Reguluje pohyb buňky

Kde se nachází cytoskelet?

- 1) Složky cytoskeletu se nacházejí v buňce **volně**
- 2) Tvoří ale i **organely** nebo alespoň jejich části
- 3) Podílí se i na stavbě eukaryotického **bičíku**, centriol, dělicího vřeténka aj.
- 4) Mikrotubuly volně **prostupují celou buňku**
- 5) Mikrofilamenta tvoří **hustou síť těsně pod povrchem**

Hlavní typy struktur v cytoskeletu

Mikrotubuly

(určují pozici membránou ohraničených organel a řídí transport v jádře)

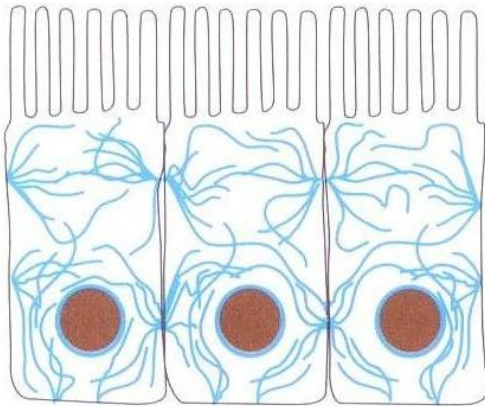
Mikrofilamenta, aktinová filamenta

(určují tvar buněčných povrchů a pohyb buňky)

Střední, intermediární filamenta

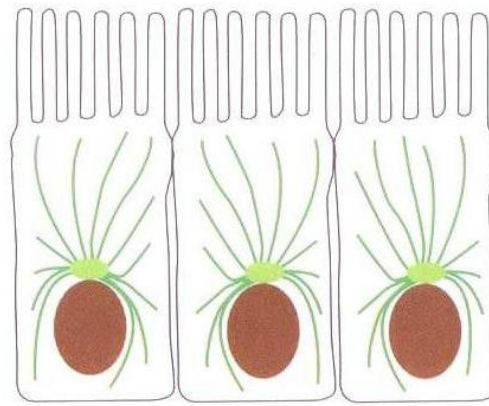
(poskytují mechanickou oporu)

Topografie filament



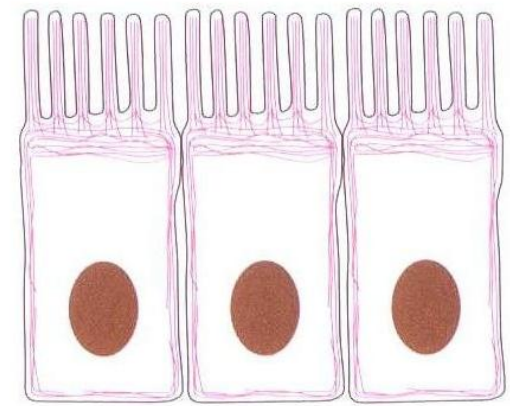
25 μm

střední filamenta



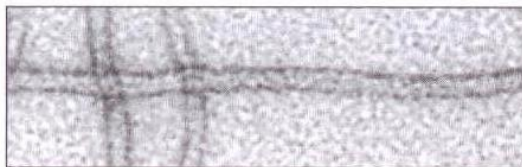
25 μm

mikrotubuly

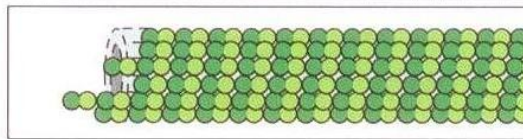


25 μm

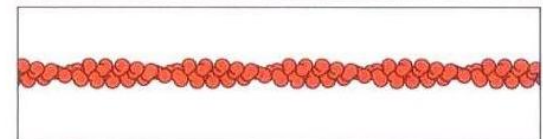
mikrofilamenta



25 nm



25 nm

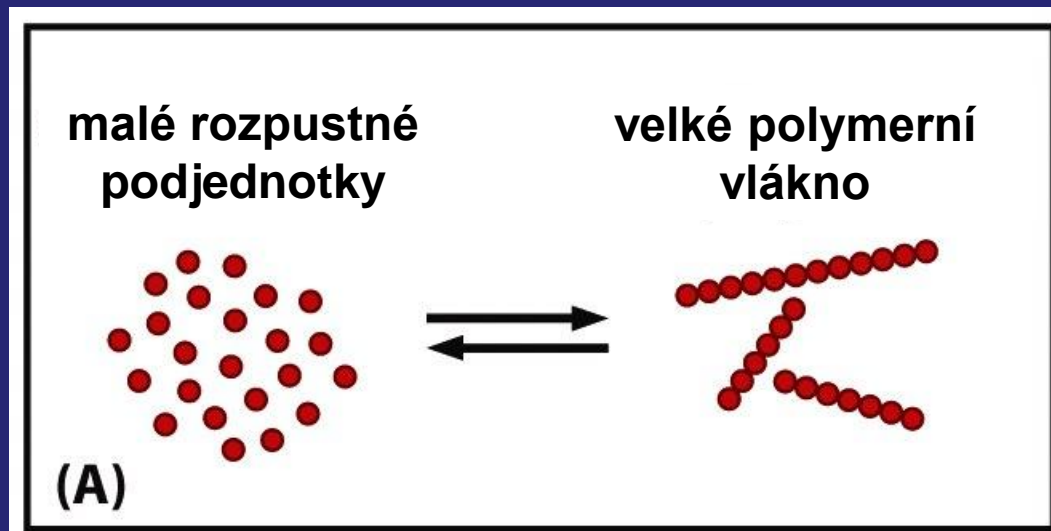


25 nm

***Struktury cytoskeletu se vytvářejí
z menších proteinových podjednotek***

Cytoskelet během změn

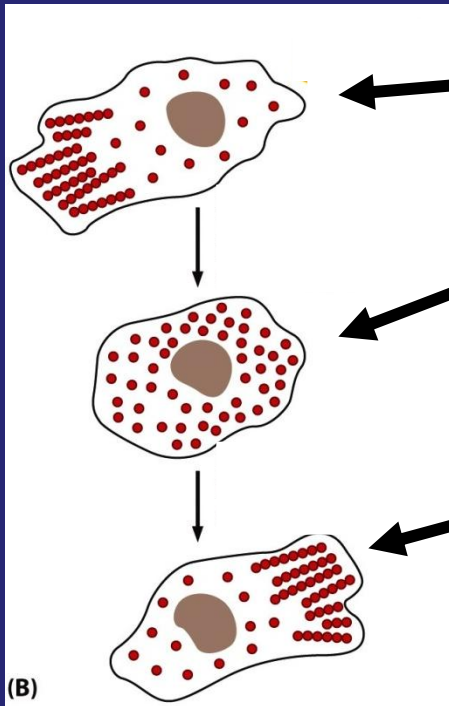
Vytváření proteinových vláken z mnohem menších podjednotek umožňuje regulovat skládání a rozpad vláken za účelem přestavby cytoskeletu



Vytváření filament z malých proteinových podjednotek

Reorganizace cytoskeletu

Rychlé reorganizace cytoskeletu v buňce jako odpověď na vnější signál



Signál, např. zdroj potravy

Rozložení filament a rychlá difúze podjednotek

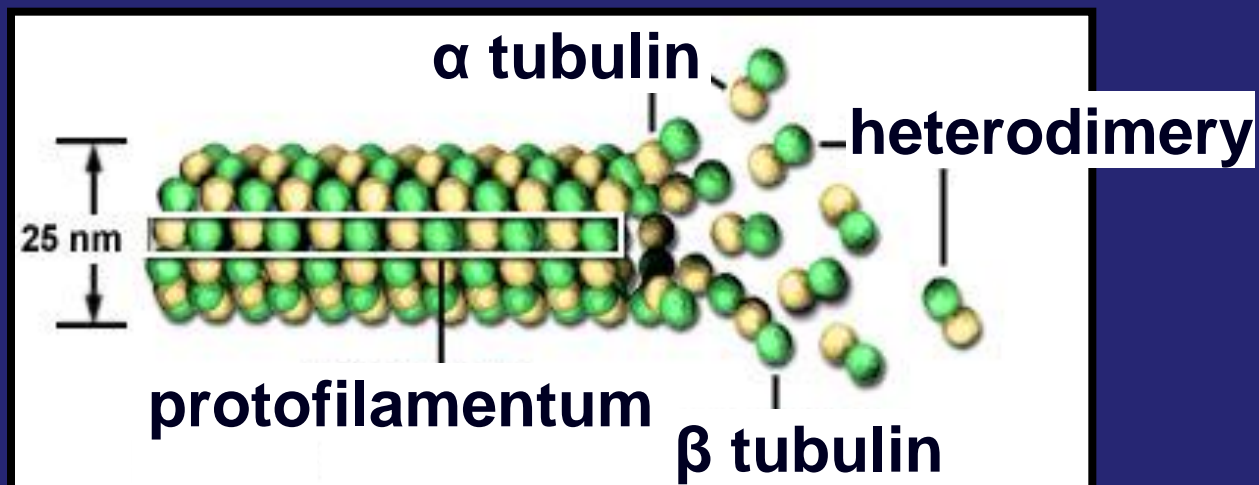
Znovusložení filament v novém místě

Mikrotubuly

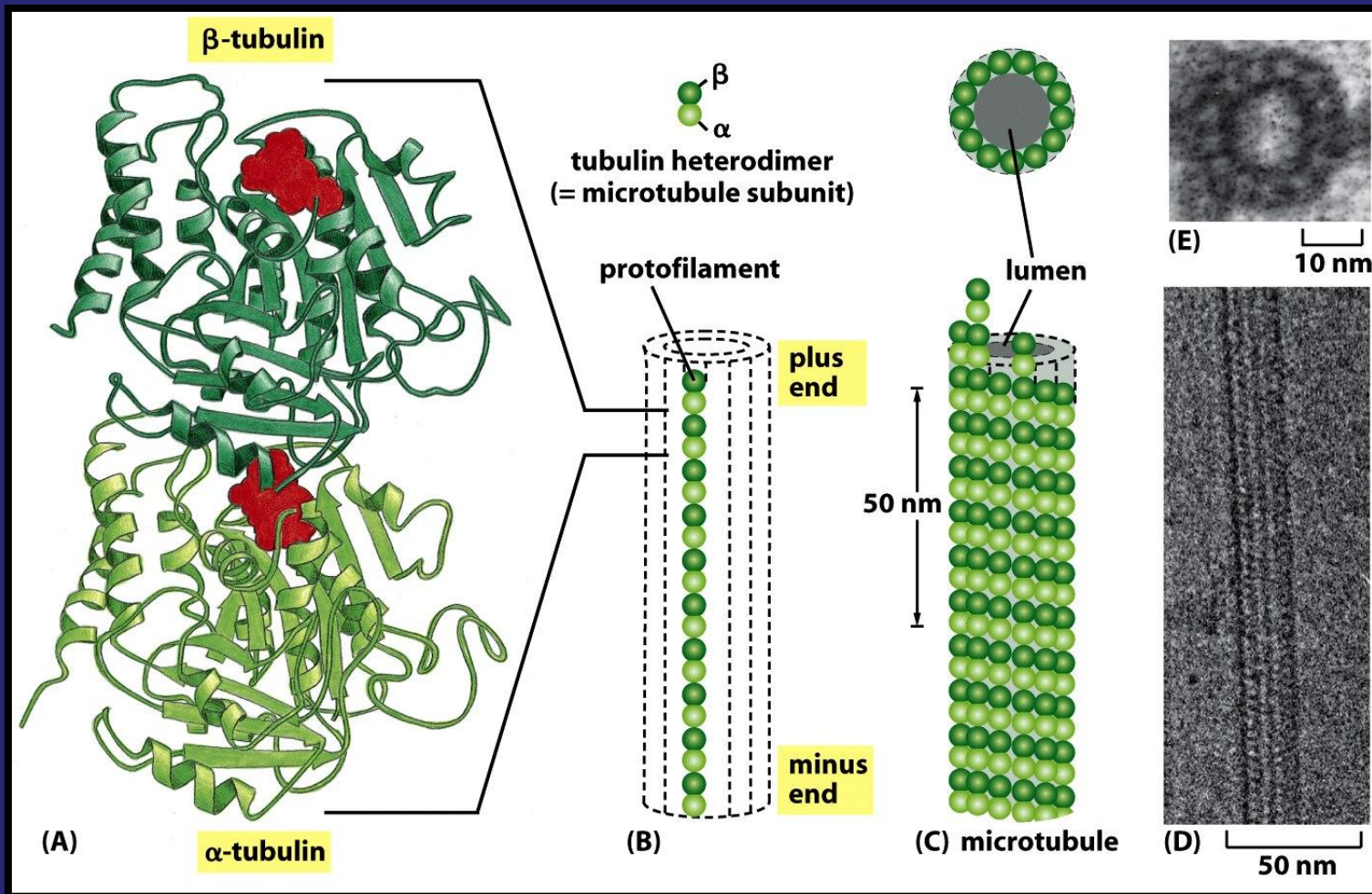
Mikrotubuly

- dlouhé duté trubičky o průměru 25 nm tvořené proteinem tubulinem α a β
- tubulin α a β se skládá do heterodimerů, z nichž se skládají protofilamenta
- v každé trubičce je 13 souběžných protofilament

Helikální struktura mikrotubulu



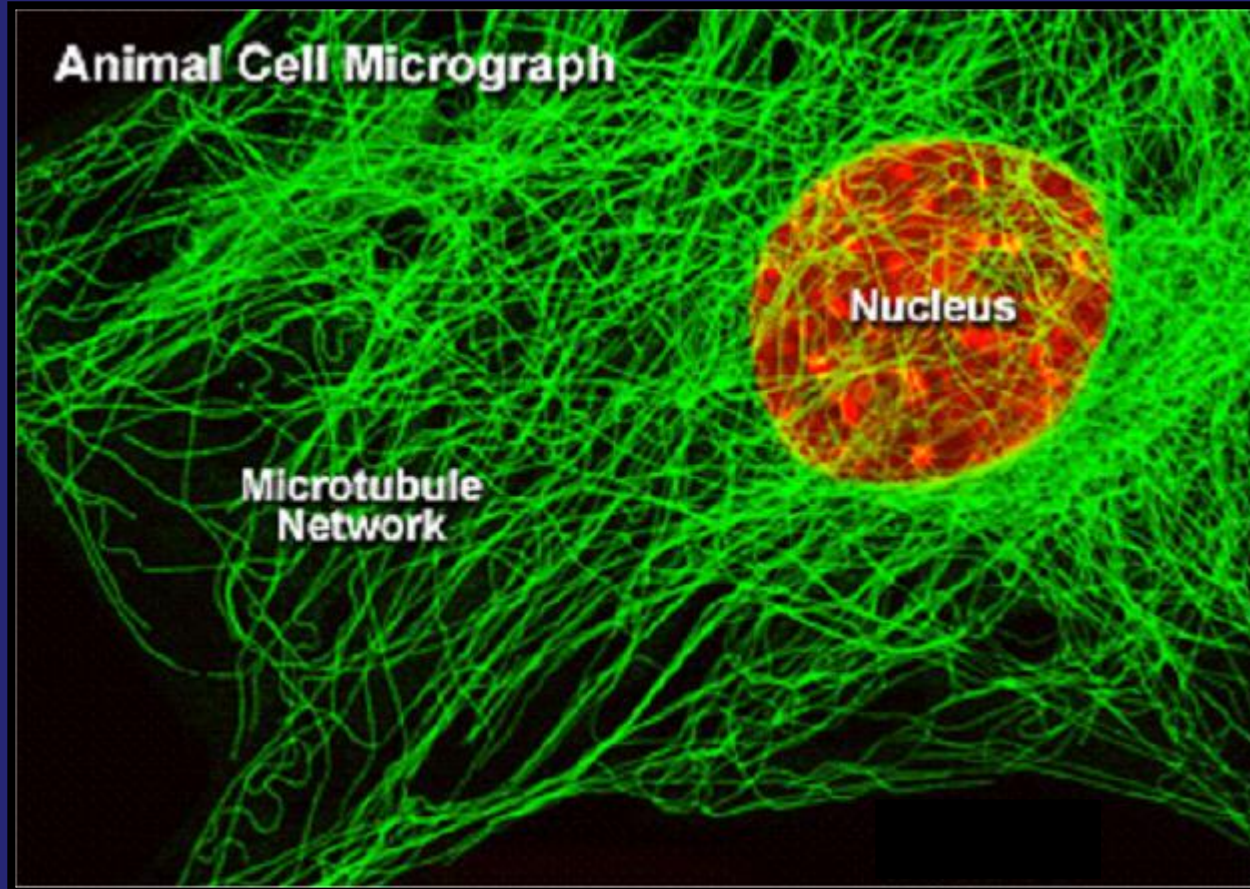
Struktura mikrotubulů



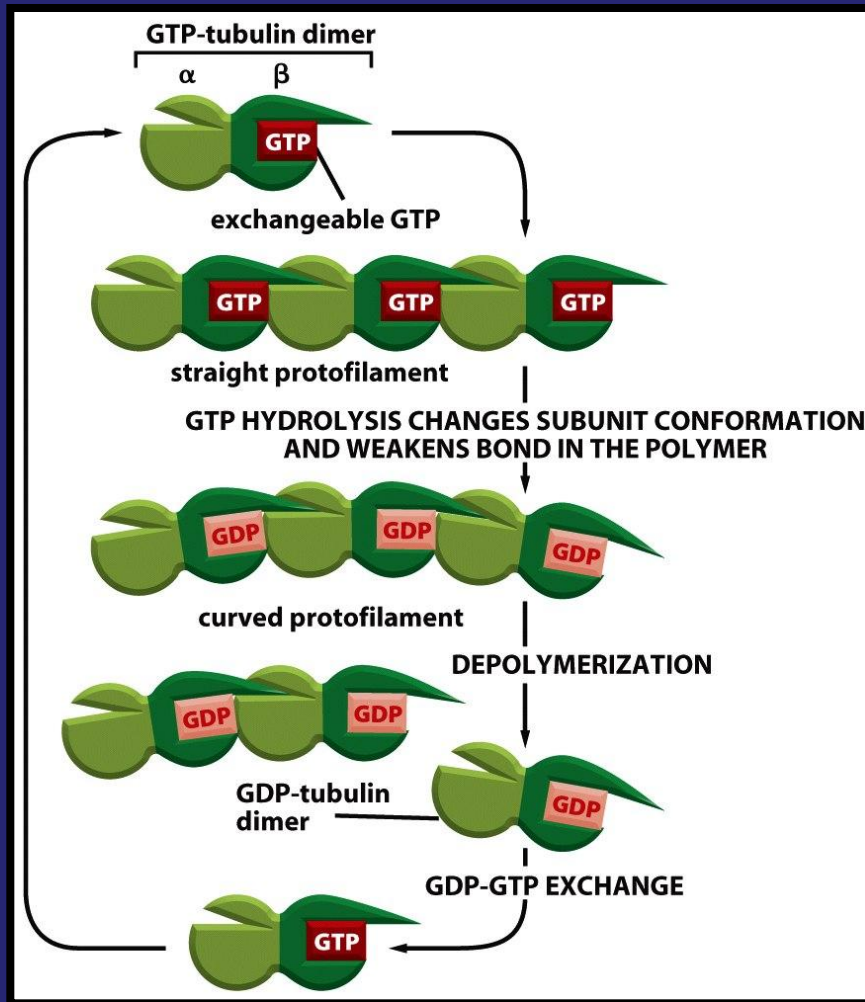
Funkce mikrotubulů

- mikrotubuly jsou dlouhé a rovné
- mají jeden z konců připojený k tzv. centrozómu
- orientovány do centrozómu (mínus konec), vybíhají k buněčnému povrchu (plus konec)
- zajišťují pohyb organel a určují polohu membránou obklopených organel
- řídí jaderný transport
- napomáhají formování tvaru buňky a slouží jako podpůrná kostra buňky

Mikroskopie mikrotubulů



Růst a rozpad mikrotubulů



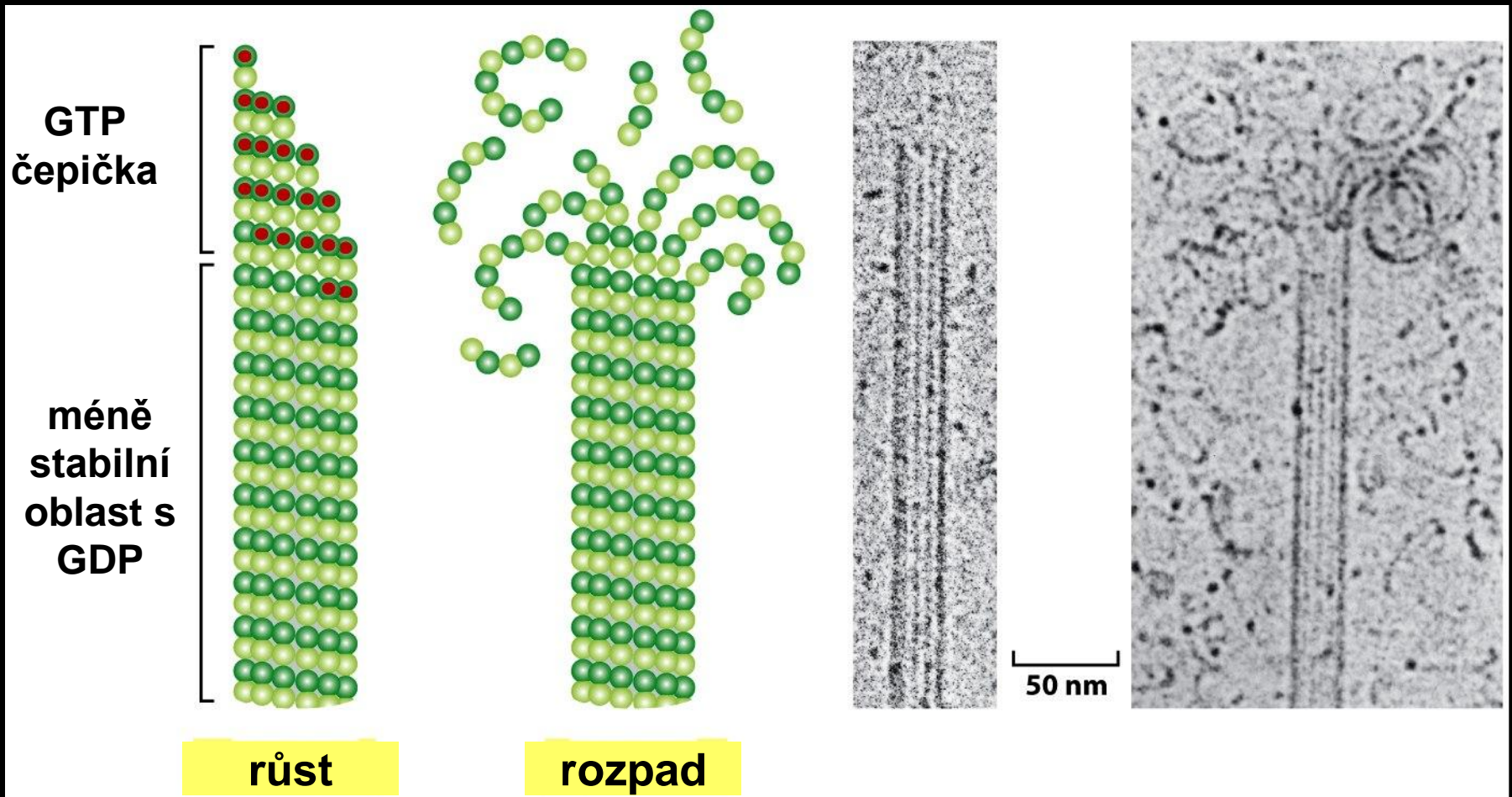
Dimery nesoucí GTP se váží pevněji

Hydrolýza GTP v oblasti čepičky snižuje stabilitu polymeru

Dimery s GDP mohou být rychle uvolňovány a mikrotubulus se zkracuje

Růst a rozpad mikrotubulů

Je regulován hydrolyzou GTP



Mikrotubuly a kolchicin

➤ kolchicin je tzv. „mitotický jed“

1) Inhibuje polymeraci tubulinových protomerů

→ brání vzniku mitotického vřeténka

→ zastavuje mitózu v metafázi

2) Zastavuje buněčné pohyby → zpomaluje pohyb lymfocytů → léčení akutních záchvatů dny

➤ Podobně působí vinblastin a vinkristin z *Vinca rosea* (barvínek)

➤ Naproti tomu taxany z *Taxus brevifolia* (tis) urychlují tvorbu tubulů, stabilizují je a brání depolymerizaci



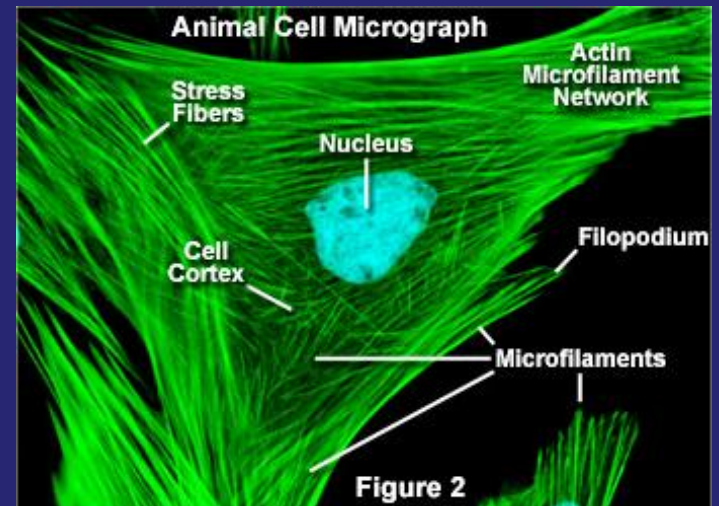
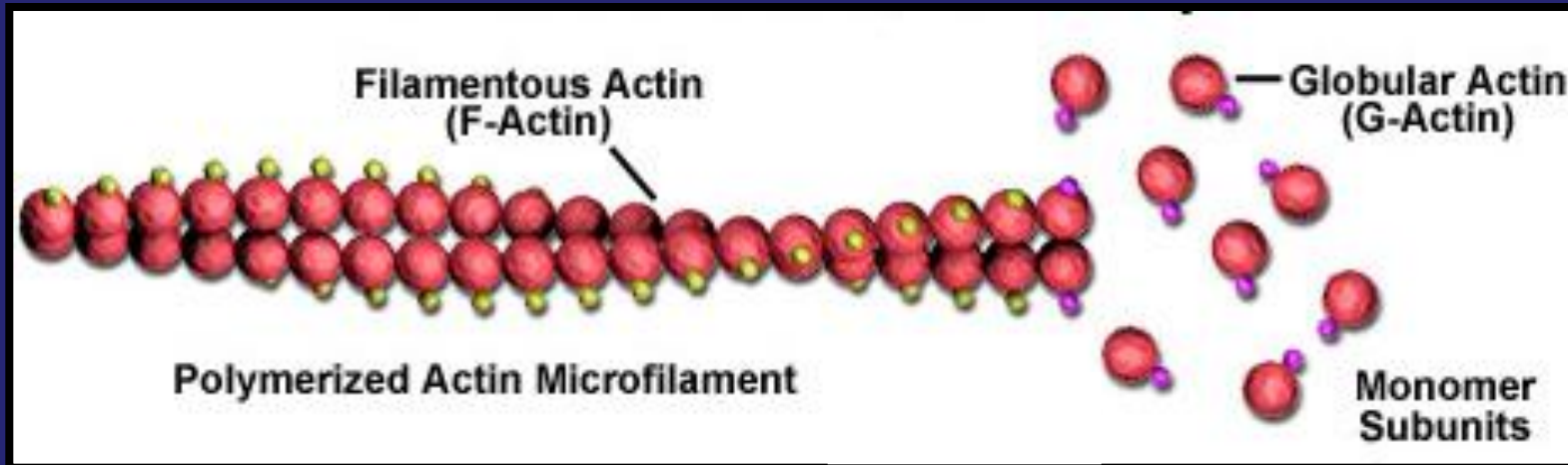
Aktinová filamenta

Aktinová filamenta

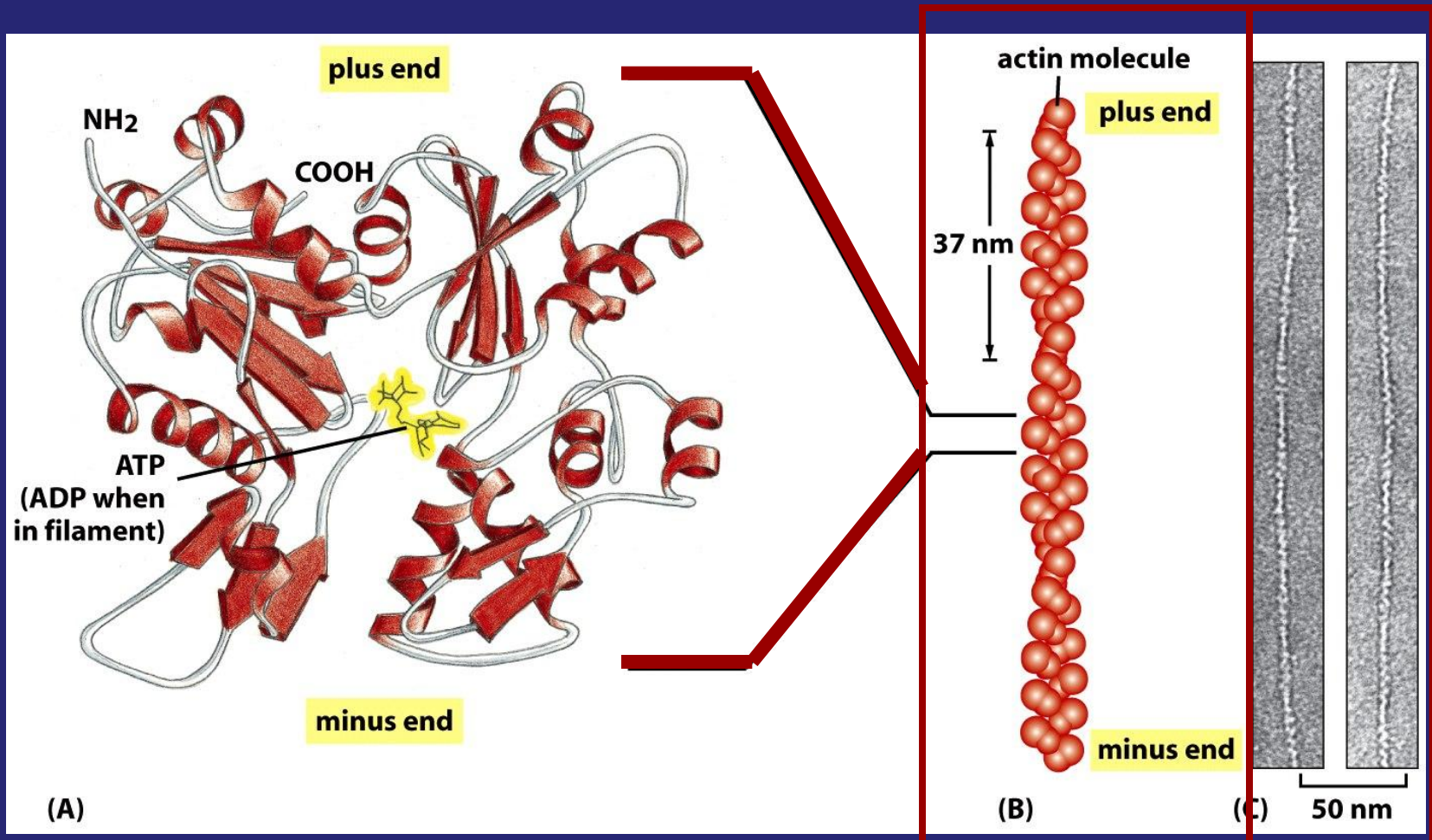
- vlákna o průměru cca 7-9 nm
- tvořené aktinem

- mechanicky podpůrná funkce
- spolu s myosinem tvoří kontraktilní aparát
- zodpovědný za mnoho typů vnitrobuněčných pohybů
 - proudění cytoplasmy
 - tvorba buněčných výběžků a invaginací buňky
- na vyšší úrovni organizace jsou aktin a myosin složky svalových buněk

Struktura aktinových filament



Struktura aktinových filament



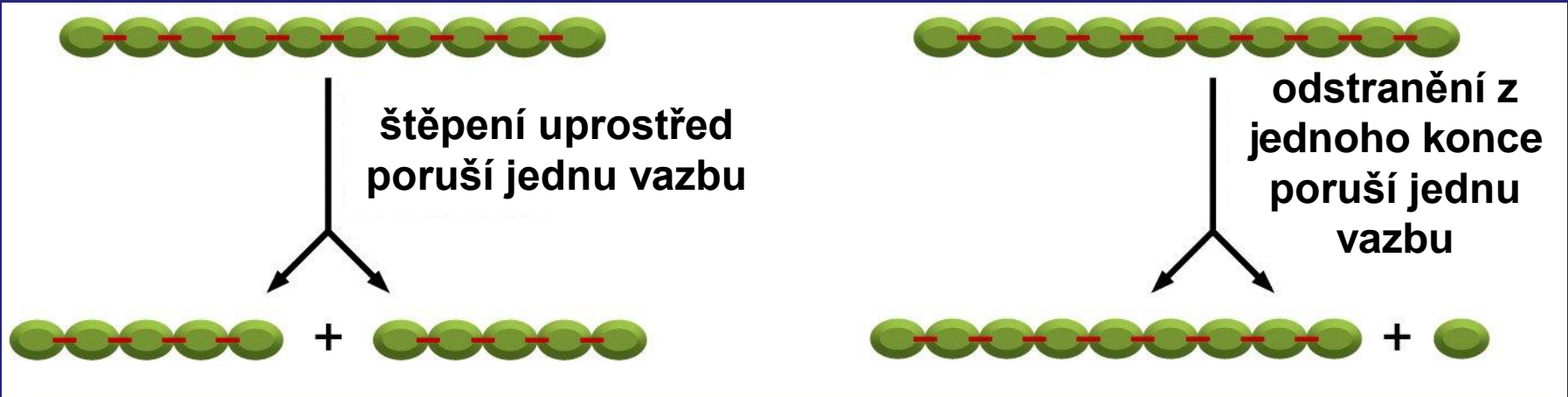
Filamenta odolávají teplotnímu poškození

Jednotlivé protofilamentum je teplotně
nestabilní



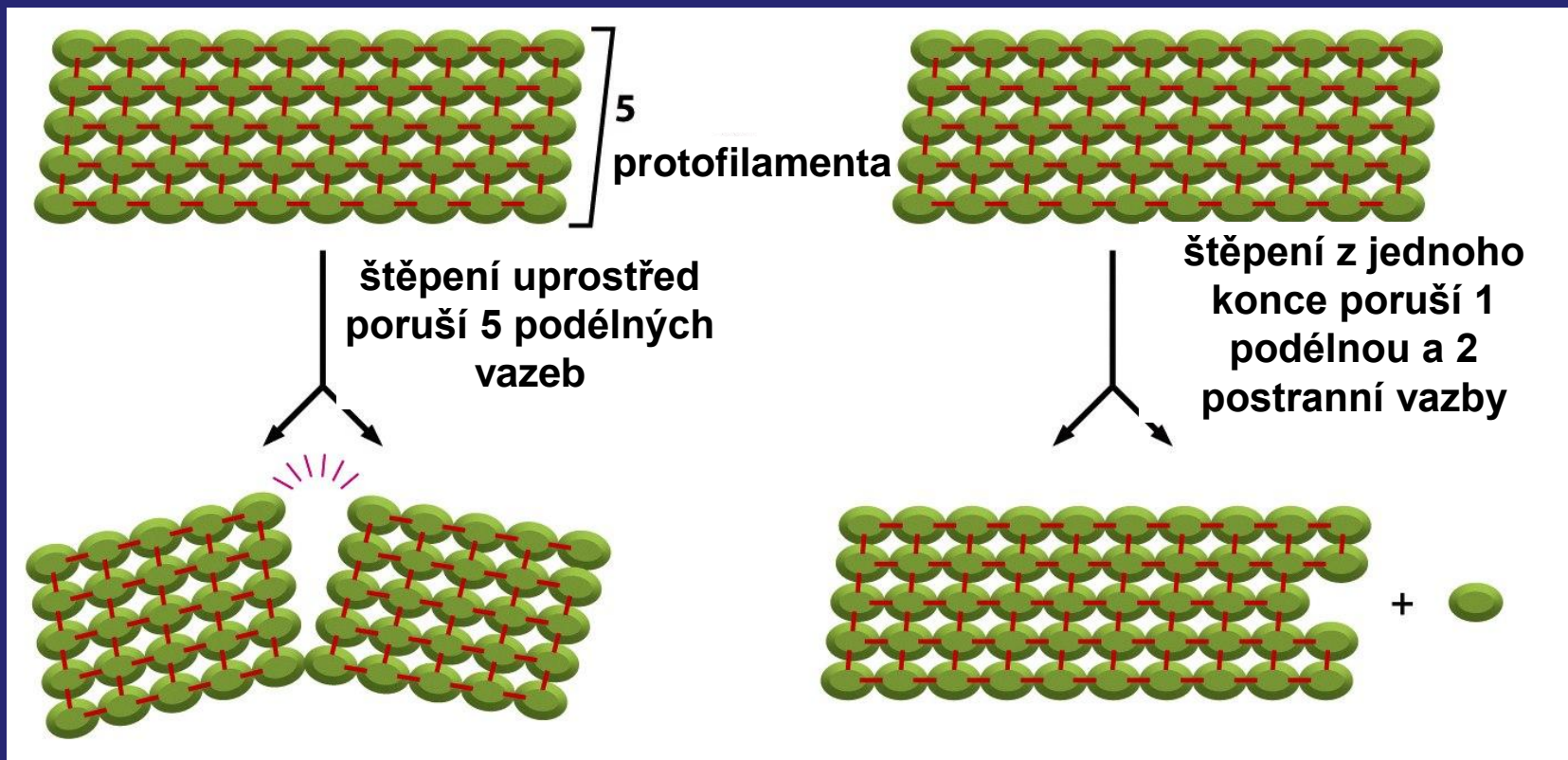
Filamenta odolávají teplotnímu poškození

Jednotlivé protofilamentum je teplotně nestabilní



Filamenta odolávají teplotnímu poškození

Více protofilament pohromadě je teplotně stabilní





Molekulární motory

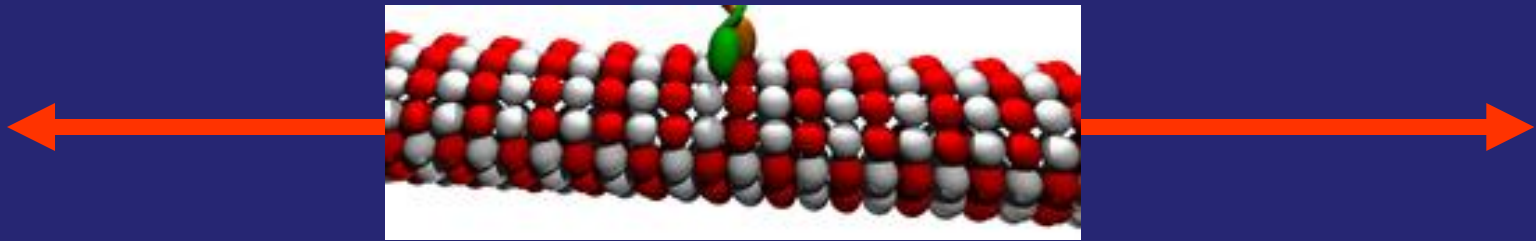
Molekulární motory

- **transportují náklady podél mikrotubulů**
- **řídí pohyb organel, váčků**
- **funkce spojena s hydrolýzou ATP**
- **kinesiny a cytoplasmatické dyneiny**

Kineziny a dineiny

Kinezin

Pohyb směrem k plus konci mikrotubulu, tj. od centrosomu k periferii buňky

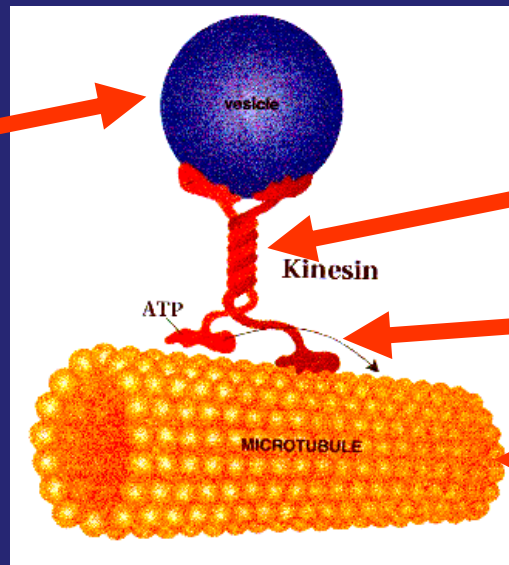


Dinein

Pohyb směrem k minus mikrotubulu, tj. k centrozómu

Kineziny

organela



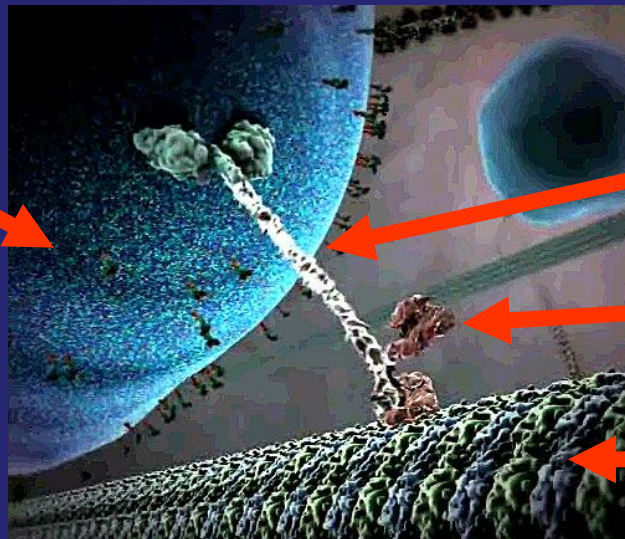
Kinezin (dimer)

ATP

mikrotubulus

Kineziny

organela

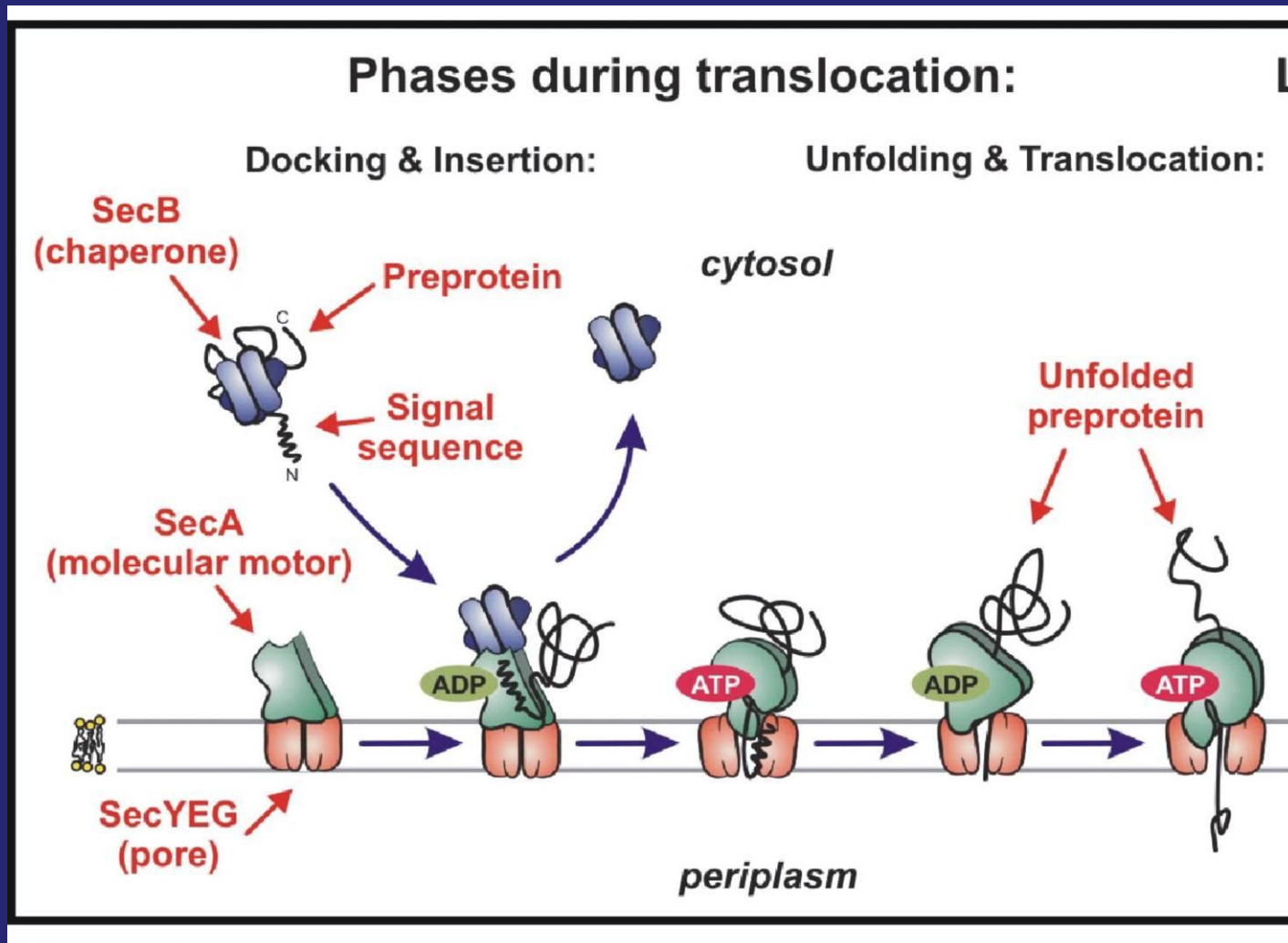


Kinezin (dimer)

ATP

mikrotubulus

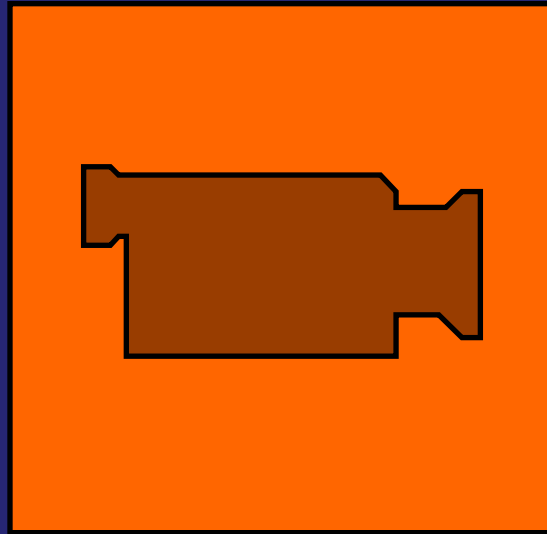
Fáze translokace



Animace

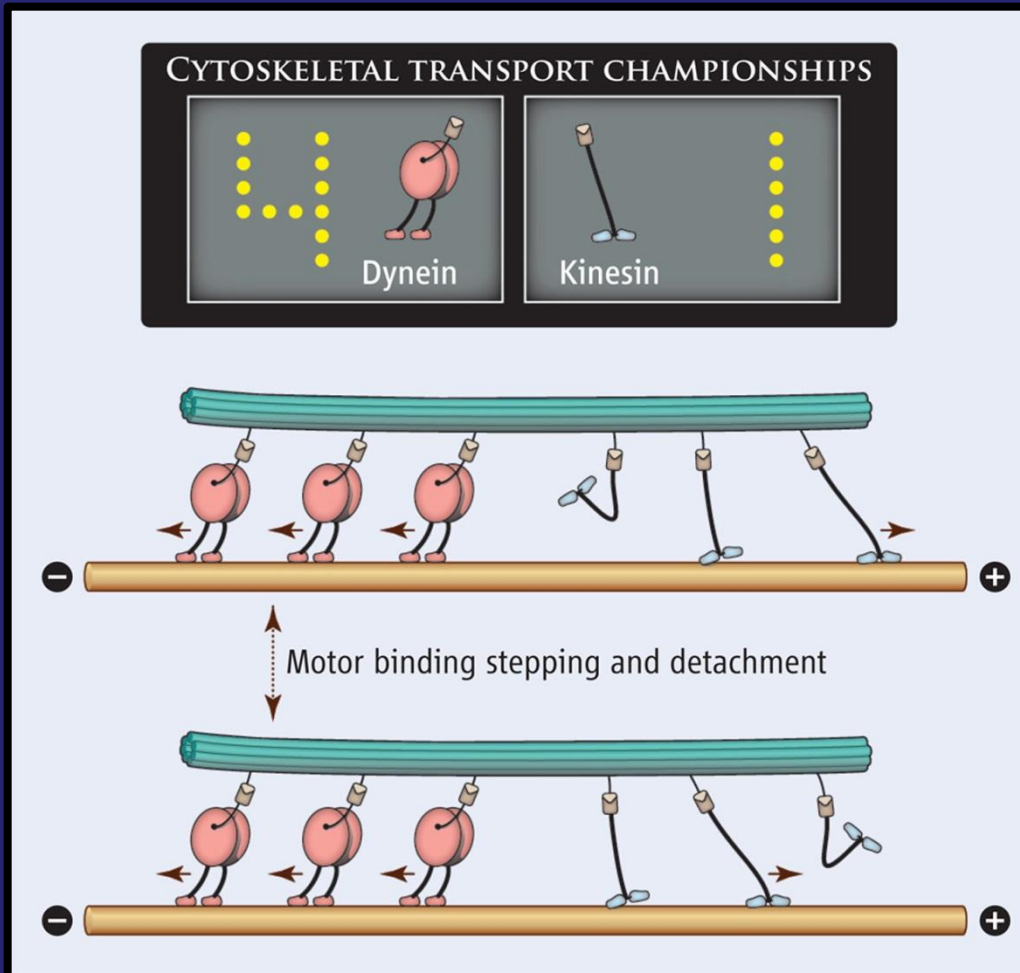
Kinesin Explanation

<http://www.youtube.com/watch?v=ILxIBB9ZBj4>



Kinesin.avi + 16.7 Kinesin.mov

Kdo je silnější?



- Jeden kinezin (tygr) působí silou 7pN, jeden dynein (lev) jen 6 pN
- Kineziny ale svoji činnost koordinují méně než dyneiny, respektive dyneiny mají vyšší afinitu k cílovým sekvencím

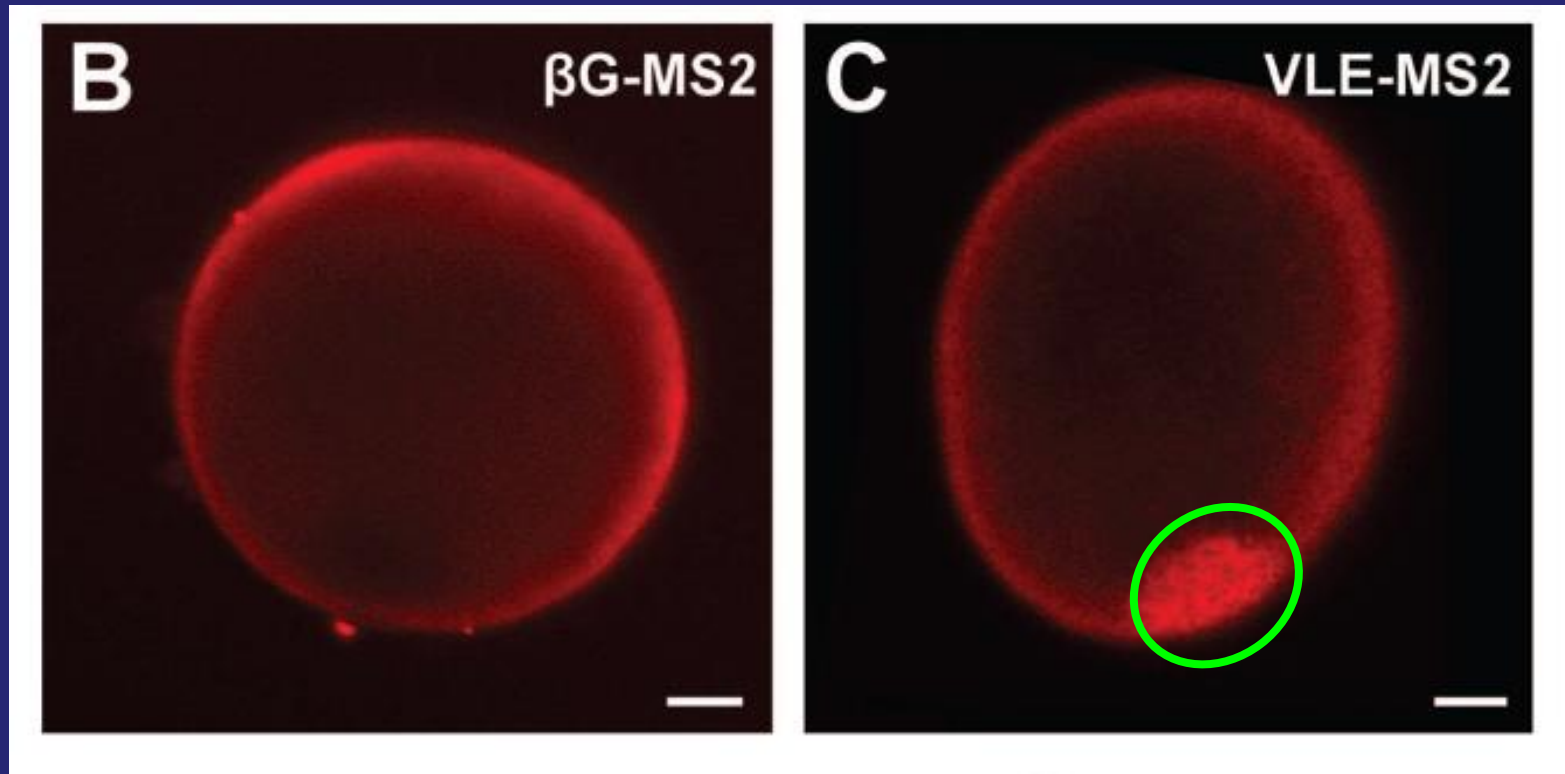
Diehl, M.R. (2012): Science 338: 626-627

Dyneiny a kineziny transportují RNA

- Lokalizace RNA v cytoplasmě rozhoduje o polarizaci buňky a následně i tkání, protože ...
 - ... RNA reguluje genovou expresi, a to znamená, že ...
 - ... nerovnoměrná distribuce RNA vede k prostorově závislé expresi genů
- Dyneiny zajišťují jednosměrný transport RNA k cílovým oblastem
- Kineziny transportují RNA oběma směry v blízkosti místa účinku
- Studováno na oocytech žab

Gagnon et al. (2013): Directional Transport Is Mediated by a Dynein-Dependent Step in an RNA Localization Pathway, PLOS Biology 11(4): e1001551

Ukázka lokalizace regulační RNA



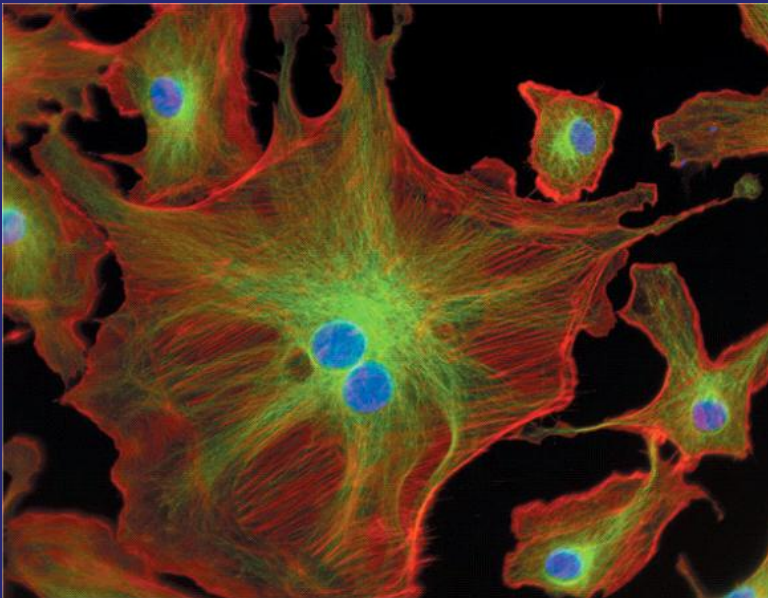
rovnoměrná exprese
 β -globinu

nerovnoměrná exprese
VLE RNA

Střední filamenta

Střední filamenta

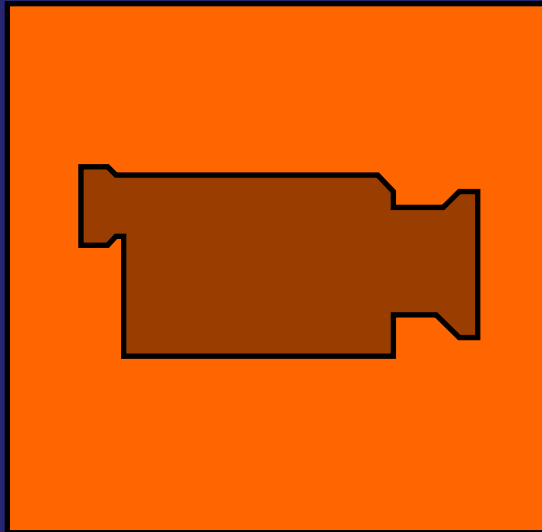
- vlákna lanového charakteru o průměru 10-15 nm
- tvořená multimery fibrilárních proteinů
- velikost a složení odlišná u různých typů buněk i mezi stejnými typy buněk u různých organismů



- přítomny v místech, kde buňka odolává tlaku (axony nervových buněk, kožní buňky)
- cytoplasmatická síť obklopující jádro
- pod jadernou membránou – zesílení jádra

Animace

Struktura středních filament



Typy středních filament

Dělí se podle základní proteinové podjednotky

- 1) Vimentin – pojivové tkáně, svaly, fibroblasty a epitely (cévy)**
- 2) Desmin – svalové buňky**
- 3) Neurofilamenta – axony neuronů**
- 4) Gliové fibrilární kyselé proteiny – gliové buňky**
- 5) Keratiny (cytokeratiny) – epitely, 30 podtypů (vlasy, peří, drápy, kůže, střevní výstelka)**

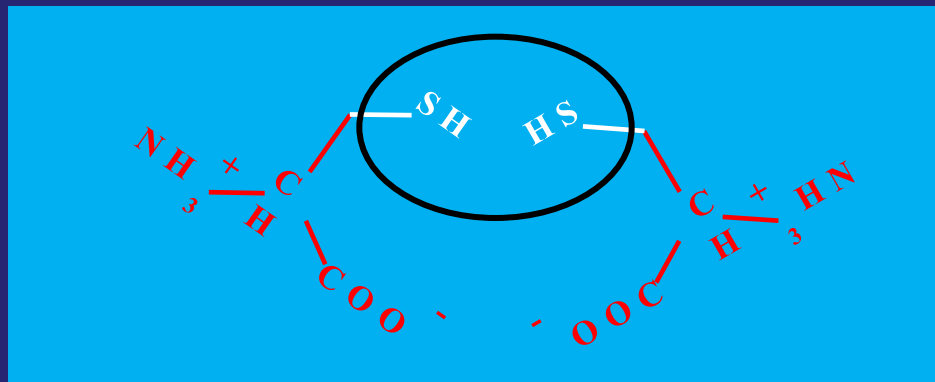
Střední filamenta a travičství

Příběh arsenu



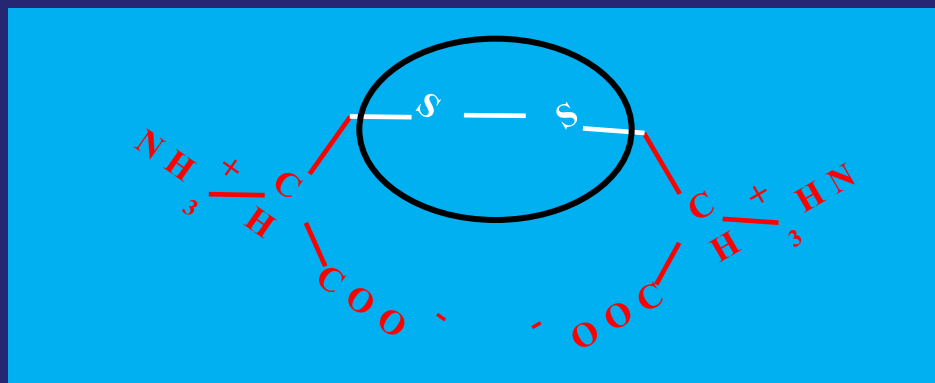
Keratin, cytoskelet a arsen I

- Keratin je nerozpustný ve vodě a má vláknitou strukturu, jednotlivé monomery mívají délku 400–644 aminokyselin, ale větví se do polymerů o velkých rozměrech.
- Konečný tvar molekuly - terciární strukturu - zajišťují disulfidické můstky. Lidské vlasy obsahují přibližně 14% cysteinů.



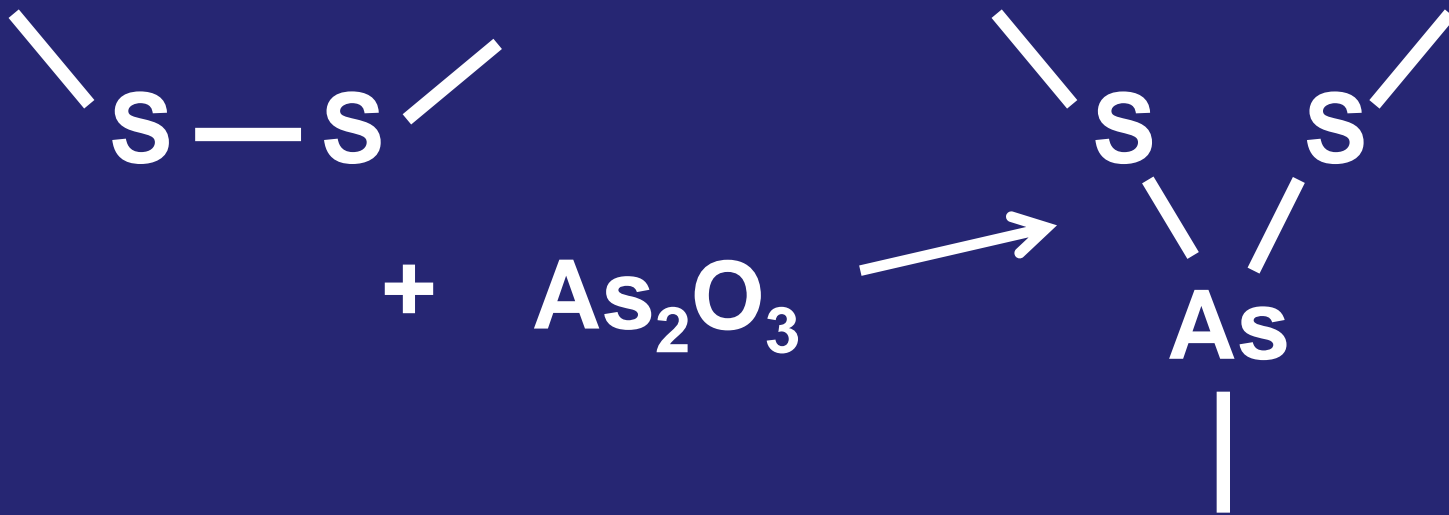
Keratin, cytoskelet a arsen I

- Keratin je nerozpustný ve vodě a má vláknitou strukturu, jednotlivé monomery mívají délku 400–644 aminokyselin, ale větví se do polymerů o velkých rozměrech.
- Konečný tvar molekuly - terciární strukturu - zajišťují disulfidické můstky. Lidské vlasy obsahují přibližně 14% cysteinů.



Keratin, cytoskelet a arsen II

- Arsen As^{III} má vysokou afinitu k atomům síry a váže se pevně k disulfidickým můstkům



- Arsen ve vlasech nebo nehtech můžeme nalézt i po velmi dlouhé době

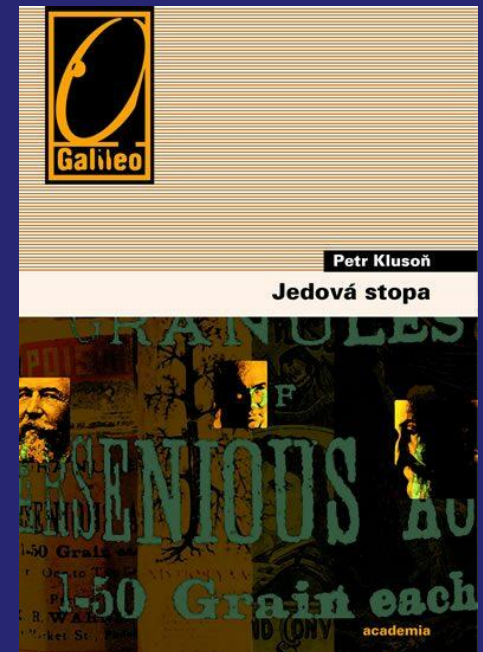
Dynamika arsenu ve vlasech

- Oxid arsenitý As_2O_3 při otravě cirkuluje v krvi a ukládá se ve vlasovém folikulu, odkud je „vychytáván“ vlasovým folikulem
- Jak se mění koncentrace As^{III} v krvi, mění se i jeho ukládání ve vlasech/nehtech
- Průměrná doba života vlasu činí 900 dní, tedy 2,5 roku; rychlost růstu vlasu je 1 cm/měsíc
- Rentgenově fluorescenční analýza umožňuje rozlišit méně než 1 mm
- Vývoj otravy lze sledovat s přesností na dny (kdy a kolik jedu bylo podáno)

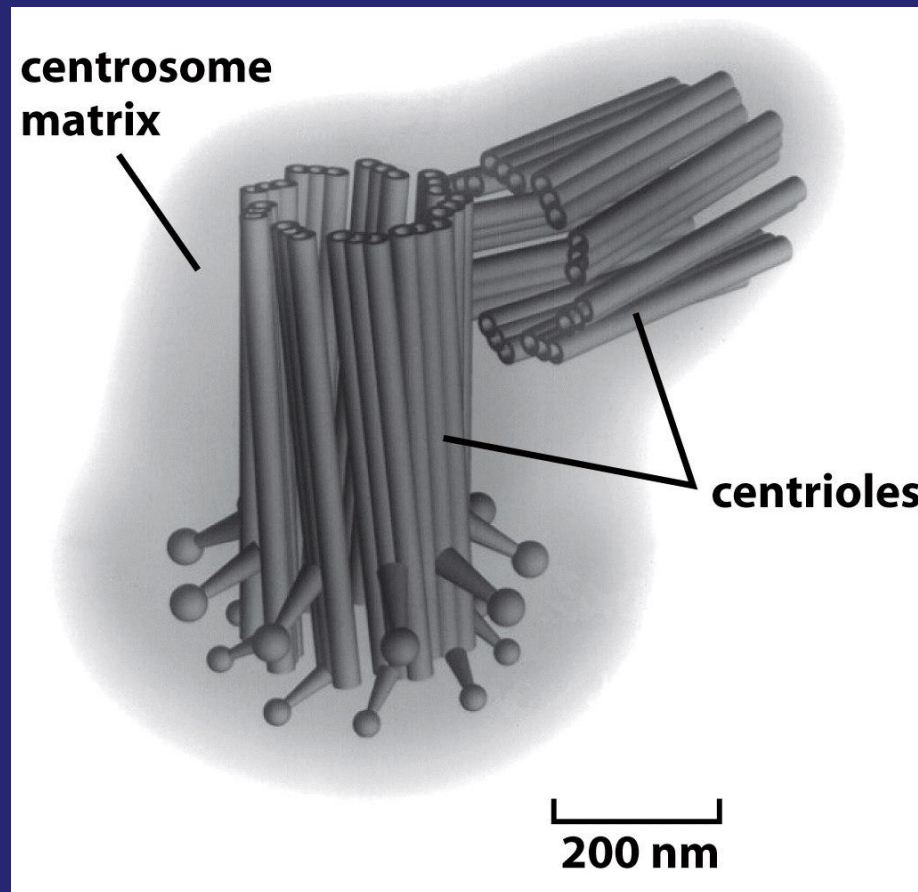
**Znáte příklady
travičských afér
z historie?**



Více si přečtete v knize
Petr Klusoň: Jedová
stopa, Academia
Praha, 2015

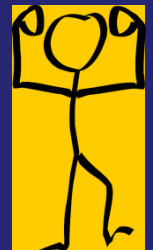


Centrozóm – dělicí (mitotické) tělísko



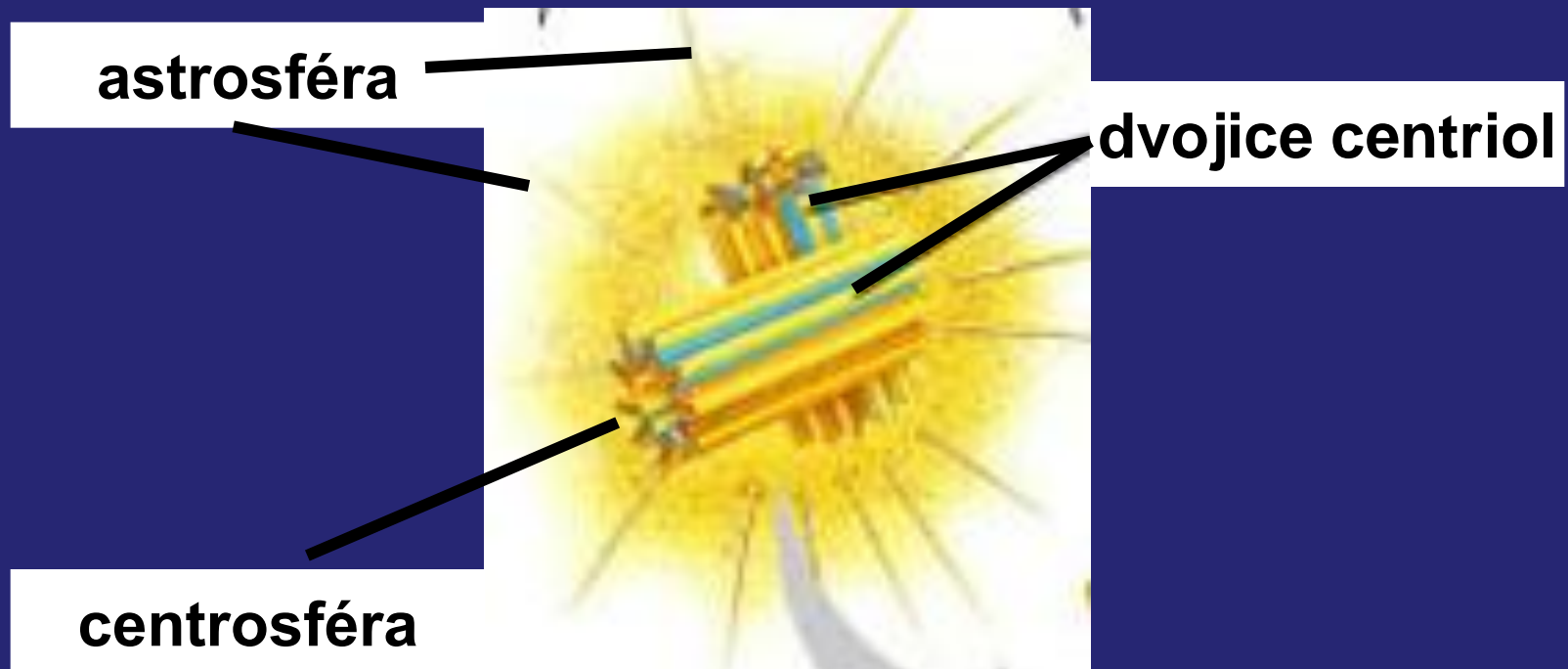
Co je centrozóm

- **organela živočišných buněk a buněk nižších rostlin**
- **vyskytuje se v blízkosti jádra**
- **seskupení mikrotubulů a asociovaných proteinů**
- **účastní se separace chromozómů při dělení jádra**
- **podmiňuje orientaci chromozómů a pohyb jejich rozdělených částí k pólům dělicího vřeténka**
- **při zrání vaječné buňky zaniká**
- **do zygoty je centrozóm přenášen spermií**

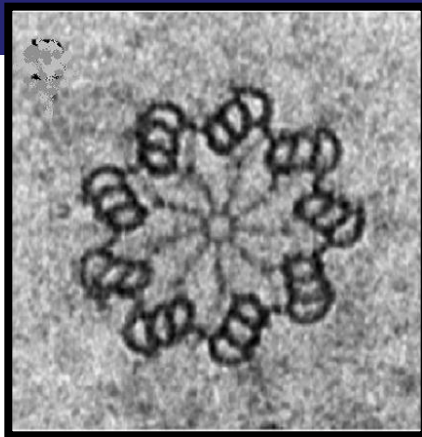


Struktura centrozómu

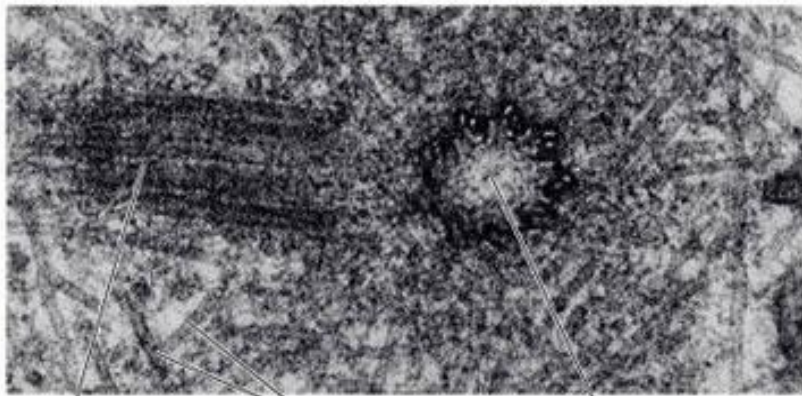
- **centriola** - středové tělísko
- **centrosféra** - hustá bezstrukturní síť kolem centrioly
- **astrosféra** - řídká vlákna cytoplazmy vybíhající z centrosféry



Detaily struktury centrozómu



0.25 μm



Longitudinal section
of centriole

Microtubules

Cross section
of centriole

centrozóm

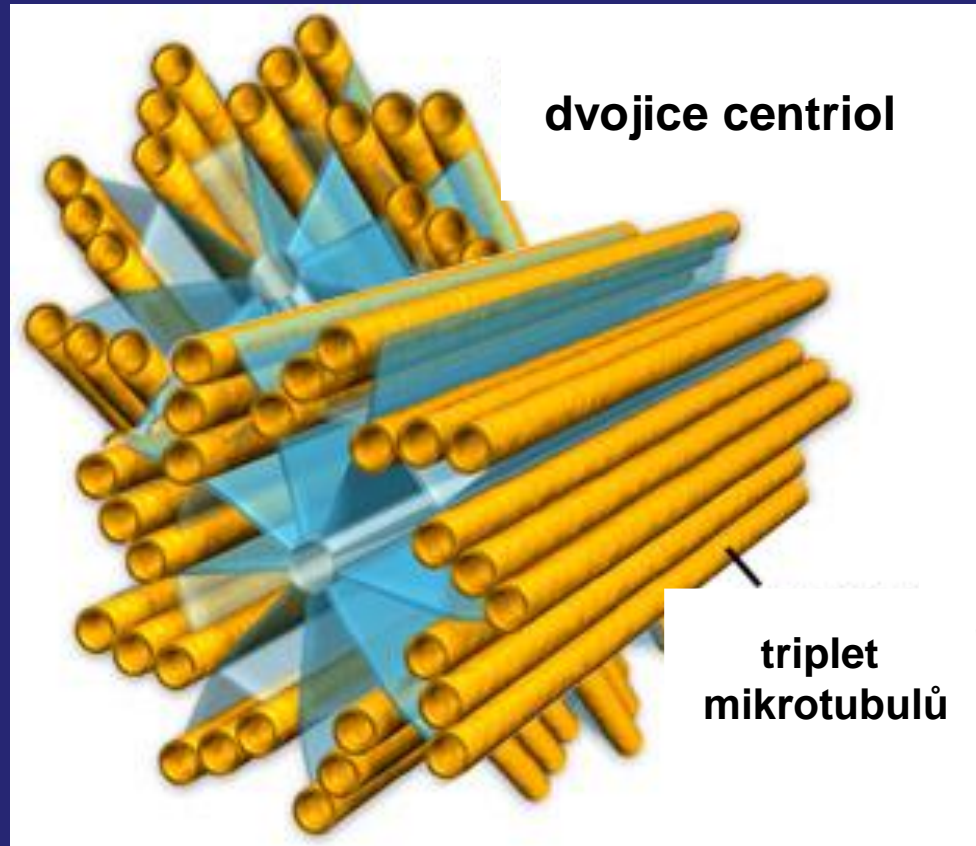
dvojice
centriol

mikrotubuly

centrioly

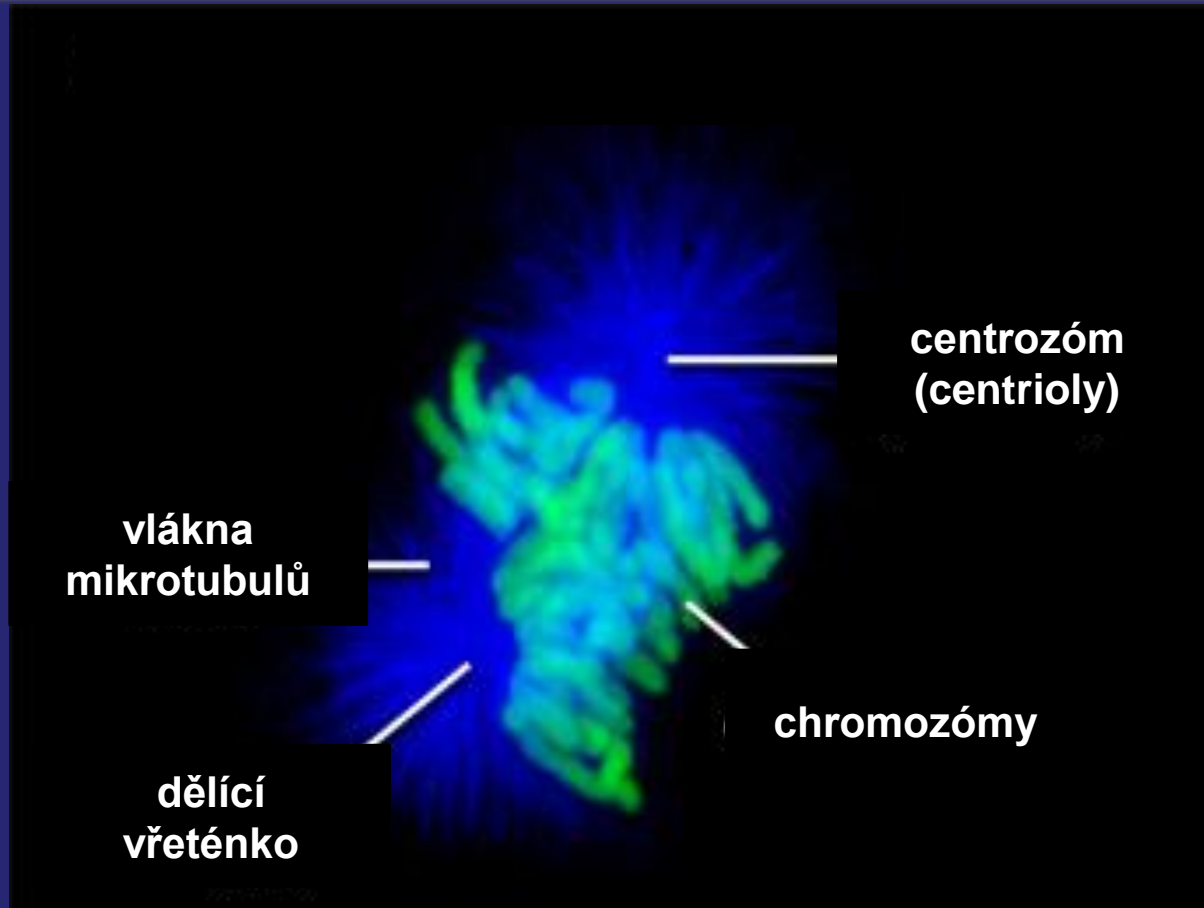
9 sad trojic mikrotubulů

Struktura centrioly



V každé centriole je 9 mikrotubulárních tripletů

Centriola při mitóze



Další informace na

http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n9/slideshow/nrm0901_688a_F1.html

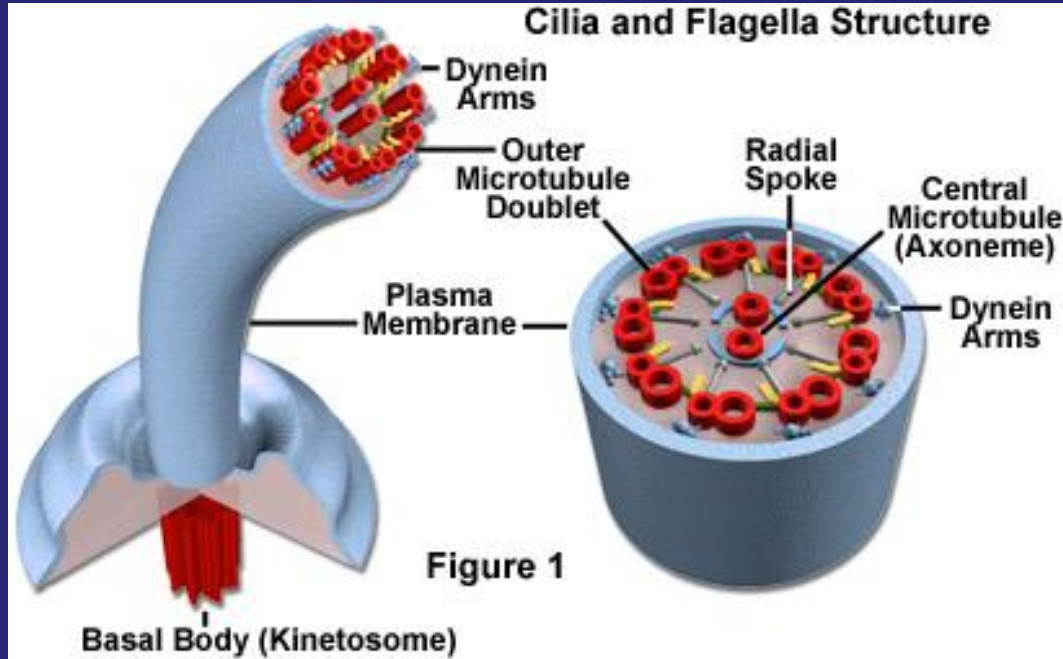
Jsou centrioly nositeli informace?

<http://www.osel.cz/8311-jsou-centrioly-nositelkami-informace.html>

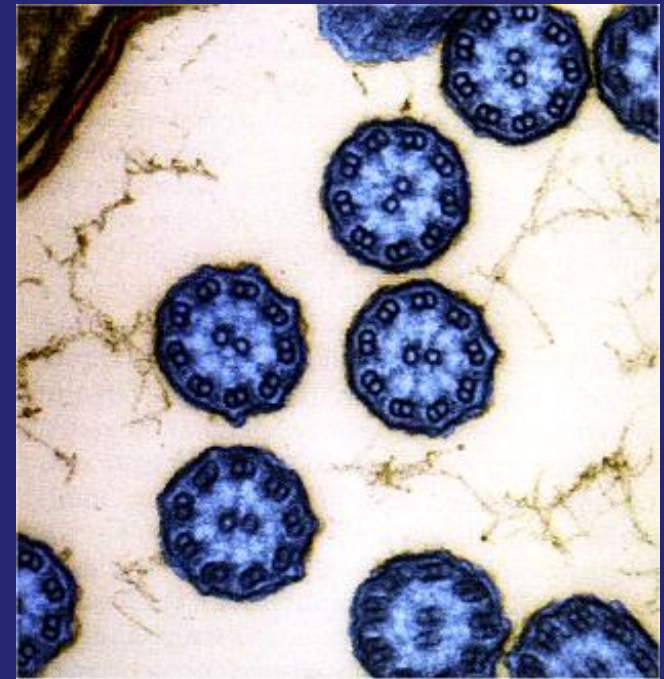
Původní článek

Balestra FR, von Tobel L, Gonczy P. Paternally contributed centrioles exhibit exceptional persistence in *C. elegans* embryos. Cell Research 24 April 2015. DOI: 10.1038/cr.2015.49

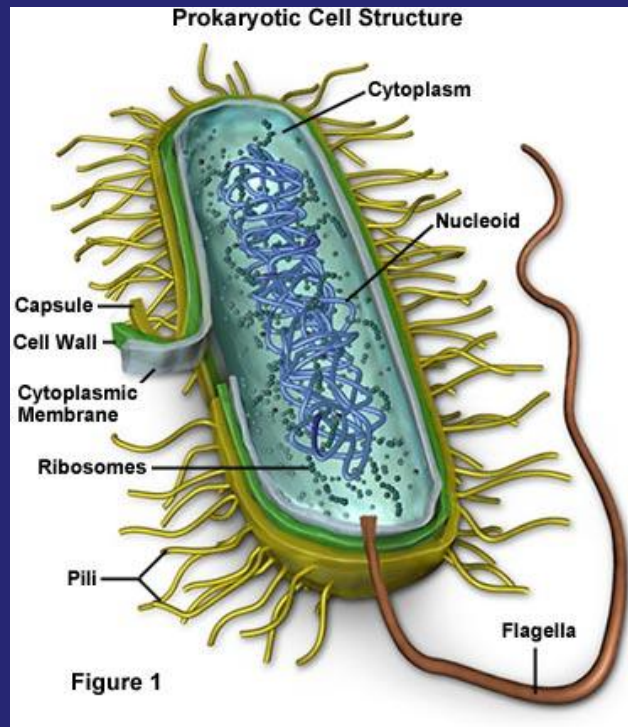
Bičik eukaryotické buňky



**9 párů mikrotubulů (protein tubulin)
+ protein dynein**



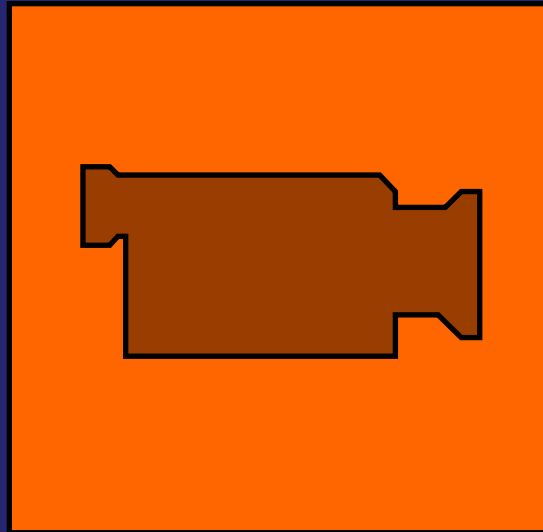
Pohybový aparát prokaryot



Mikrotubuly

Animace

Bakteriální bičík



Mají prokaryota cytoskelet?

- **cytoskelet byl považován za výsadu eukaryotických buněk**
- **ani elektronovým mikroskopem nebylo možno nic najít**



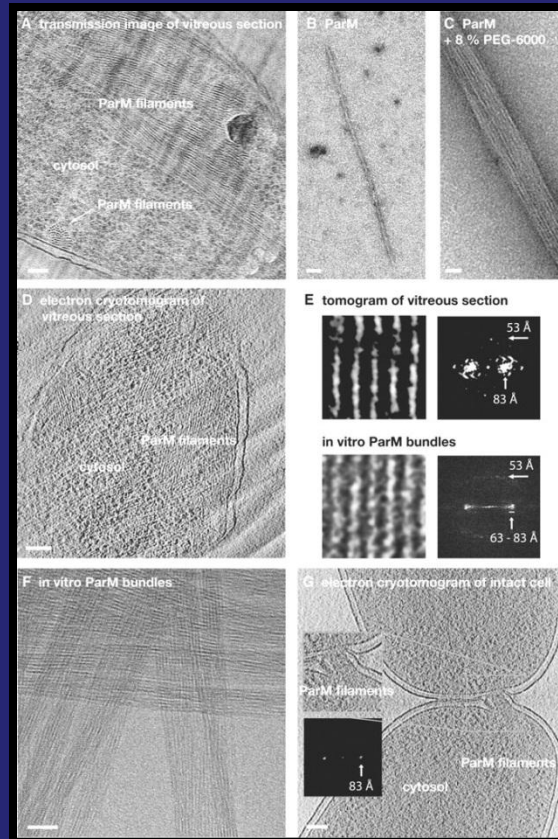
LEDEN 2009



**Salje et al. objevili filamenta bakteriálního cytoskeletu
odpovědná za segregaci DNA**

Použili metodu kryo-elektronové mikroskopie

Přímé pozorování svazků filament u *E. coli*

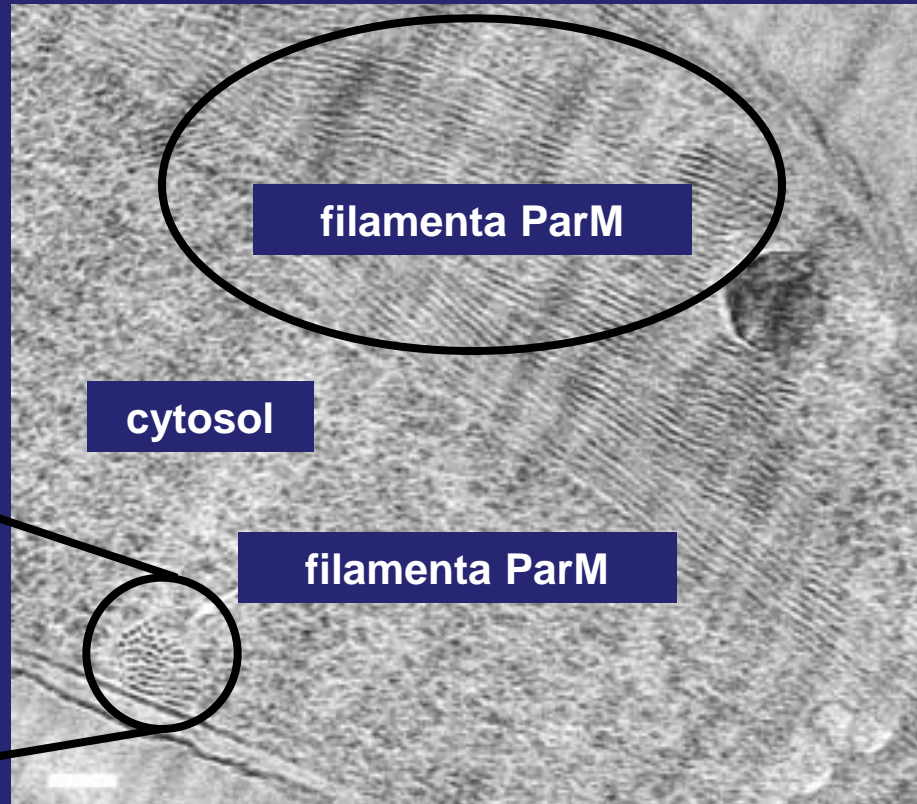


J. Salje et al., Science 323, 509-512 (2009)

Fotografie průhledných struktur

Fotografie průhledných struktur
transmisním EM

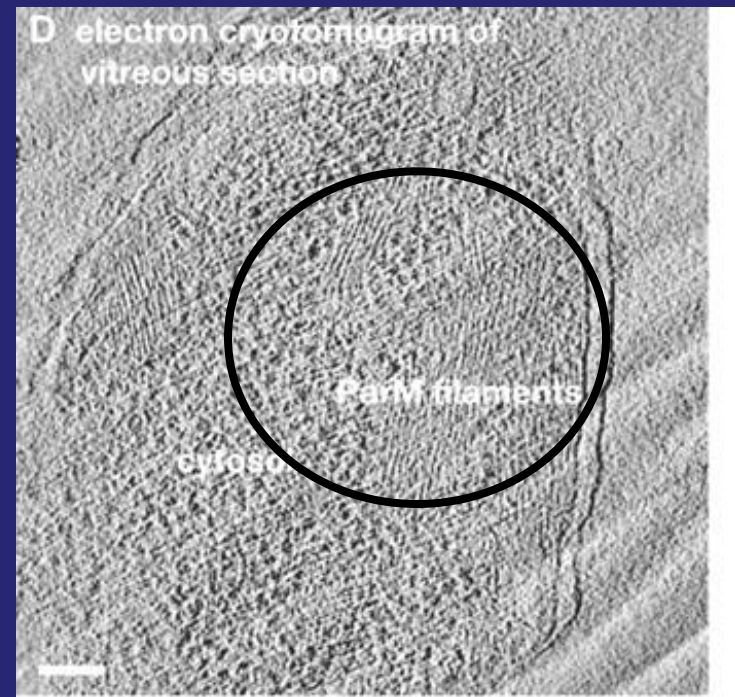
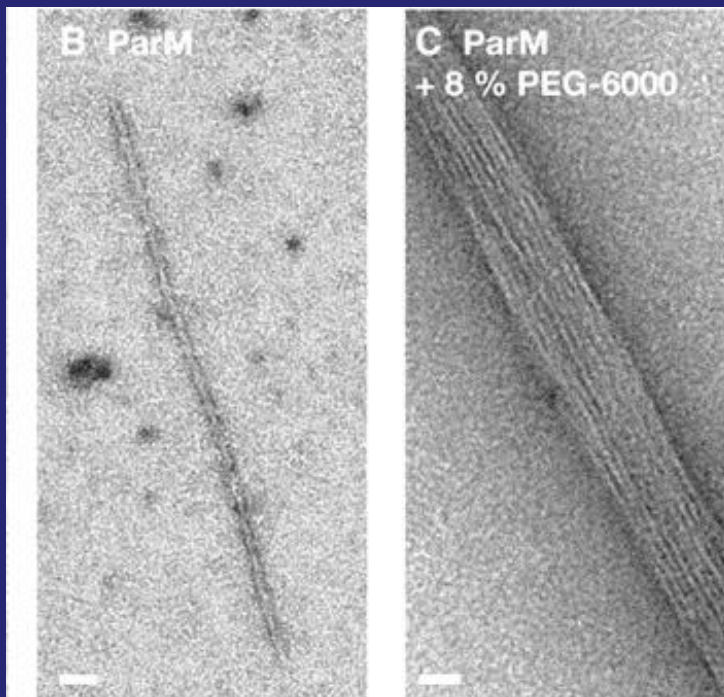
pohled podél
podélné osy



Detaily 1/2

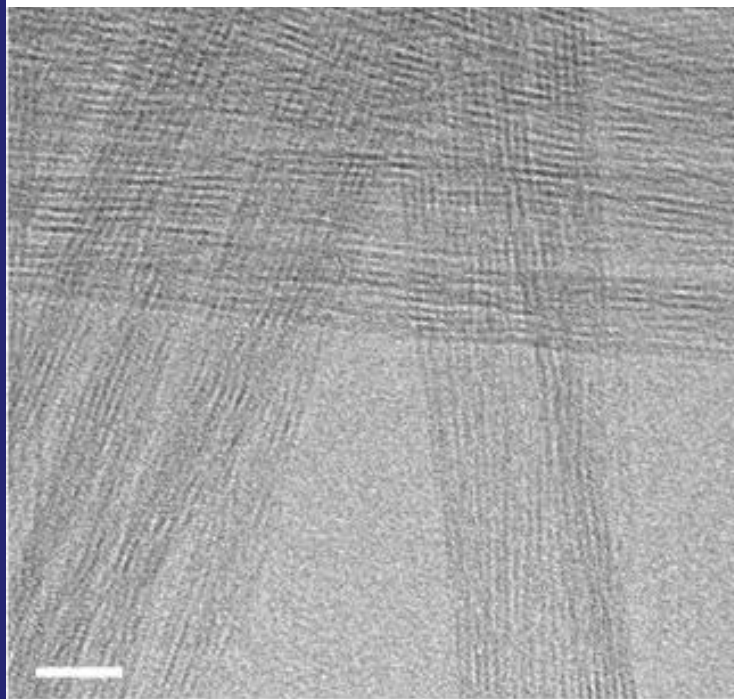
detail filamenta

kryotomogram

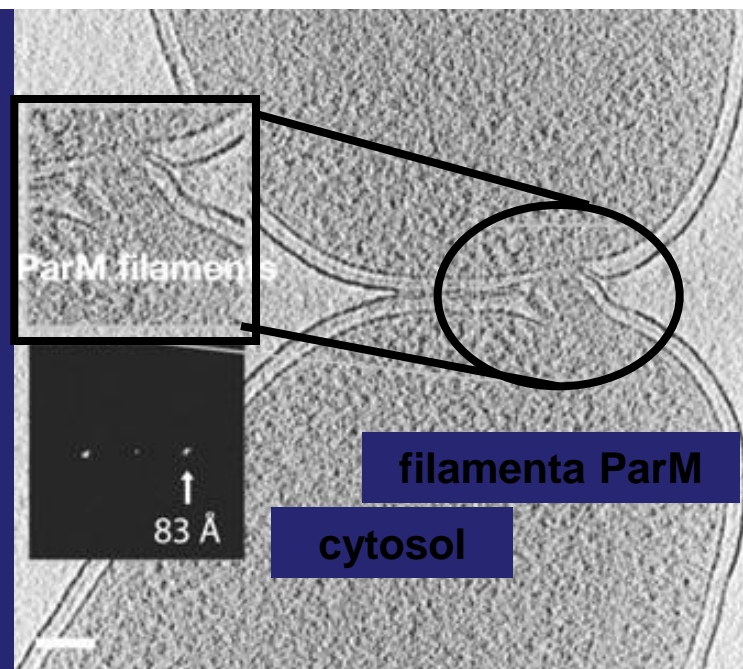


Detaily 2/2

filamentum v *in vitro*
systému

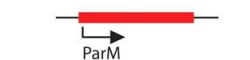




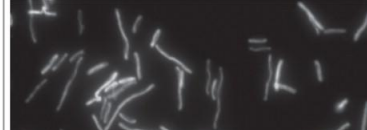


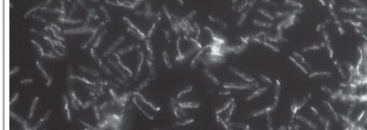


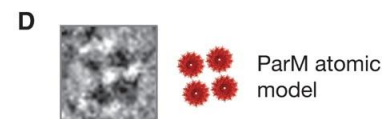
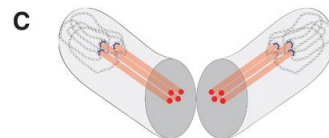
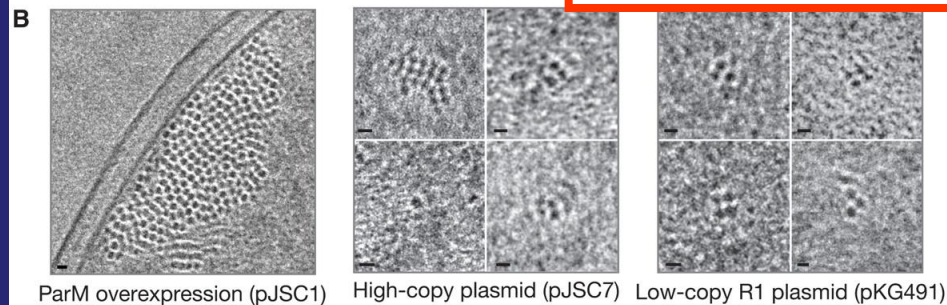
kryotomogram intaktní
buňky



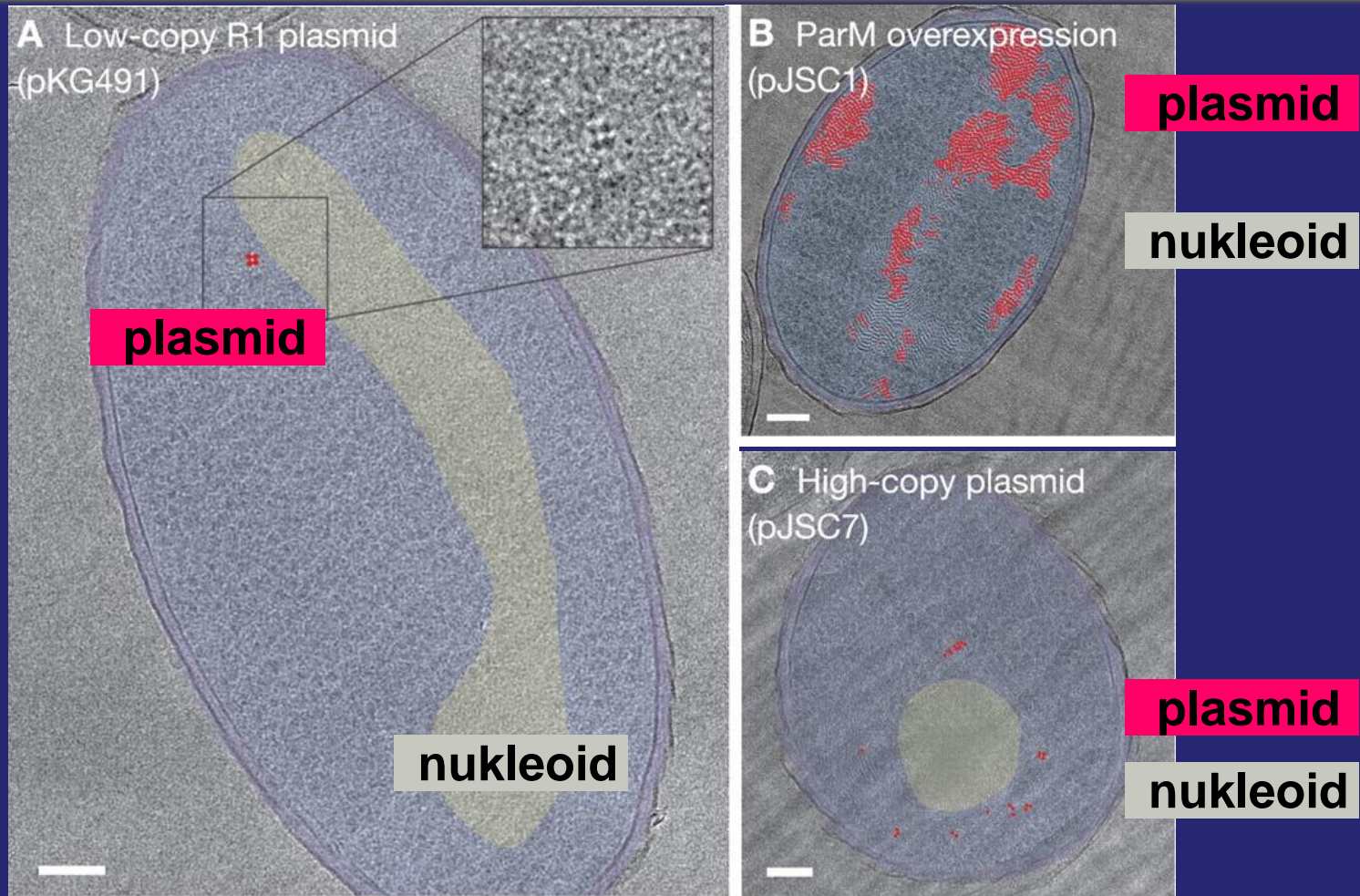
Filamenta v procesu segregace plasmidové DNA

A

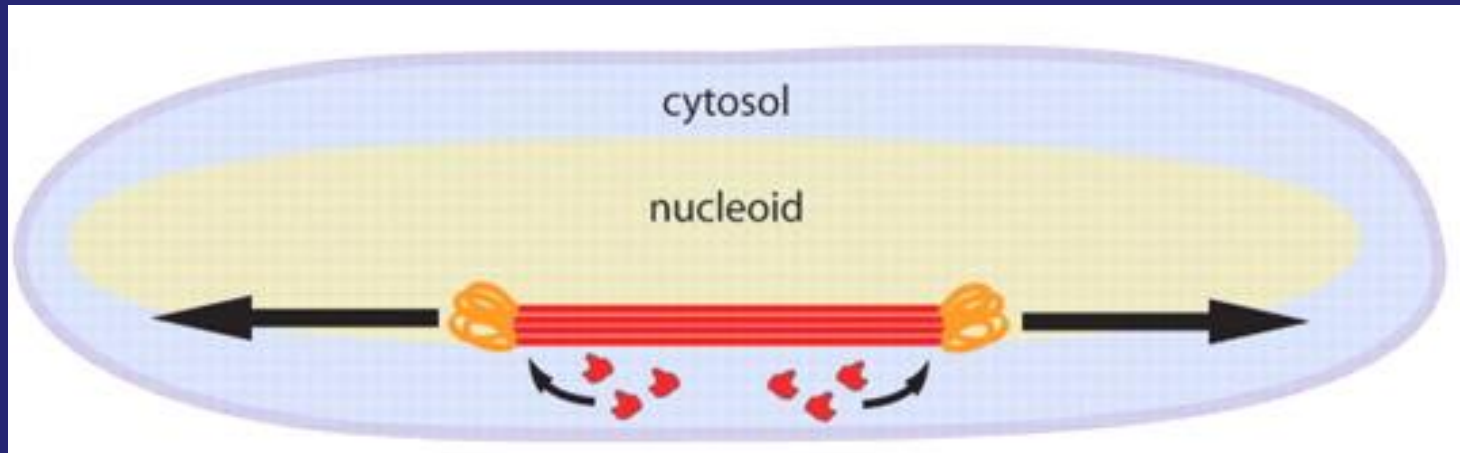
Description	Schematic	Immunoblot	Immunofluorescence microscopy
ParM overexpression (pJSC1)	 <p>High-copy plasmid (pBR322 replicon) T7 promoter overexpression</p>		
High-copy plasmid with ParMRC system (pJSC7)	 <p>High-copy plasmid (pBR322) Native promoter 3 copies of ParMRC</p>		
Low-copy R1 derived plasmid with ParMRC system (pKG491)	 <p>Low-copy plasmid (R1 replicon) Native promoter</p>		



Filamenta leží na periferii nukleoidu



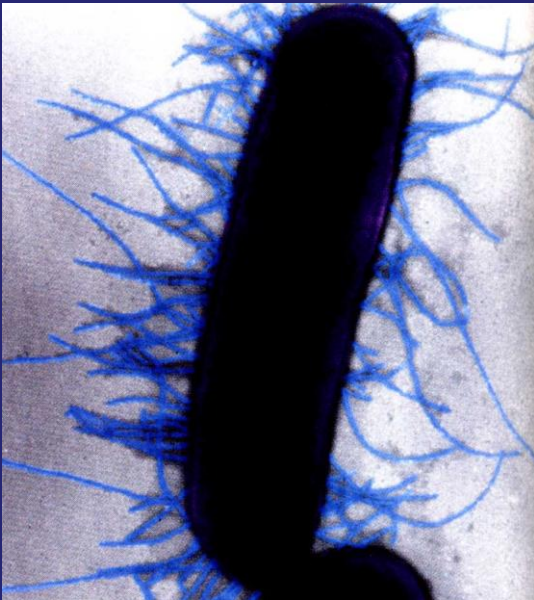
Model segregace plasmidové DNA



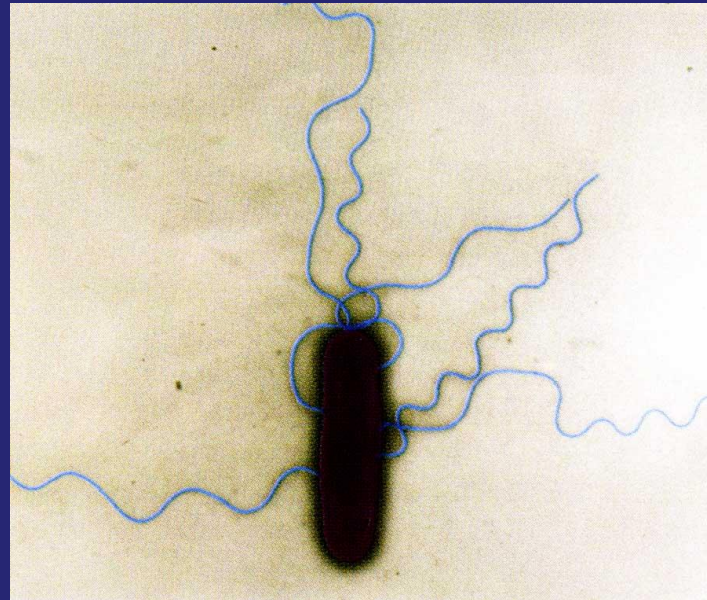
- svazky filament ParM, které zajišťují rozchod plasmidu leží na periferii nukleoidu
- zde jsou molekuly plasmidu zachyceny a následně rozdělovány do dceřiných buněk

Mikrotubuly prokaryot

→ pili (fimbrie), flagela (bičíky)



pili u *E. coli*



flagela u r. *Salmonella*

Rychlost pohybu organismů

Kdo je rychlejší – makro nebo mikroorganismus?

Organismus	Km/h	Délek těla/s
Gepard	111	
Člověk	37,5	
Bakterie	0,00015	

*Když **Bdellovibrio** napadá **Pseudomonas phaseolicola***

Bdellovibrio je 1-2 μm dlouhá bakterie, která napadá periplasmatický prostor gram⁻ bakterií

Rychlost průniku do bakterie je až 100 násobkem velikosti parazita



Jestliže je velikost člověka 1,8 m, jakou rychlostí by se takový člověk pohyboval?