

## **Cytoskelet**

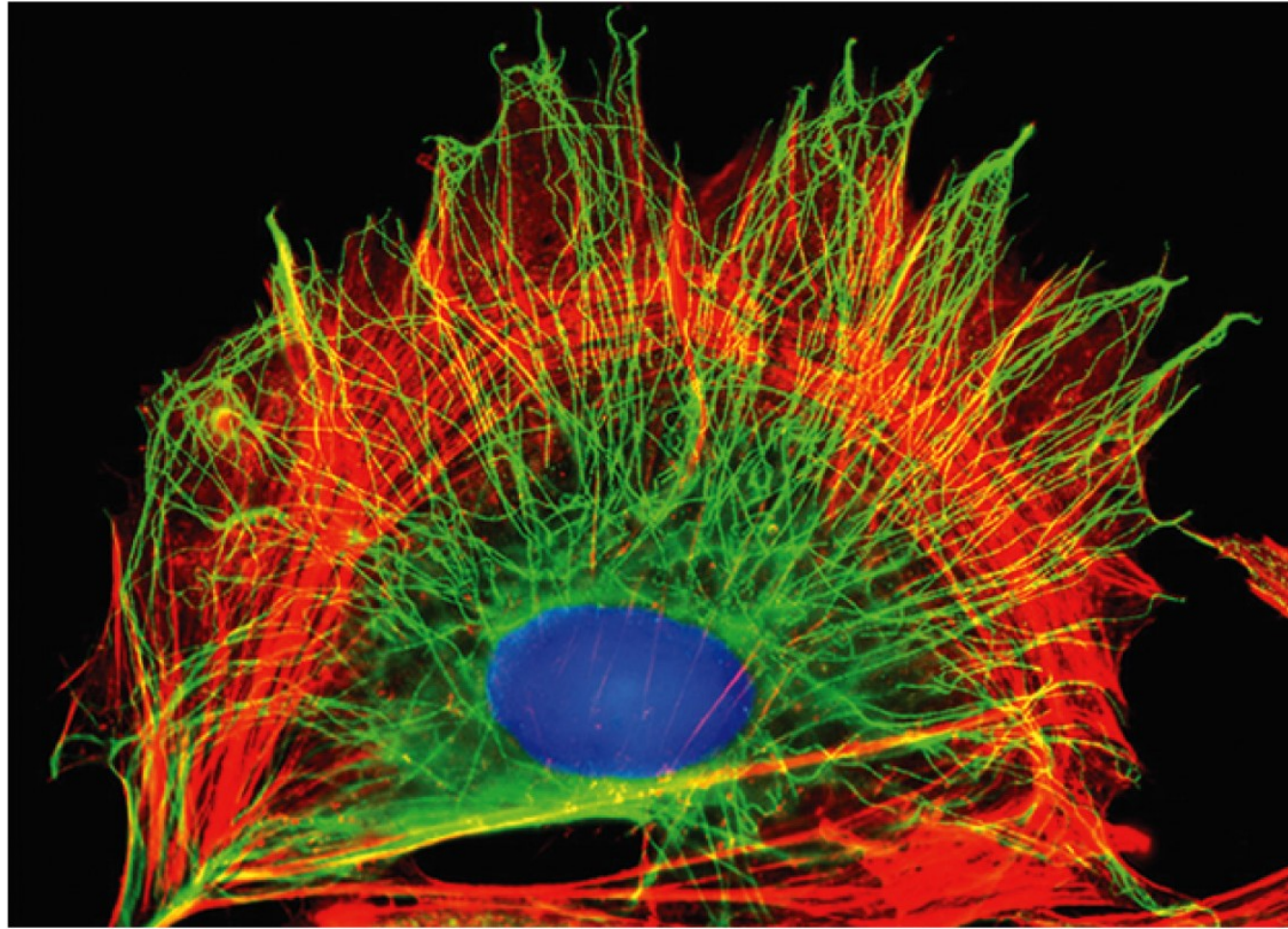
doc. Mgr. Vítězslav Bryja, Ph.D.

- ♦ 7) CYTOSKELET A JEHO FUNKCE – základní složky cytoskeletu (mikrofilamenta, intermediární filamenta, mikrotubuly) - jejich struktura a funkce; dynamická nestabilita, cytoskeletální toxiny, příklady proteinů asociovaných s mikrofilamenty a mikrotubuly a jejich funkce, molekulární motory – typy a funkce, centrozom a jeho cyklus, cilia – primární a pohyblivá. Pohyb buněk a přispění buněk k pohybu organismu: pohyblivá cilia, mitóza vč. funkce cytoskeletu v mitóze, pohyb buňky po substrátu – základní mechanismy a účastníci se proteiny, svalový stah z molekulárního pohledu – příčně pruhovaný a hladký sval.
- ♦ 8) ZÁKLADNÍ PRINCIPY SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE - základní dělení jednotlivých typů buněčné signalizace, pozitivní a negativní zpětná vazba vč. příkladů, hlavní biochemické mechanismy (fosforylace a výměna GTP/GDP) a jejich regulace, přehled základních typů membránových receptorů; druhý posel – principy a hlavní příklady; vápníková signalizace, receptory spřažené s trimerickými G proteiny, receptorové tyrosin kinázy, malé GTPázy, funkce rhodopsinu v procesu vidění. VÝZNAMNÉ SIGNÁLNÍ DRAHY - signální dráhy významné pro regulaci embryonálního vývoje a imunologie – JAK/STAT, NFκB, TNFα, Wnt, TGF/BMP, Hedgehog, Notch (pouze nejzákladnější principy a klíčové proteiny).
- ♦ 9) BUNĚČNÁ BIOLOGIE V ČÍSLECH (pro člověka) – velikost lidské buňky, počty hlavních biomolekul v buňce, počty buněk v těle, velikost – voda, lipidové membrány, proteinů, ribozomu, cytoskeletu (včetně rozlišení elektronového a optického mikroskopu), délka a počet bazí DNA, počet genů, délka buněčného cyklu, délka „života“ buněk – krátce a dlouze žijící buňky, rychlost pohybu buňky a motorů po cytoskeletu, rychlost nervového vzruchu

## Nejpočetnější proteiny v buňce?

- Reálná data
- Proteiny jako molekulární stroje, DNA jako návod na jejich výrobu a malé metabolity jako palivo

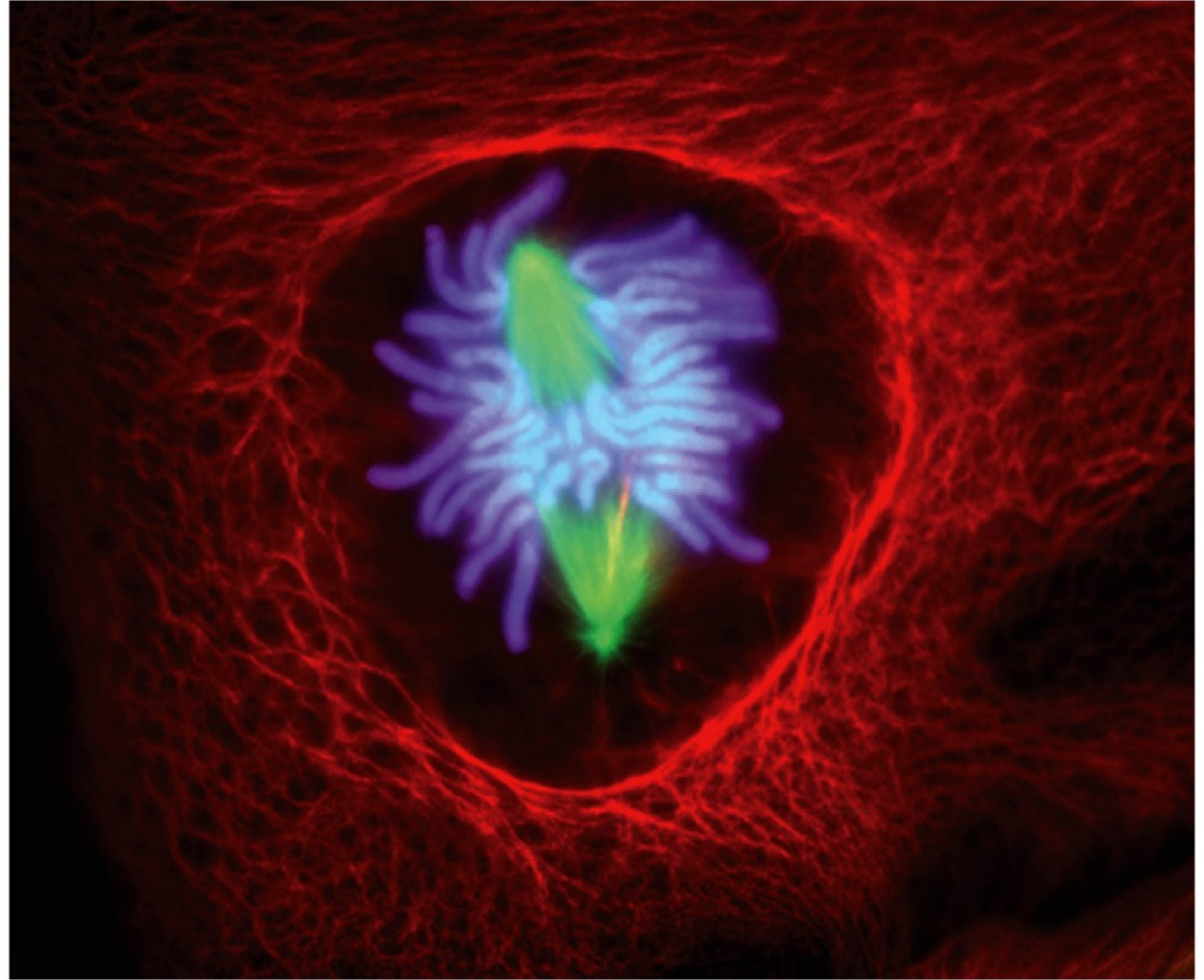
# CYTOSKELETON



10  $\mu\text{m}$

Figure 16-1a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

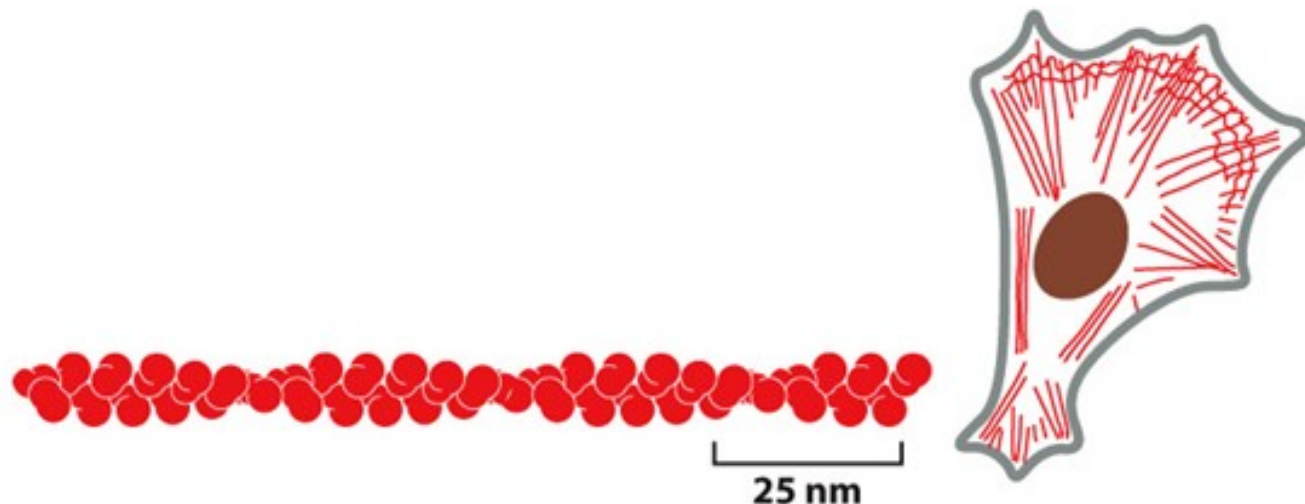
# CYTOSKELETT



20  $\mu\text{m}$

Figure 16-1b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

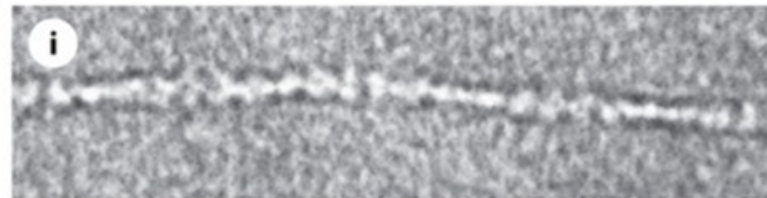
## Aktinová filamenta = mikrofilamenta



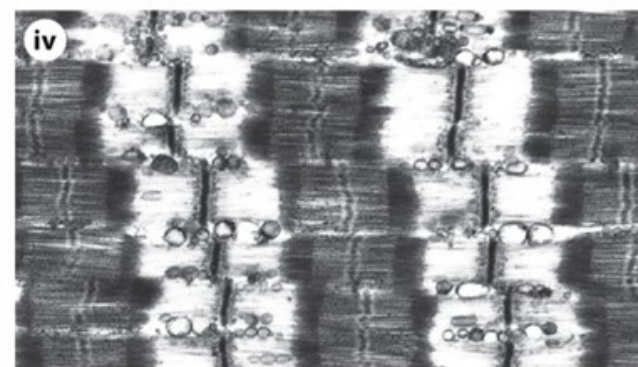
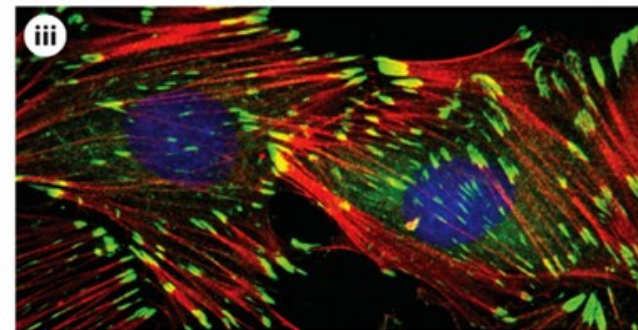
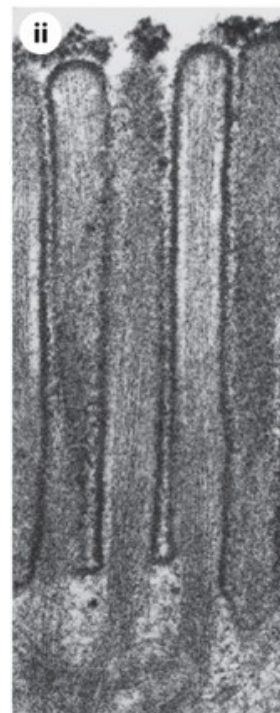
- zvaná také mikrofilamenta
- spirálovitá vlákna/polymery tvořené proteinem aktinem
- tvoří flexibilní struktury o průměru 8 nm, které mohou být organizovány do lineárních svazků, dvou- či trojrozměrných sítí
- jsou rozprostřena po celé buňce, ale koncentrována jsou především přímo pod cytoplasmatickou membránou

## Aktinová filamenta = mikrofilamenta

- i) jednoduché aktinové filamentum
- ii) microvilli
- iii) stresová vlákna (červeně) končící ve fokálních adhezích (zeleně)
- iv) příčně pruhovaný sval

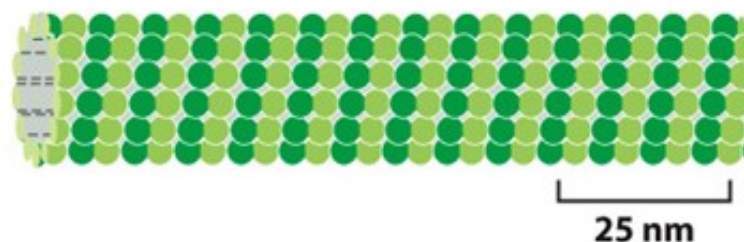


100 nm



Micrographs courtesy of R. Craig (i and iv); P.T. Matsudaira and D.R. Burgess (ii); K. Burridge (iii).

## Mikrotubuly

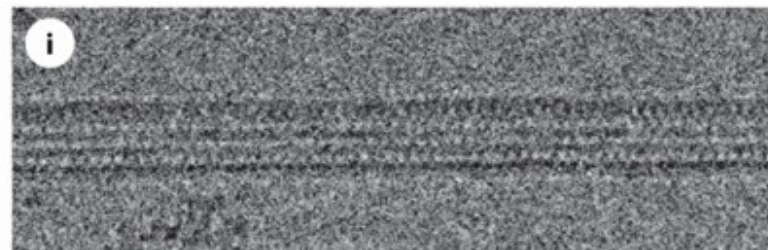


- dlouhé duté válce tvořené proteinem tubulinem (vnější průměr 25 nm)
- tužší oproti aktinovým filamentům
- dlouhá rovná vlákna, často jedním koncem uchycená v mikrotubuly-organizujícím centru (MTOC) zvaném centrozom

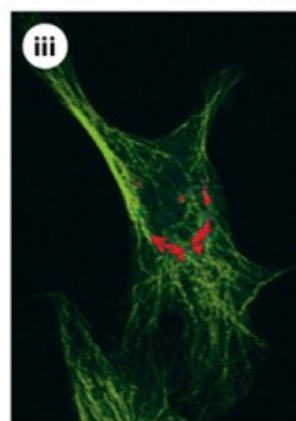
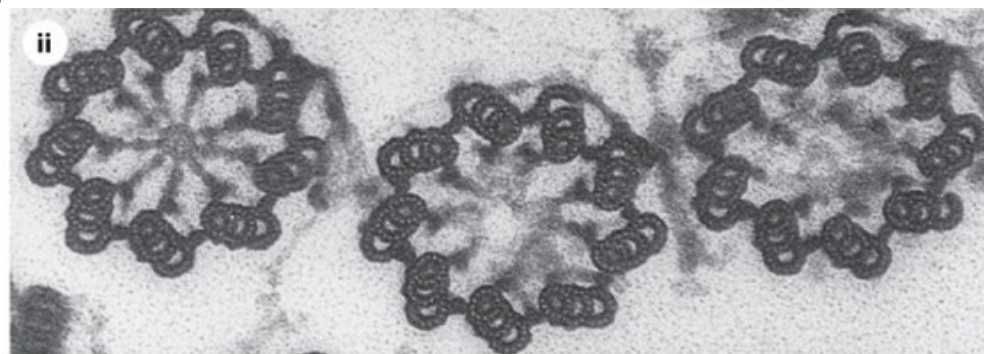


## Mikrotubuly

- i) jednoduché vlákno mikrotubulu
- ii) průřez na bázi 3 cilií zobrazující triplety mikrotubulů
- iii) mikrotubuly (zeleně) a organely (červeně) v interfázi
- iv) prvek s ciliemi

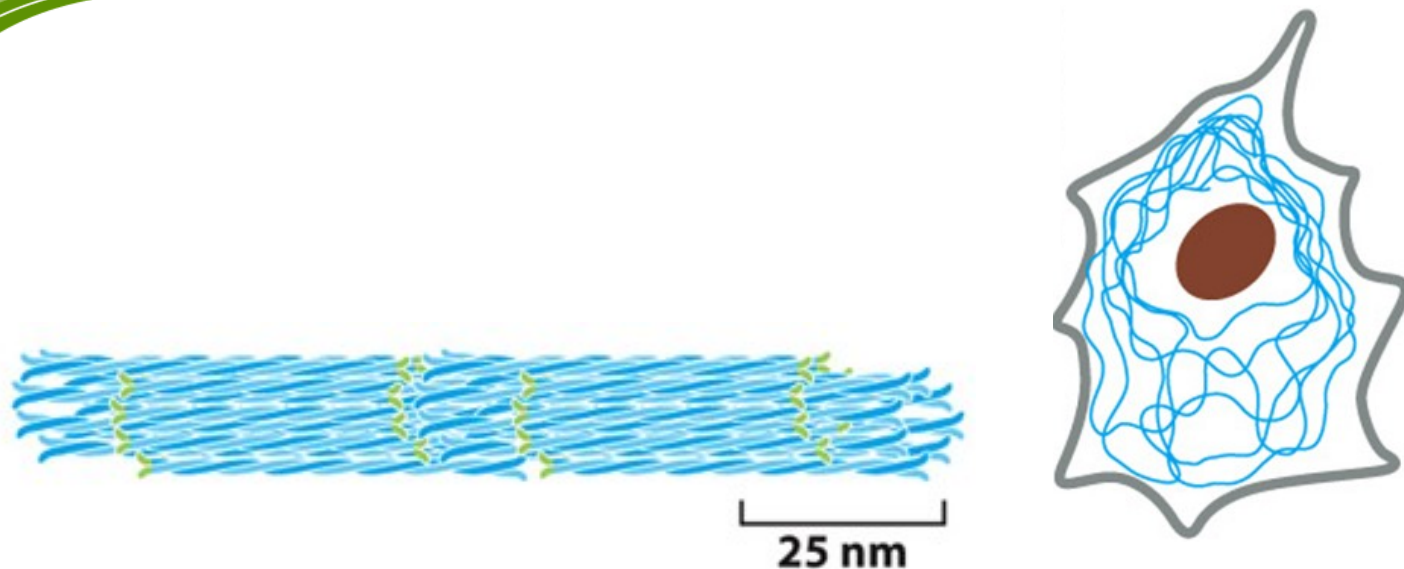


100 nm



Micrographs courtesy of R. Wade (i); D.T. Woodrow and R.W. Linck (ii); D. Shima (iii); D. Burnette (iv).

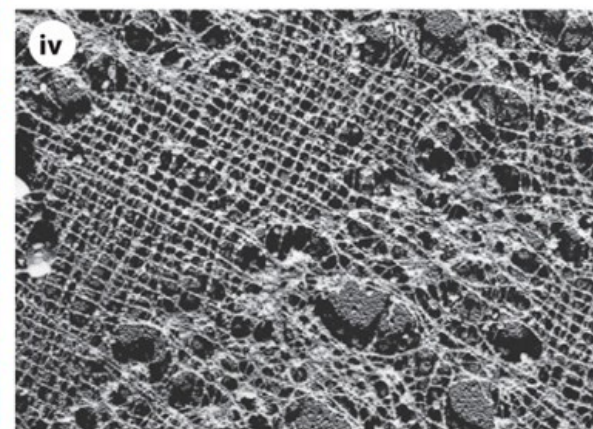
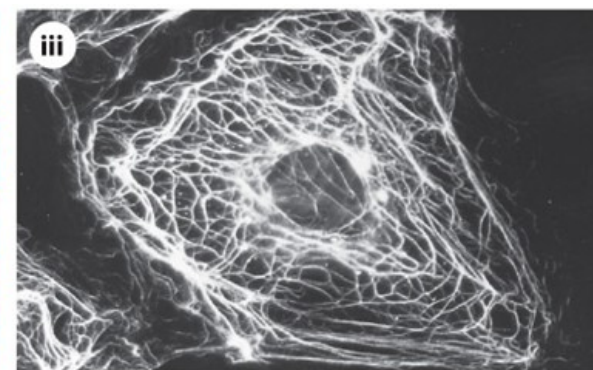
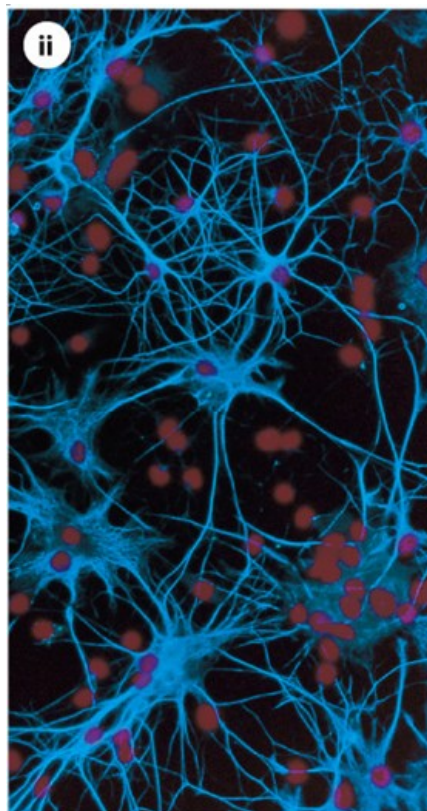
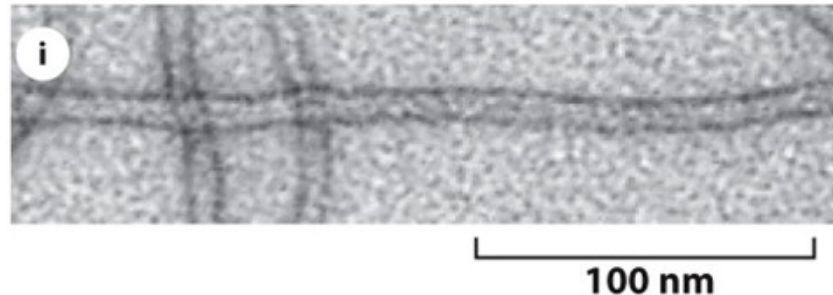
## Intermediární filamenta



- vlákna strukturou připomínající lano s průměrem 10 nm
- tvořena heterogenní rodinou proteinů
- jeden typ intermediárních filament (IF) tvoří jadernou laminu pod jadernou membránou
- další typy IF jsou rozprostřeny napříč cytoplasmou a zajišťují mechanickou odolnost buňky
- v epiteliálních tkáních IF zajišťují spojení buněk mezi sebou

## Intermediární filamenta

- i) jednotlivá intermediární filamenta
- ii) IF (modře) v neuronech
- iii) epiteliální buňka
- iv) jaderná lamina



Micrographs courtesy of R. Quinlan (i); N. L. Kedersha (ii); M. Osborn (iii); U. Aebi (iv).

## Aktinová filamenta = mikrofilamenta

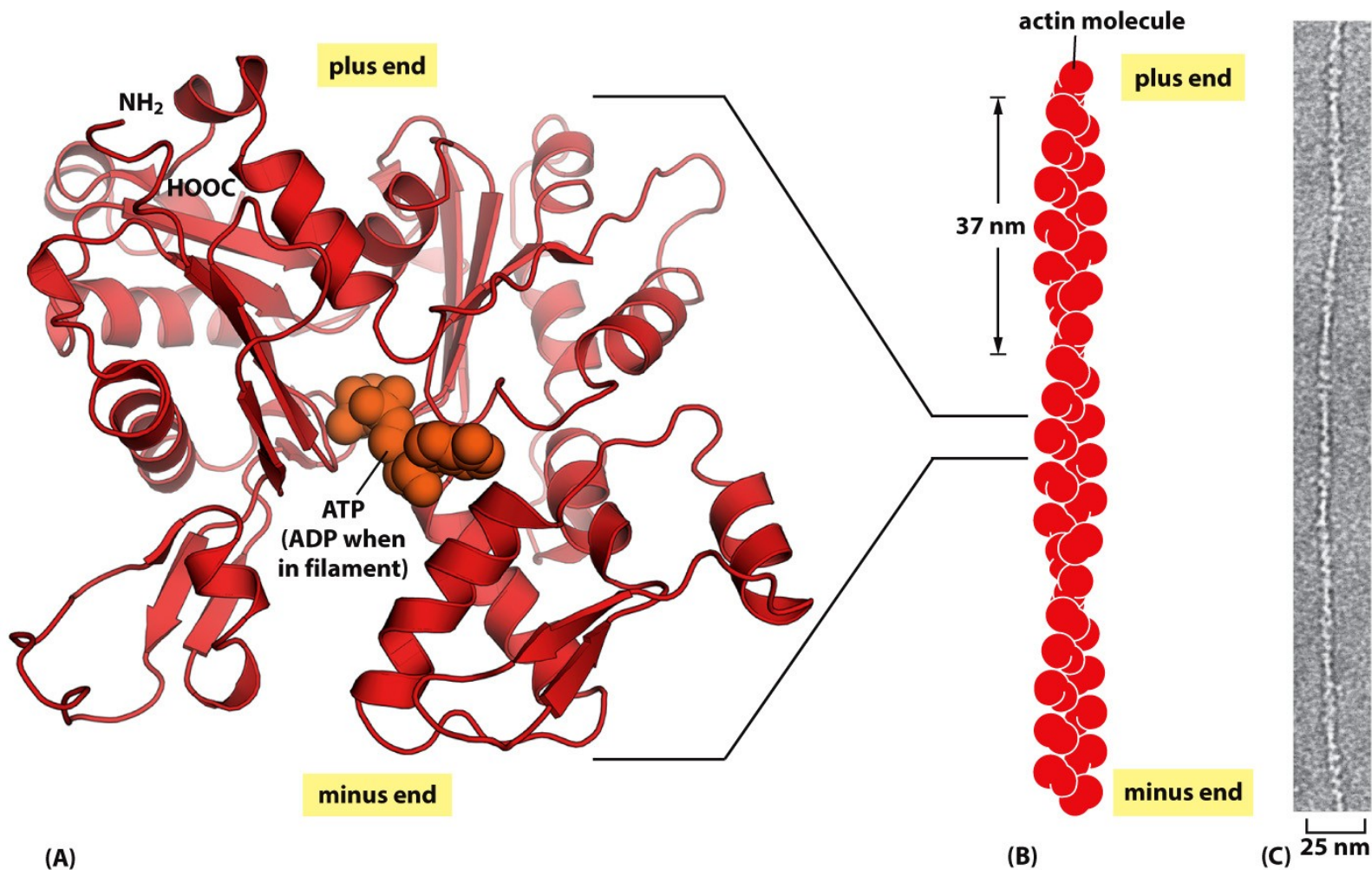


Figure 16-11 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Aktinová filamenta = mikrofilamenta

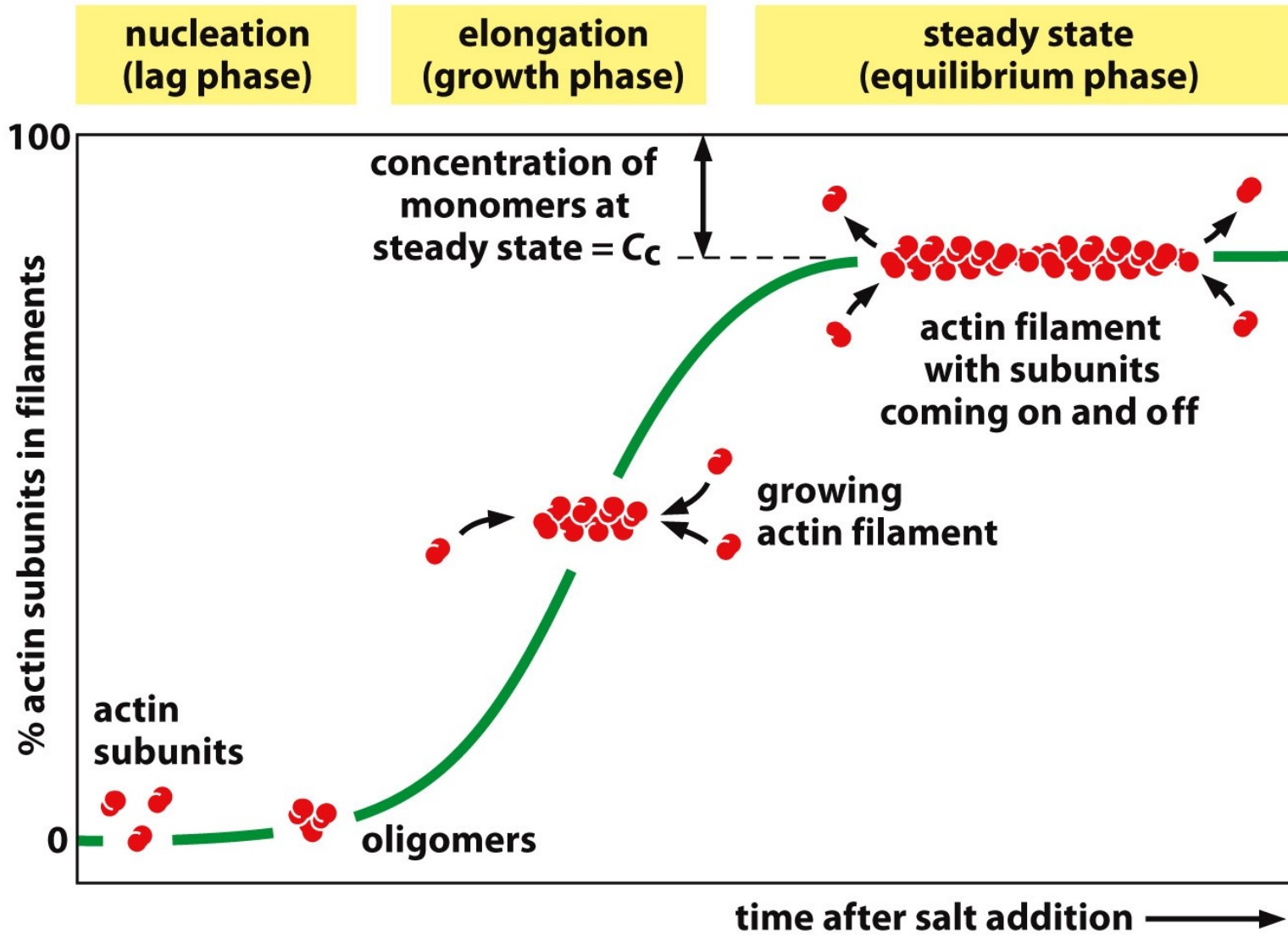
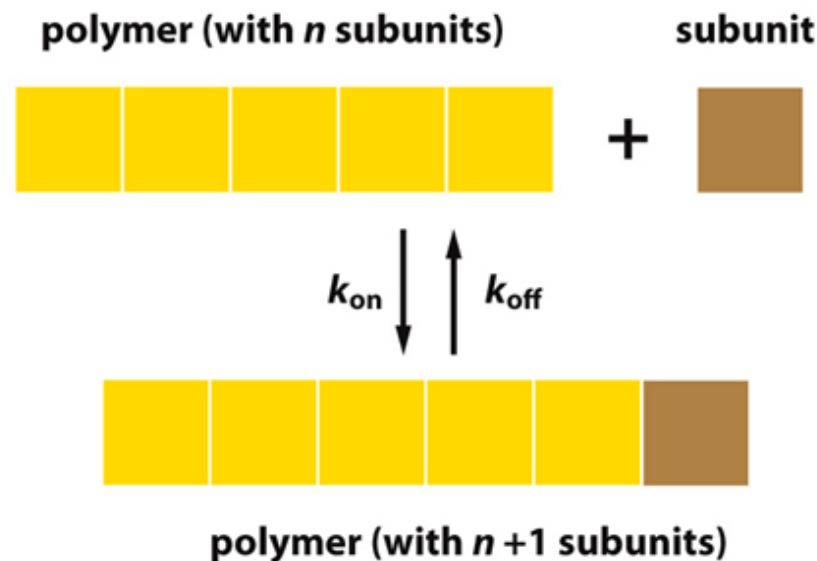


Figure 16-13a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

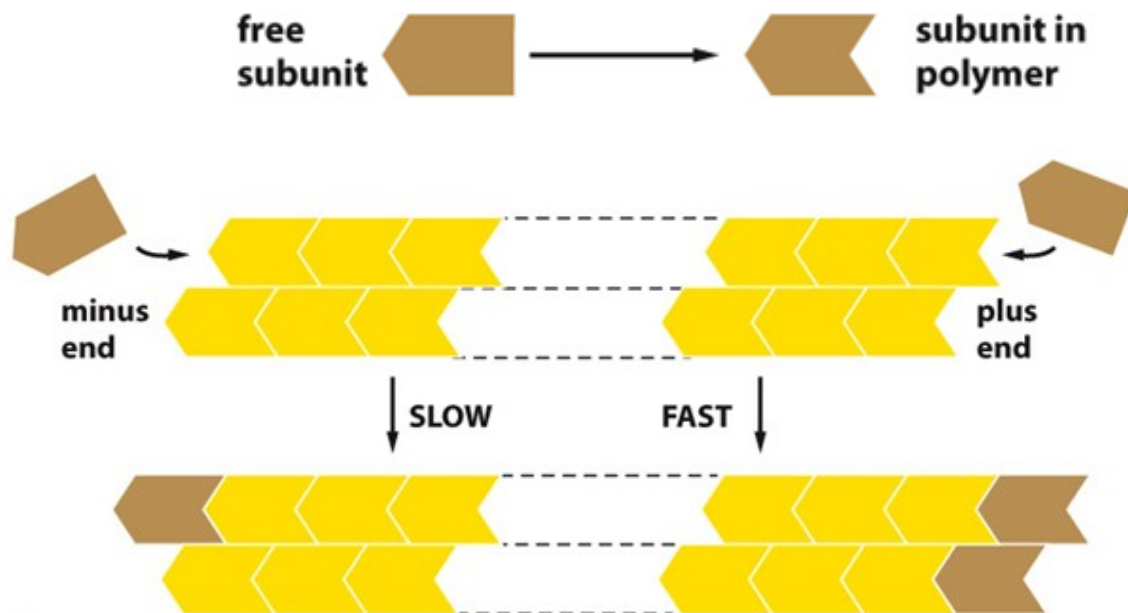
## Polymerizace a depolymerizace

- ▶ lineární polymery proteinových molekul, kterými jsou mikrofilamenta nebo mikrotubuly tvořeny, vznikají připojováním podjednotek (monomerů) ke koncům polymeru
- ▶ míra připojování/polymerizace těchto podjednotek je dána konstantou  $k_{on}$  (jednotka  $M^{-1}s^{-1}$ ), míra depolymerizace je dána konstantou  $k_{off}$  (jednotka  $s^{-1}$ )



## Polymerizace a depolymerizace

- dva konce mikrofilament anebo mikrotubulů polymerizují různou rychlostí
- rychle rostoucí konec se nazývá „**plus konec**“, pomaleji rostoucí konec označujeme jako „**minus konec**“
- rozdíl v rychlosti polymerizace je dán rozdílnou potřebou změny konformace podjednotky v momentu připojení k polymeru



# Polymerize a depolymerize

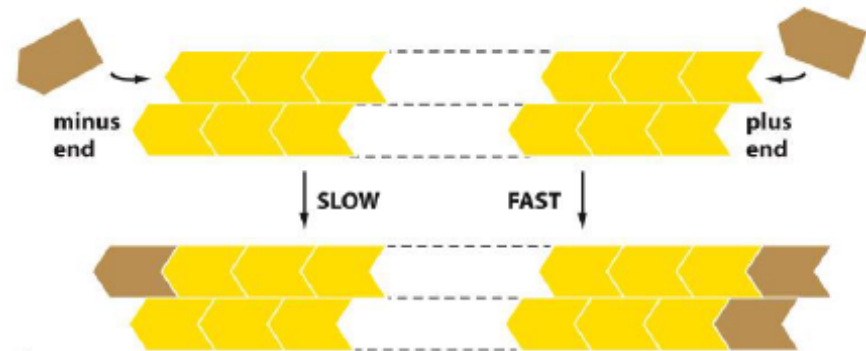
## PLUS AND MINUS ENDS

The two ends of an actin filament or microtubule polymerize at different rates. The fast-growing end is called the **plus end**, whereas the slow-growing end is called the **minus end**. The difference in the rates of growth at the two ends is made possible by changes in the conformation of each subunit as it enters the polymer.



This conformational change affects the rates at which subunits add to the two ends.

Even though  $k_{on}$  and  $k_{off}$  will have different values for the plus and minus ends of the polymer, their ratio  $k_{off}/k_{on}$ —and hence  $C_c$ —must be the same at both ends for a simple polymerization reaction (no ATP or GTP hydrolysis). This is because exactly the same subunit interactions are broken when a subunit is lost at either end, and the final state of the subunit after dissociation is identical. Therefore, the  $\Delta G$  for subunit loss,

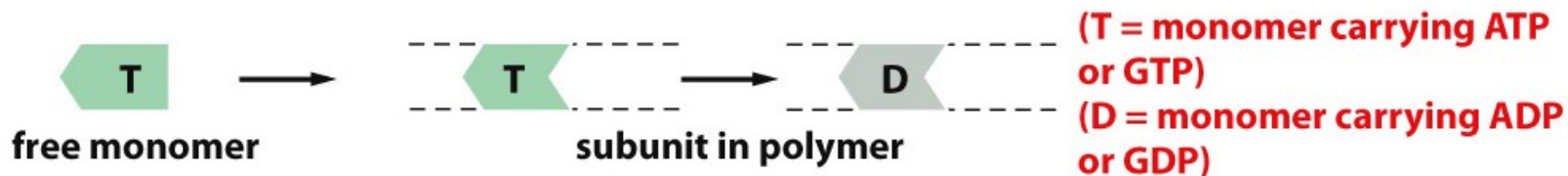


which determines the equilibrium constant for its association with the end, is identical at both ends: if the plus end grows four times faster than the minus end, it must also shrink four times faster. Thus, for  $C > C_c$ , both ends grow; for  $C < C_c$ , both ends shrink.

The nucleoside triphosphate hydrolysis that accompanies actin and tubulin polymerization removes this constraint.



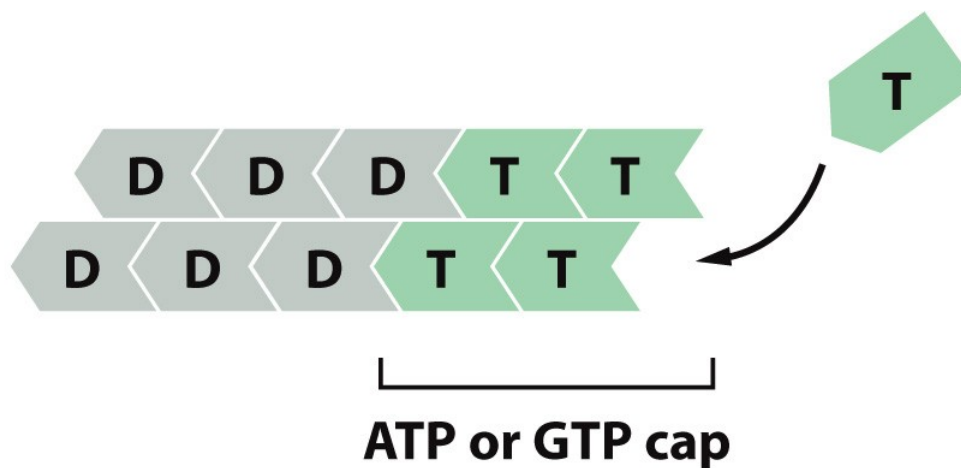
## Hydrolýza nukleotidů



- každá molekula aktinu nese pevně navázanou molekulu ATP, která je hydrolyzována na molekulu ADP brzy po jejím připojení k polymeru
- stejně tak molekula tubulinu nese pevně navázanou molekulu GTP, která je po připojení k polymeru hydrolyzována na GDP
- hydrolýza navázaného nukleotidu snižuje vazebnou afinitu této podjednotky k polymeru a zvyšuje pravděpodobnost její disociace z polymeru
- proto je obvykle T forma připojena k polymeru a D forma z polymeru disociuje

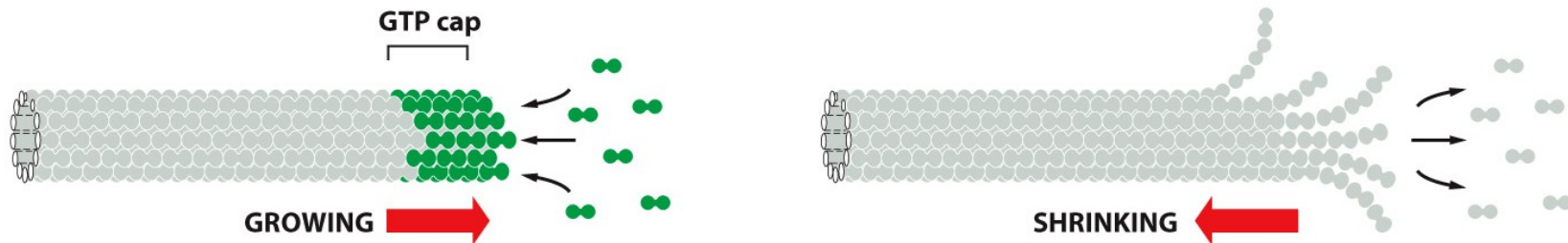
## ATP a GTP čepičky

- rychlost připojování podjednotek k rostoucímu polymeru mikrofilamenta či mikrotubulu může být větší než rychlost, se kterou je nukleotid nové podjednotky hydrolyzován
- v tomto případě na konci polymeru rozeznáváme tzv. ATP či GTP čepičku, která obsahuje nukleosid trifosfáty (ATP na mikrofilamentu či GTP na mikrotubulu)



## Dynamická nestabilita

- mikrotubuly depolymerizují 100x rychleji od konce s GDP než od konce s GTP
- GTP čepička podporuje polymerizaci, pokud je GTP čepička ztracena, dochází k depolymerizaci



Panel 16-2 (part 10) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

- u jednotlivých mikrotubulů se tak střídá stav pomalé polymerizace a rychlé depolymerizace = **dynamická nestabilita**

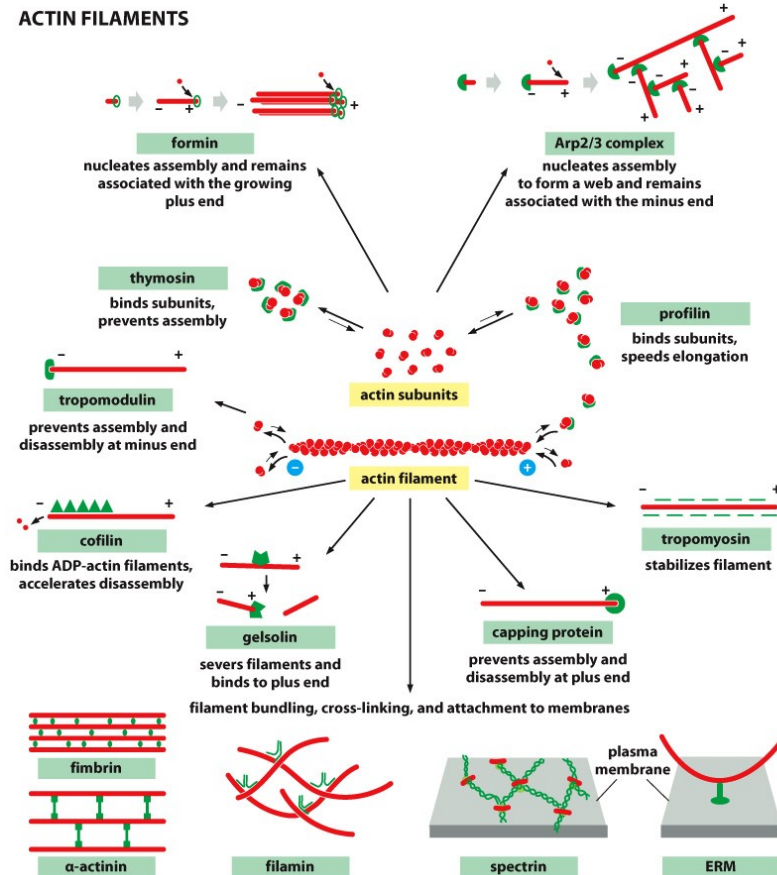
## Cytoskeletální toxiny

- ▶ brání polymerizaci či depolymerizaci

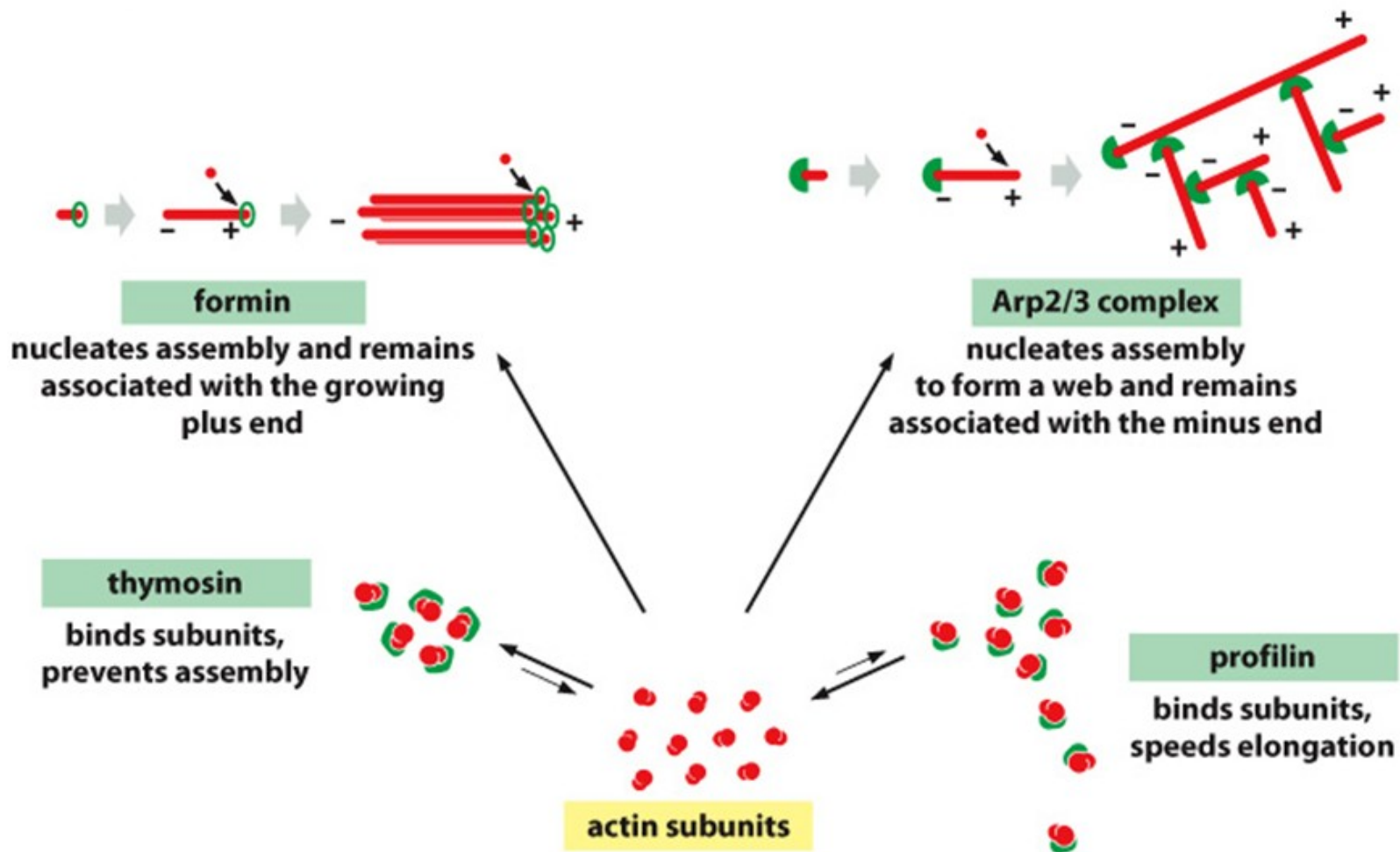
Látka	Účinek na cytoskelet	Mechanismus	Zdroj
<b>ACTIN</b>			
<b>Latrunculin</b>	depolymerizuje	váže aktinové podjednotky	mořské houby
<b>Cytochalasin B</b>	depolymerizuje	kryje plus konec filament	<i>Nižší houby</i>
<b>Phalloidin</b>	stabilizuje	váže se podél filament	muchomůrka
<b>MIKROTUBULY</b>			
<b>Taxol® (Paclitaxel)</b>	stabilizuje	váže se podél filament	keř tis
<b>Nocodazol</b>	depolymerizuje	váže podjednotky tubulinu	syntetický
<b>Colchicin</b>	depolymerizuje	kryje konce filament	šafrán

## Proteiny asociované s aktinem

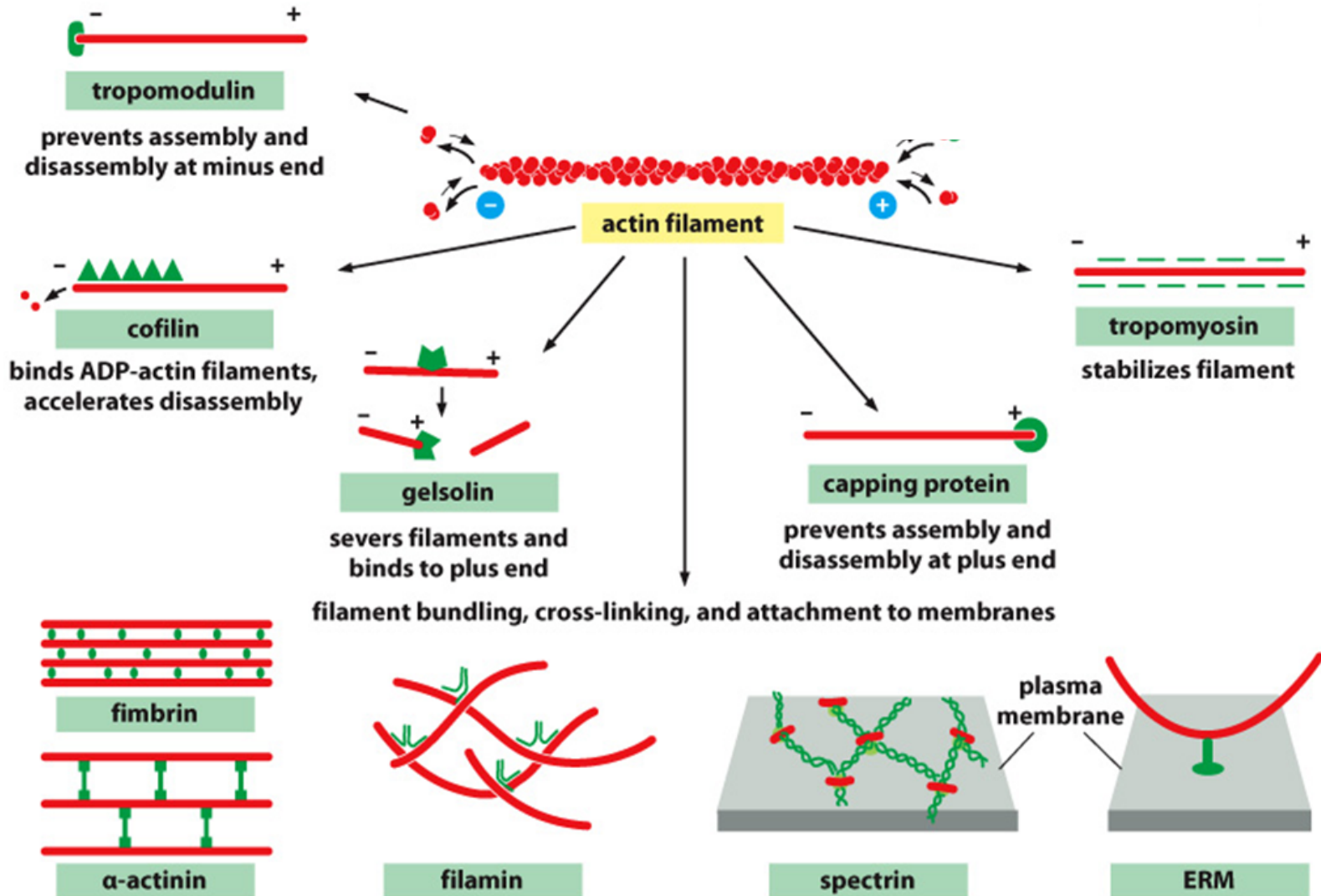
- většina buněk obsahuje více než 100 různých proteinů asociovaných s aktinem a je pravděpodobné, že řada dalších takových proteinů nebyla ještě identifikována



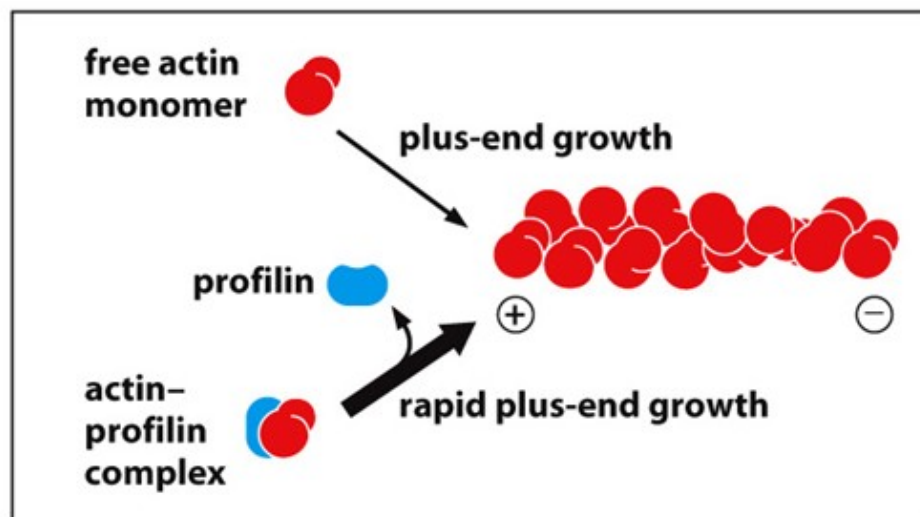
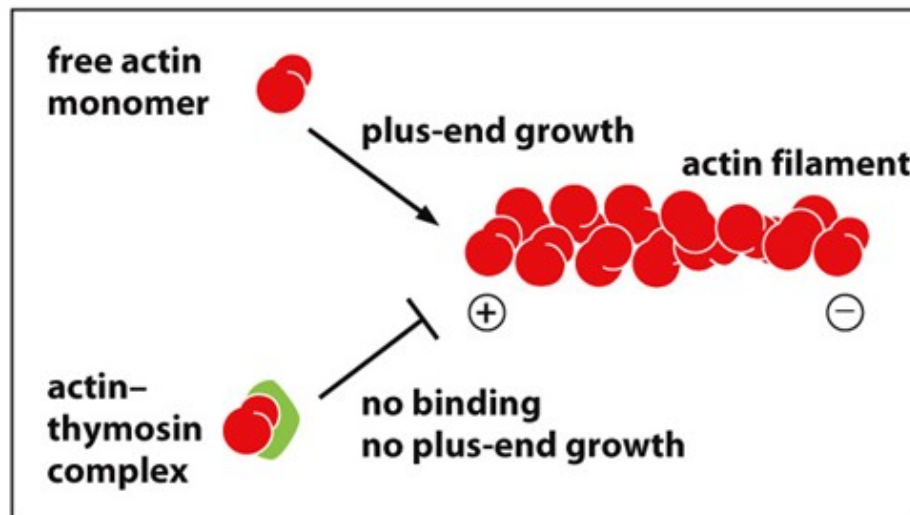
## Proteiny asociované s aktinem



## Proteiny asociované s aktinem

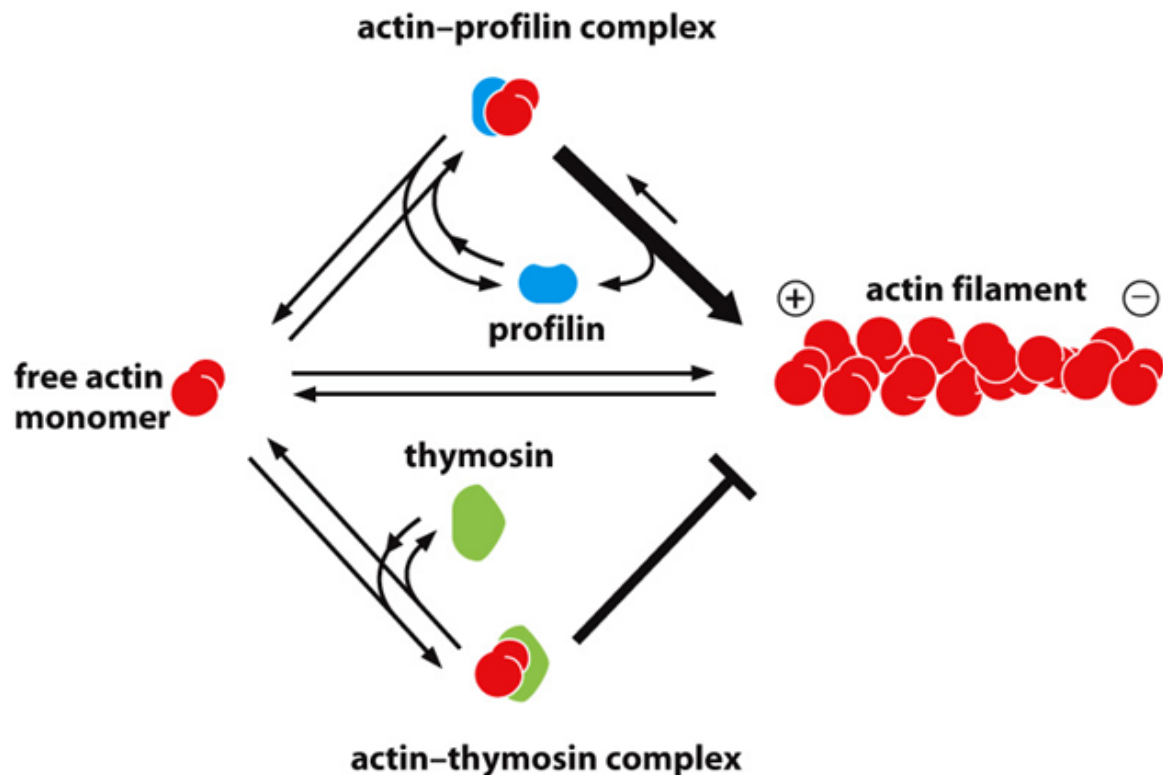


## Proteiny asociované s aktinem



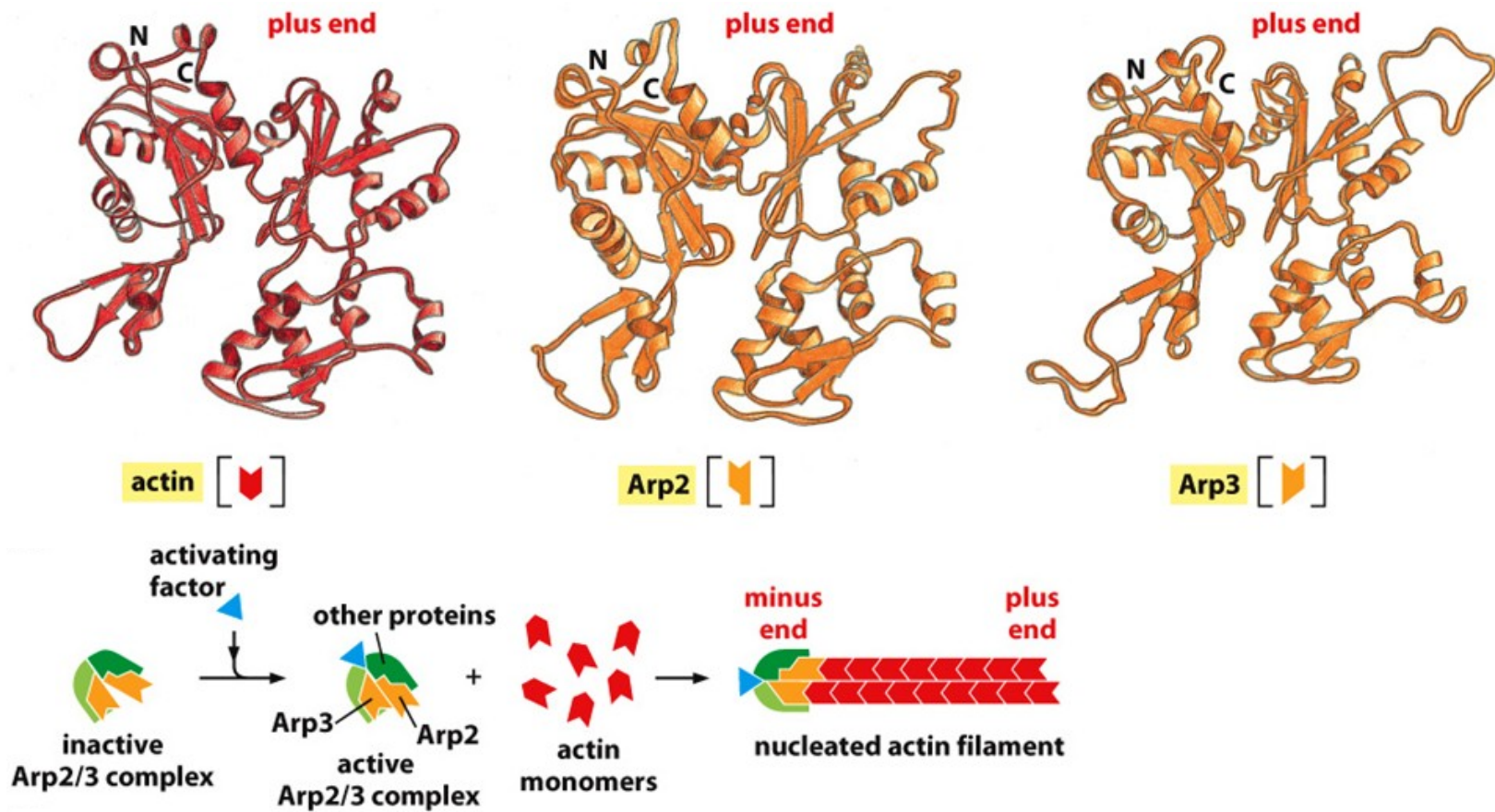


## Proteiny asociované s aktinem

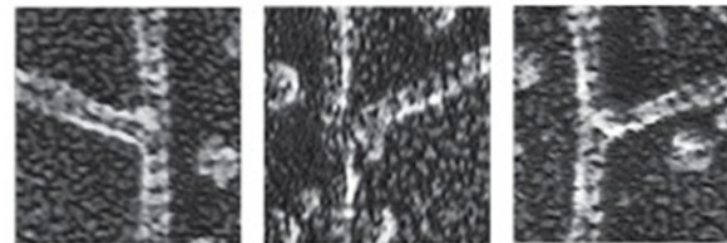
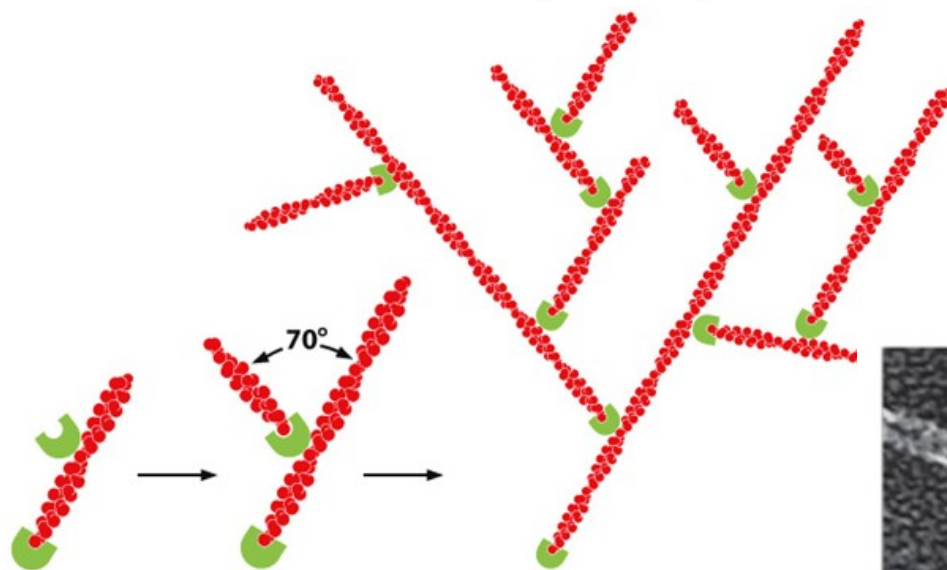
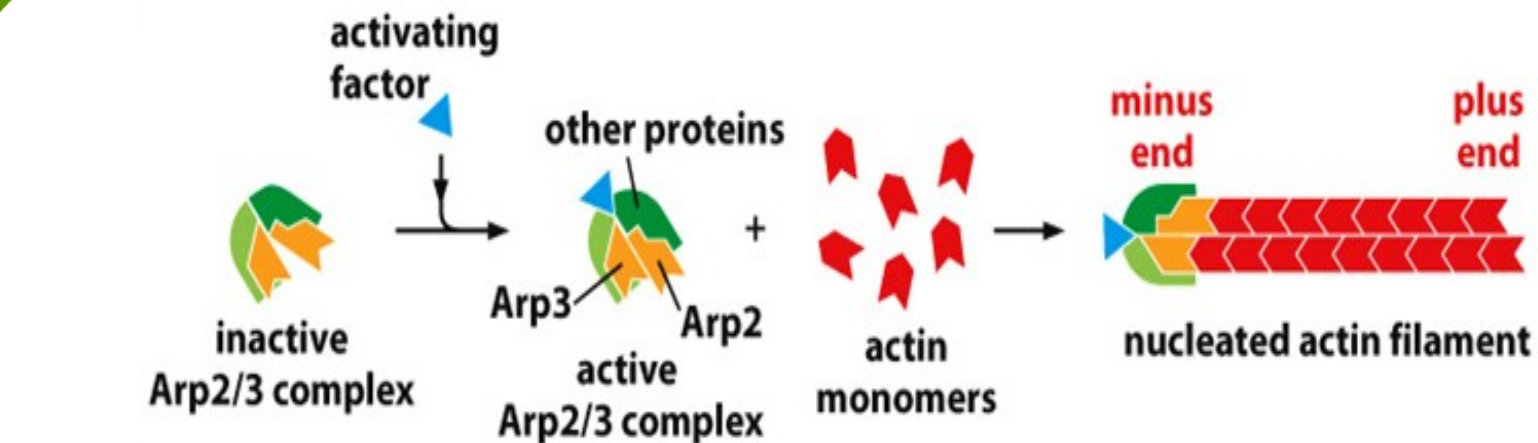


**PROFILIN COMPETES WITH THYMOSIN FOR BINDING TO ACTIN MONOMERS AND PROMOTES ASSEMBLY**

## Proteiny asociované s aktinem

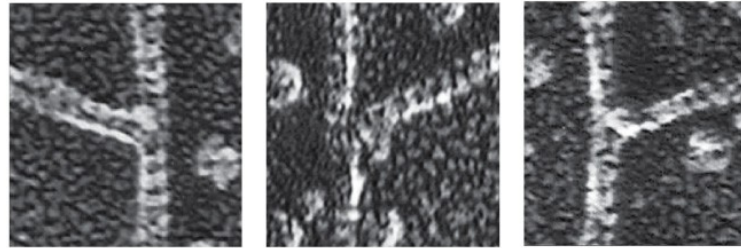


## Proteiny asociované s aktinem

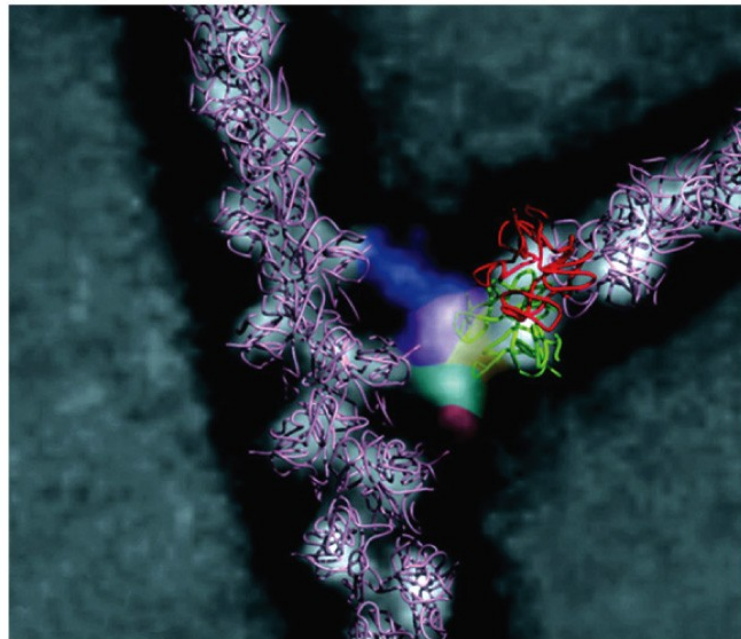


100 nm

## Proteiny asociované s aktinem



100 nm



10 nm

Figure 16-16d Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Proteiny asociované s aktinem

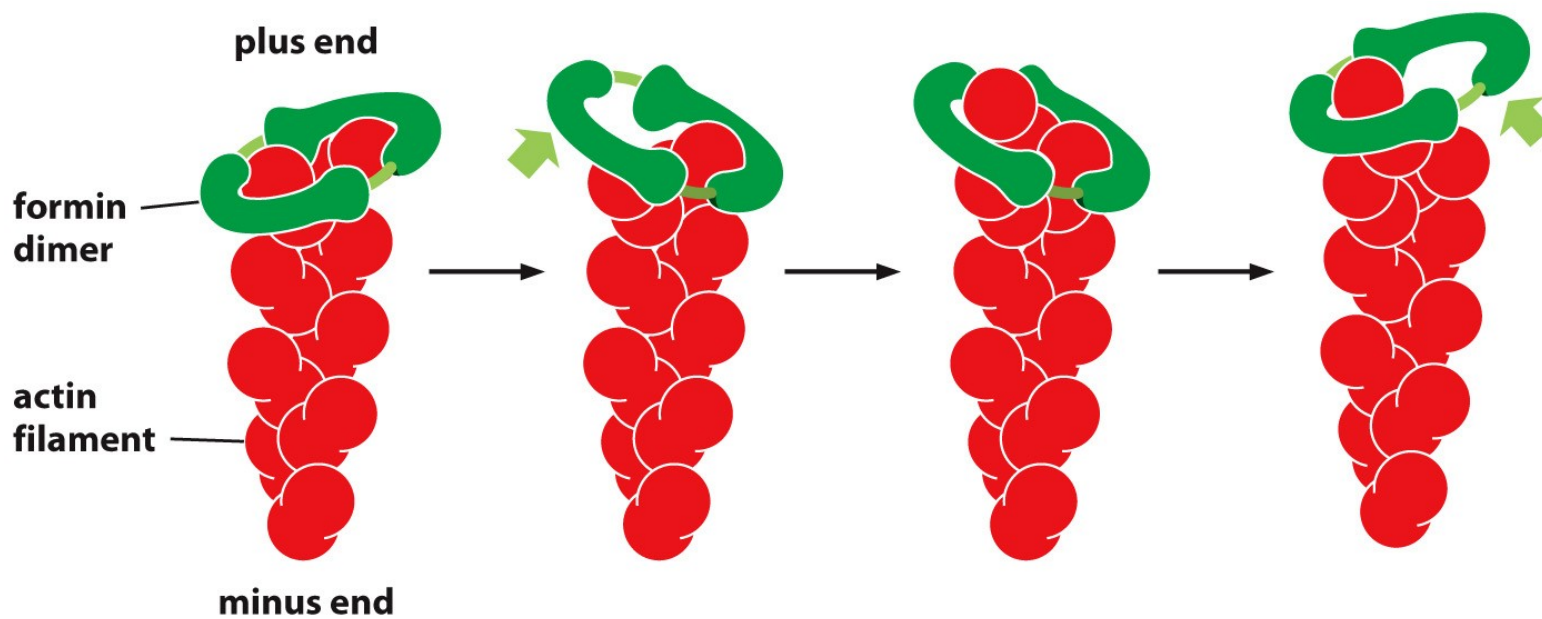
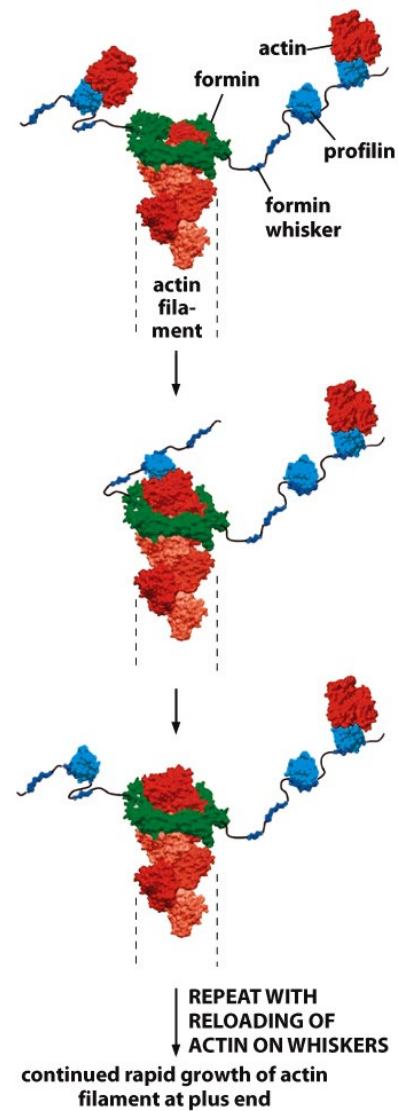
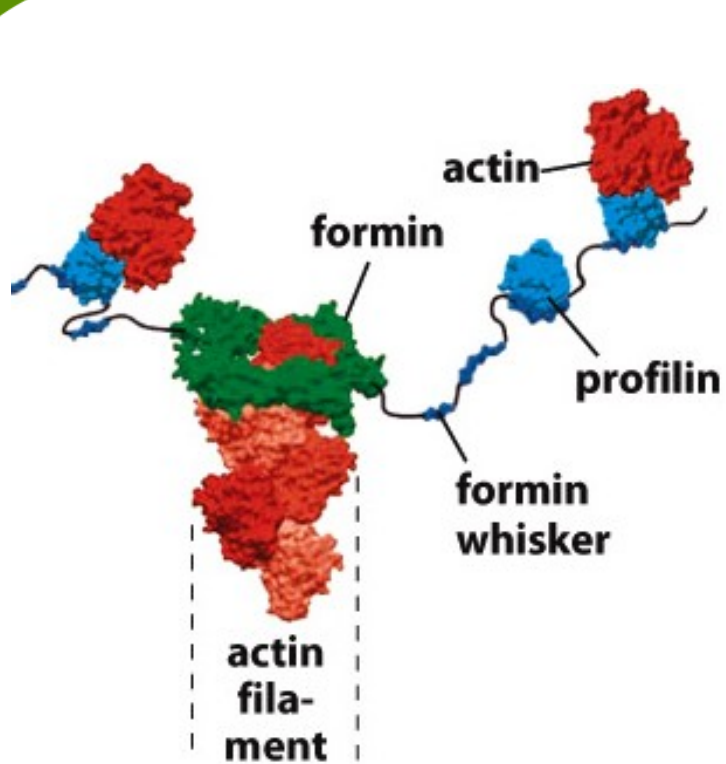


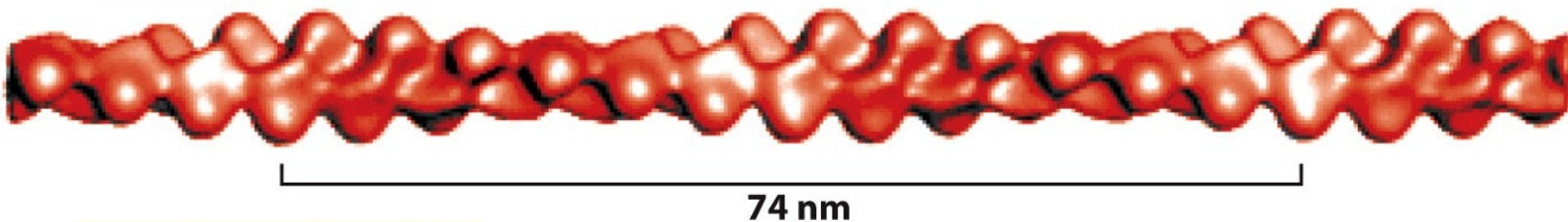
Figure 16-17 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Proteiny asociované s aktinem



## Proteiny asociované s aktinem

(A) actin filament



(B) actin filament + cofilin

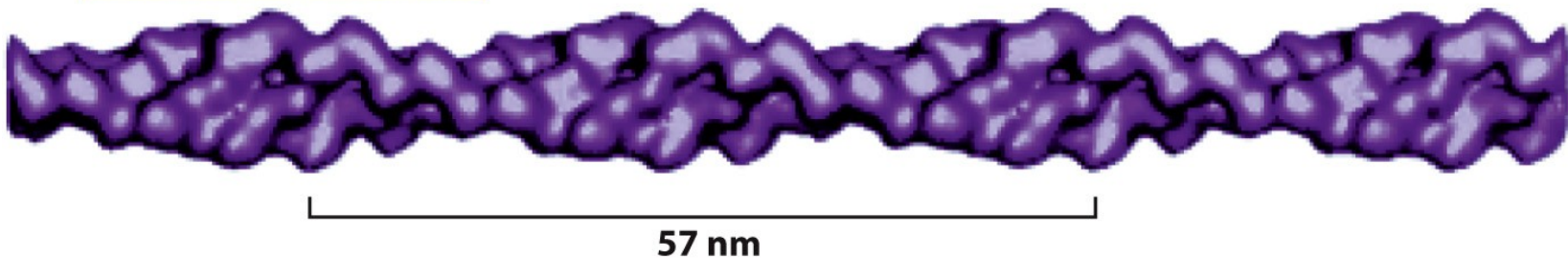


Figure 16-20 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Aktinová filamenta = mikrofilamenta

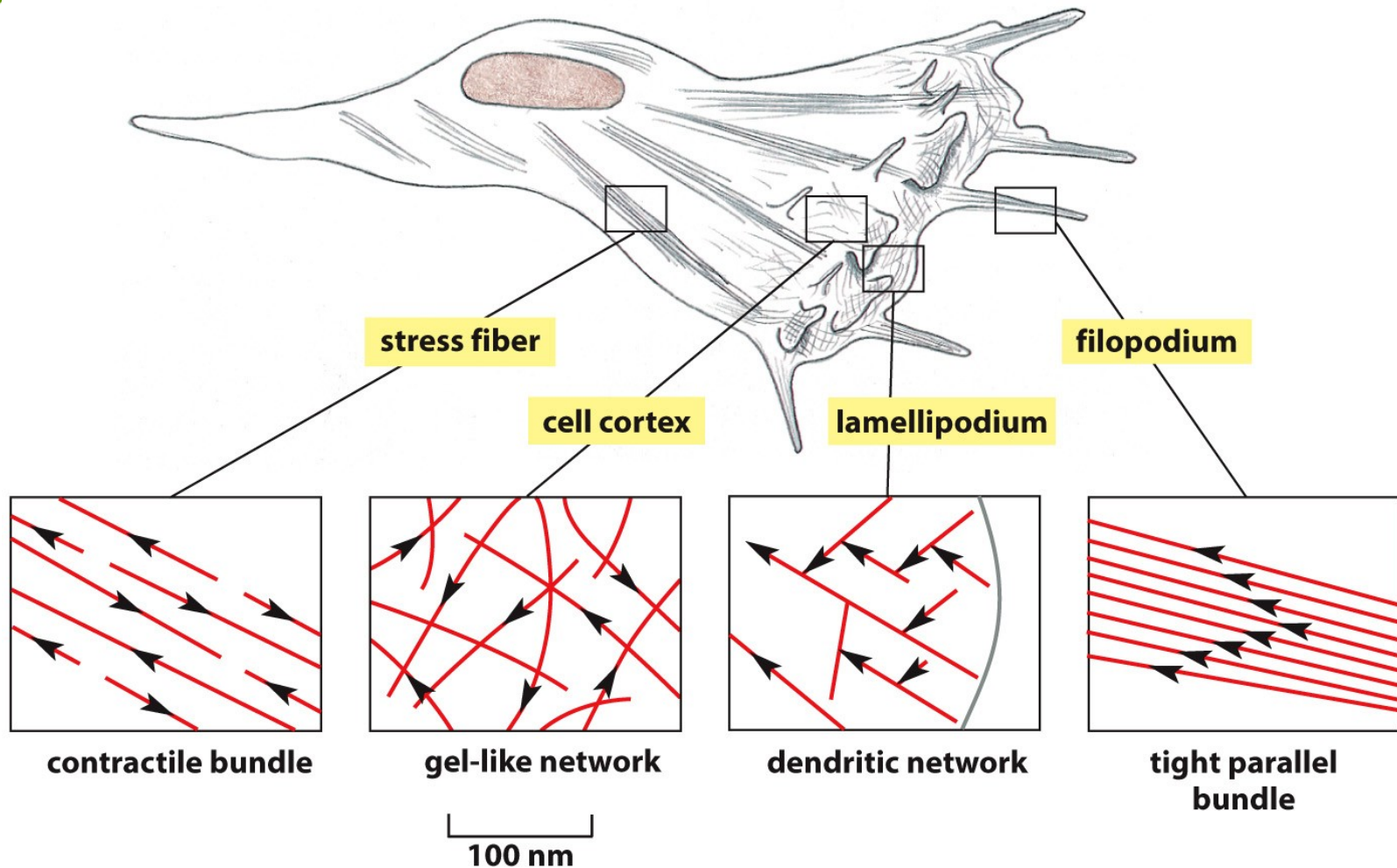


Figure 16-21 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



# Proteiny asociované s aktinem

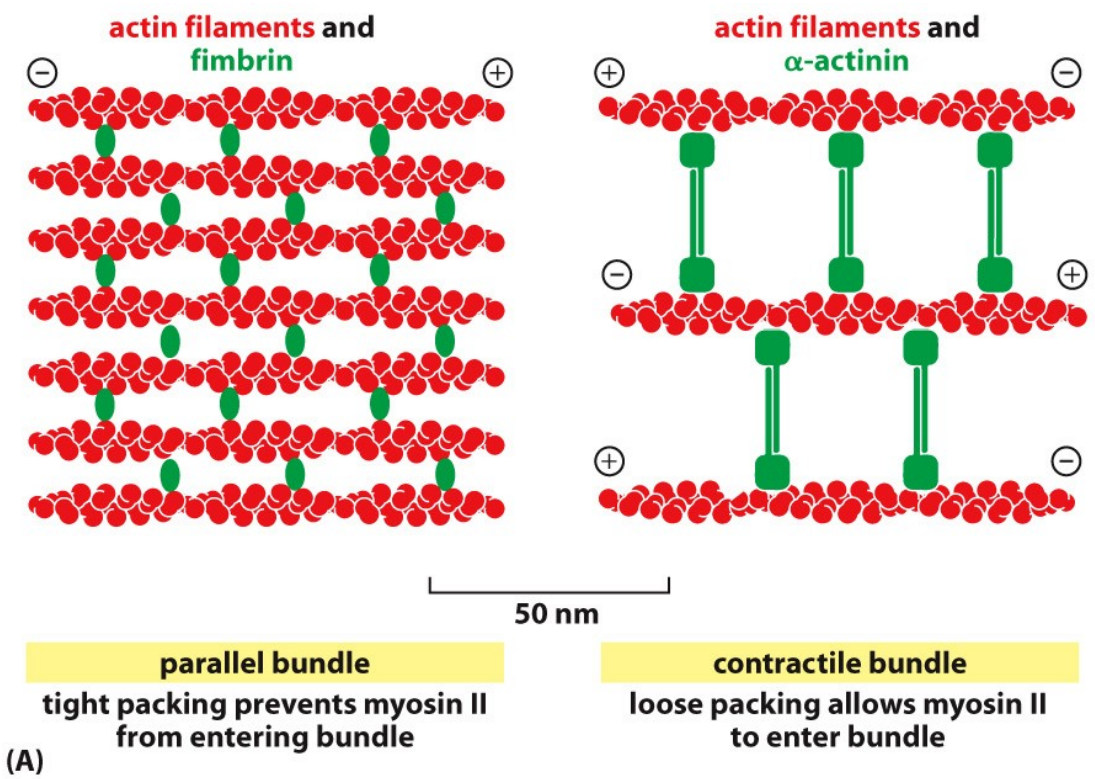
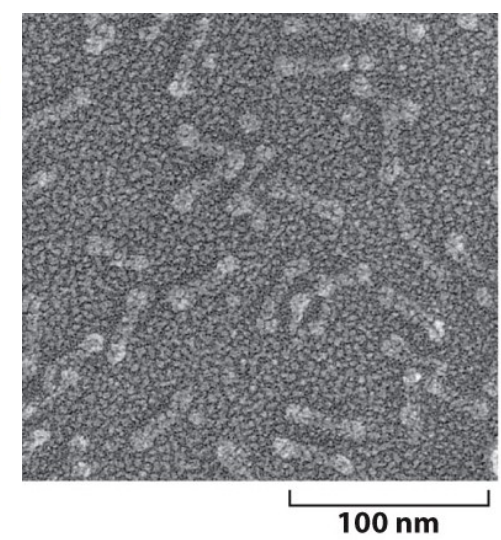


Figure 16-23 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

ve filopodiích

ve svalech



## Proteiny asociované s aktinem

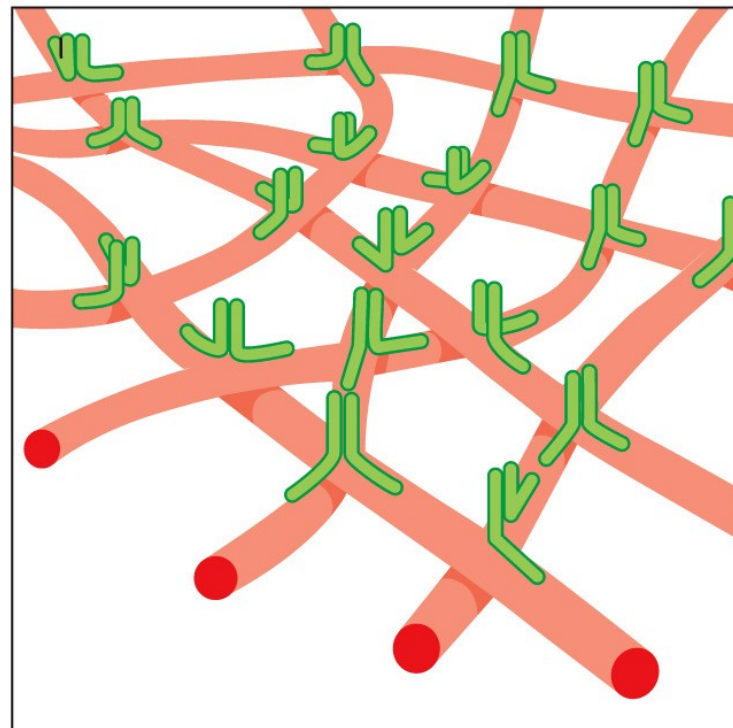
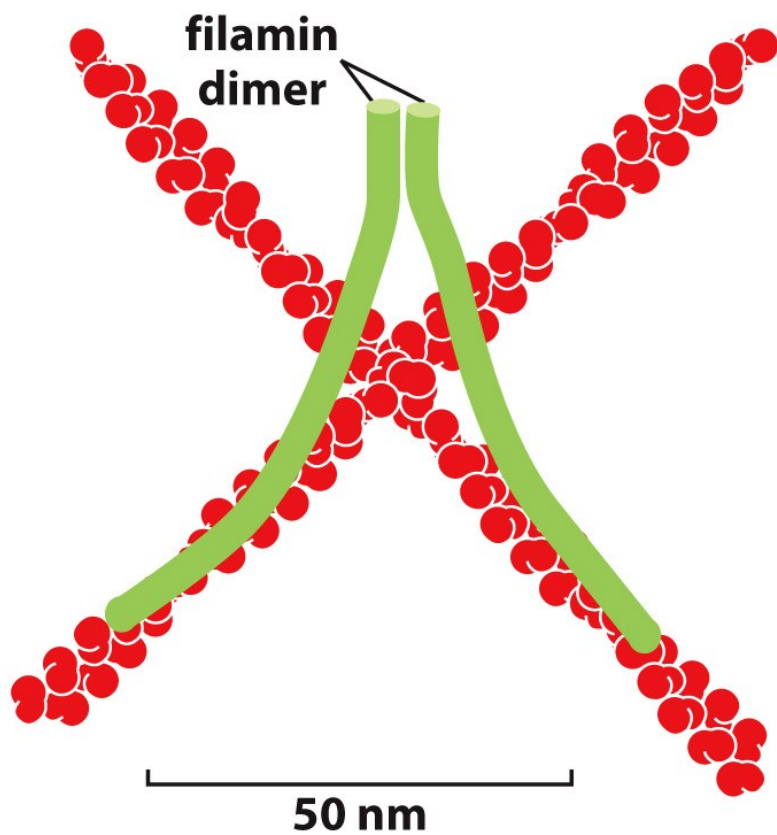
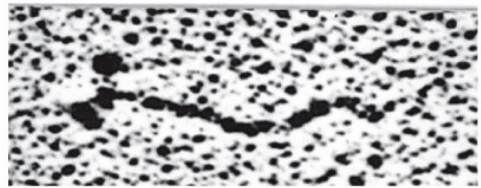
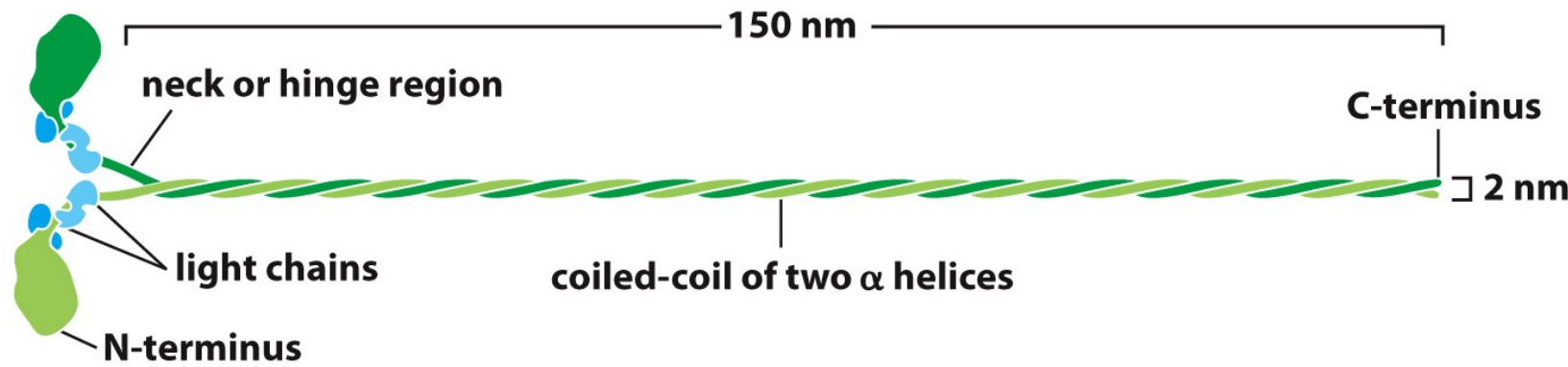


Figure 16-24a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Myosiny – molekulární motory pohánějící auta na aktinové dálnici



(A) 100 nm



(B)

Figure 16-26 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Myosiny – molekulární motory pohánějící auta na aktinové dálnici

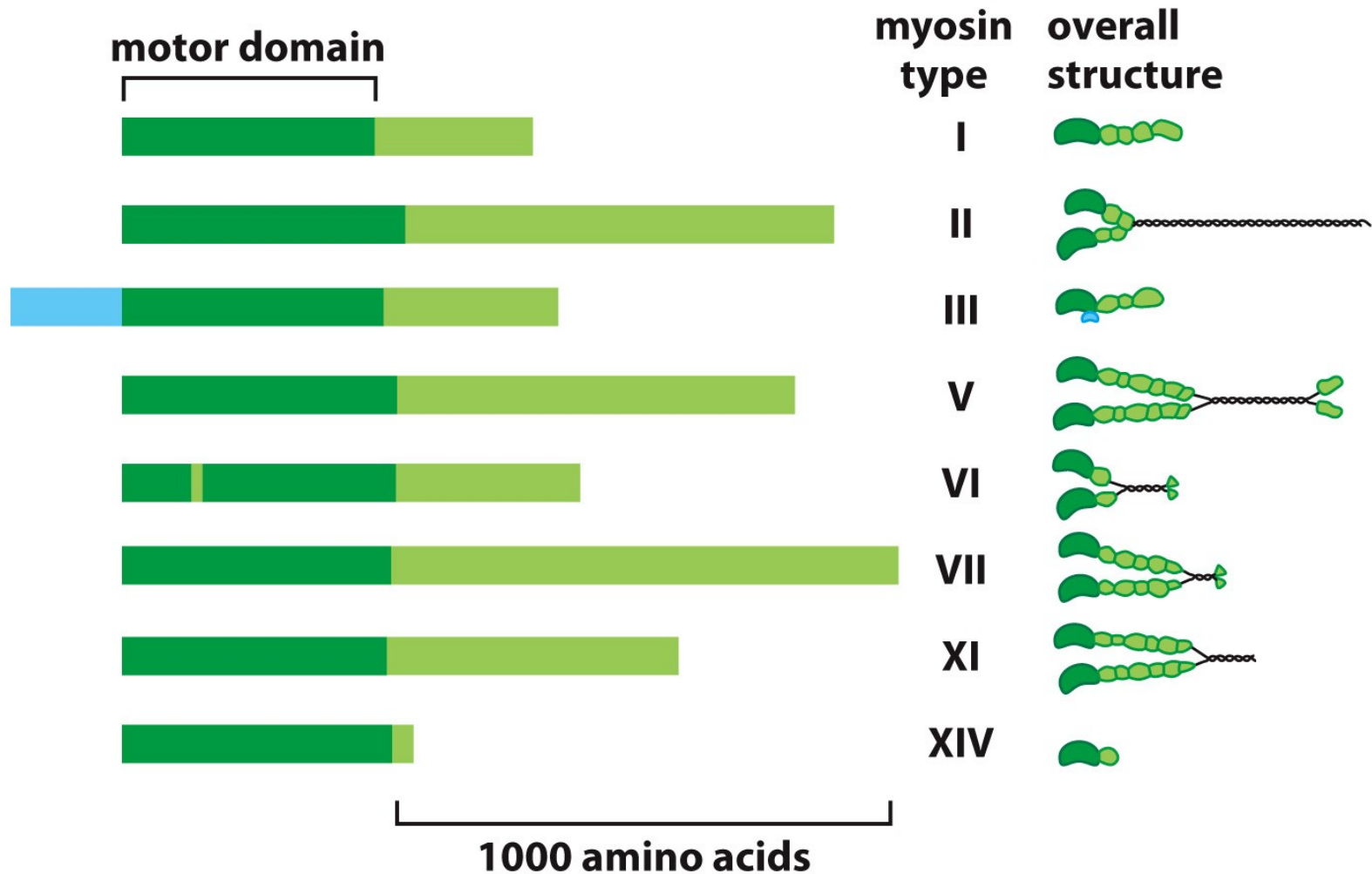


Figure 16-40 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

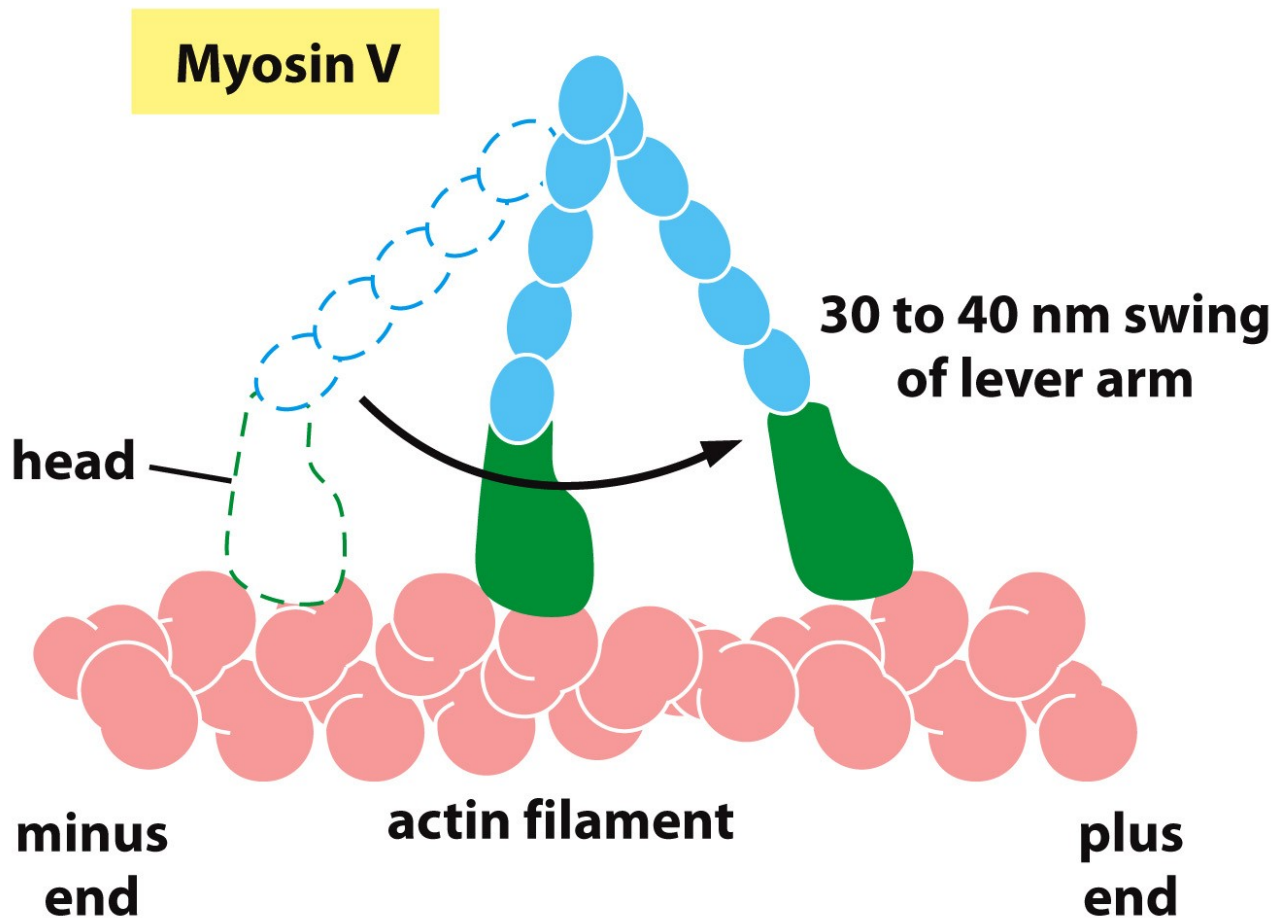
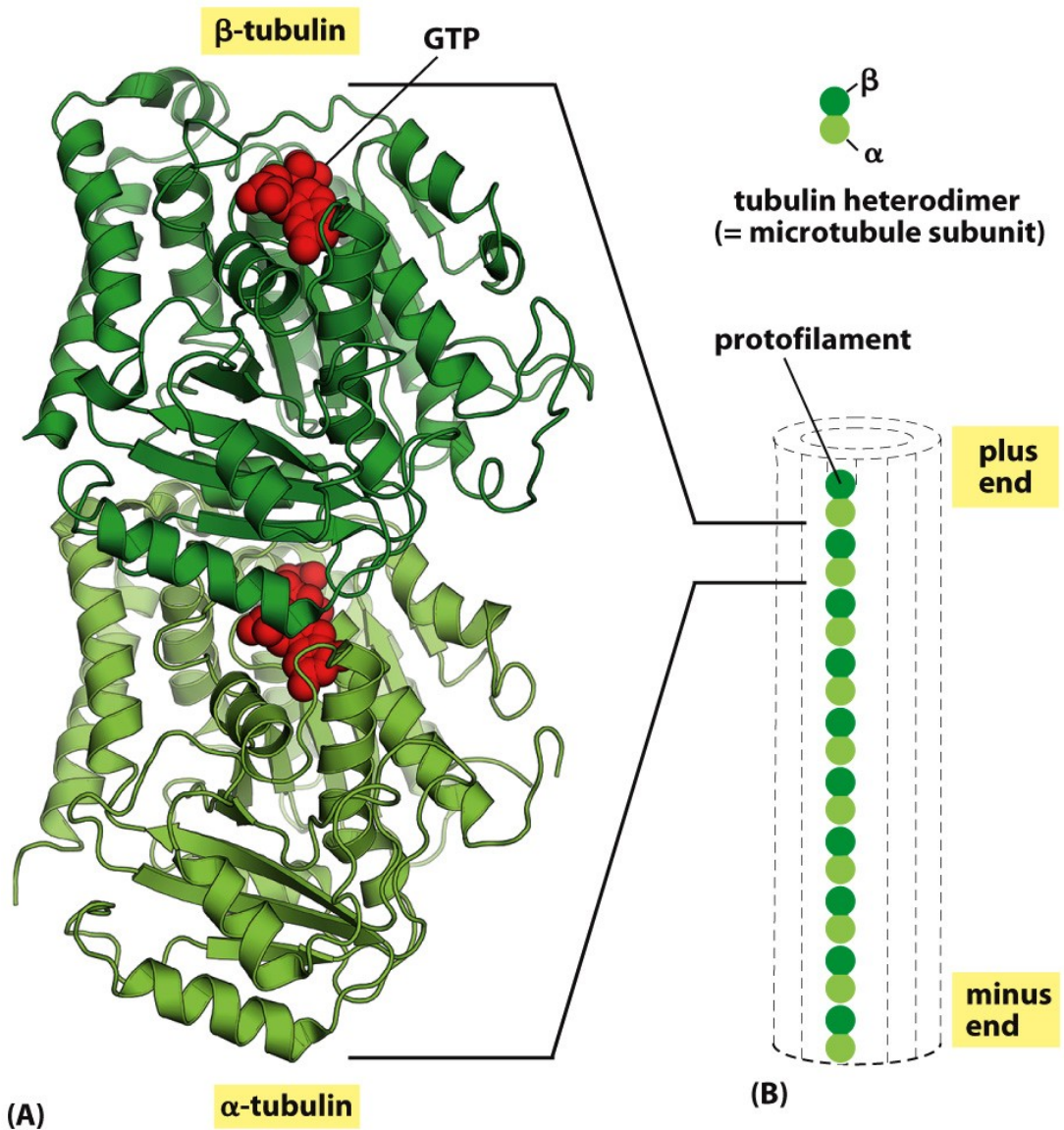


Figure 16-41a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Mikrotubuly



# Mikrotubuly

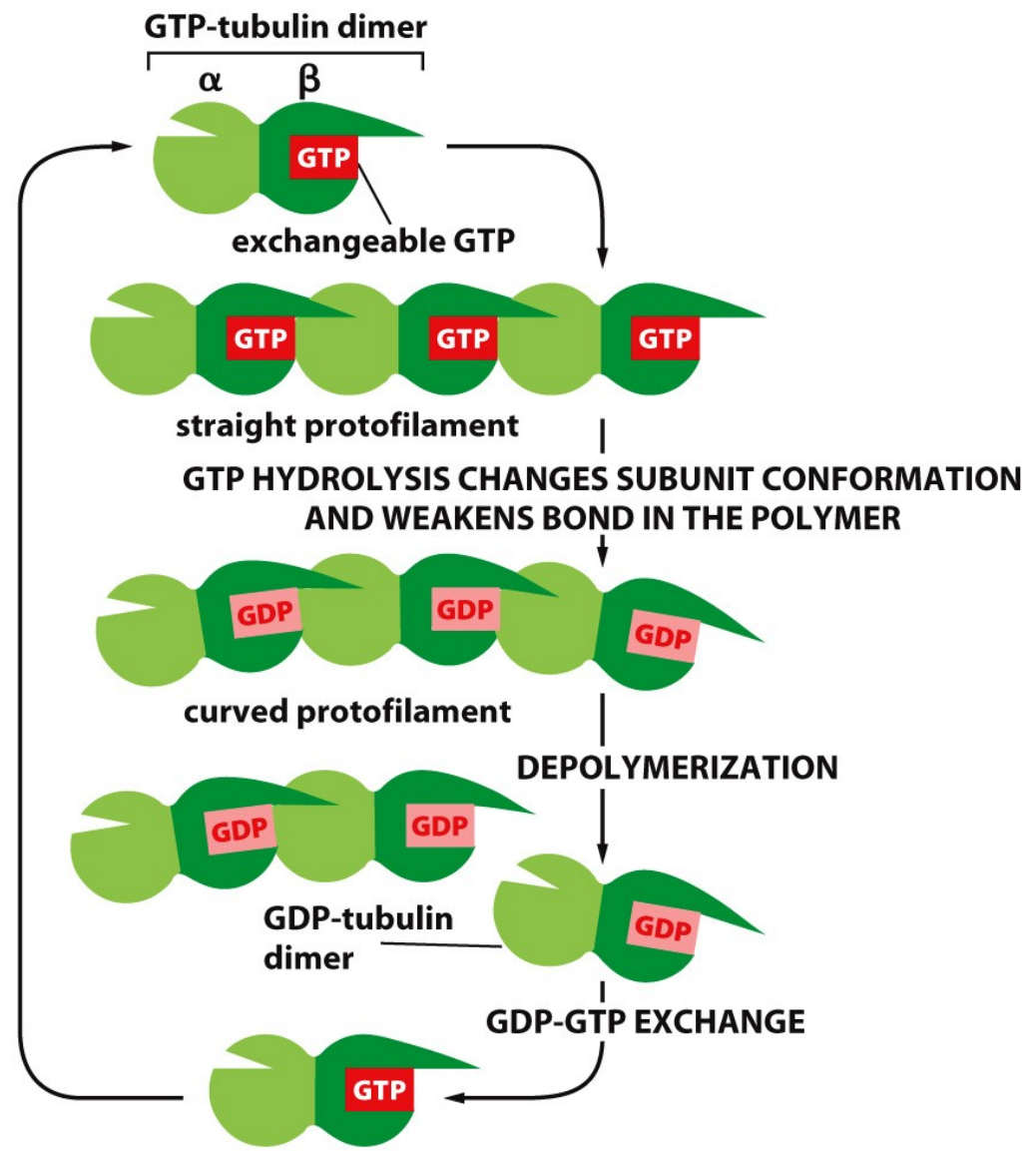


Figure 16-44b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Dynamická nestabilita mikrotubulů

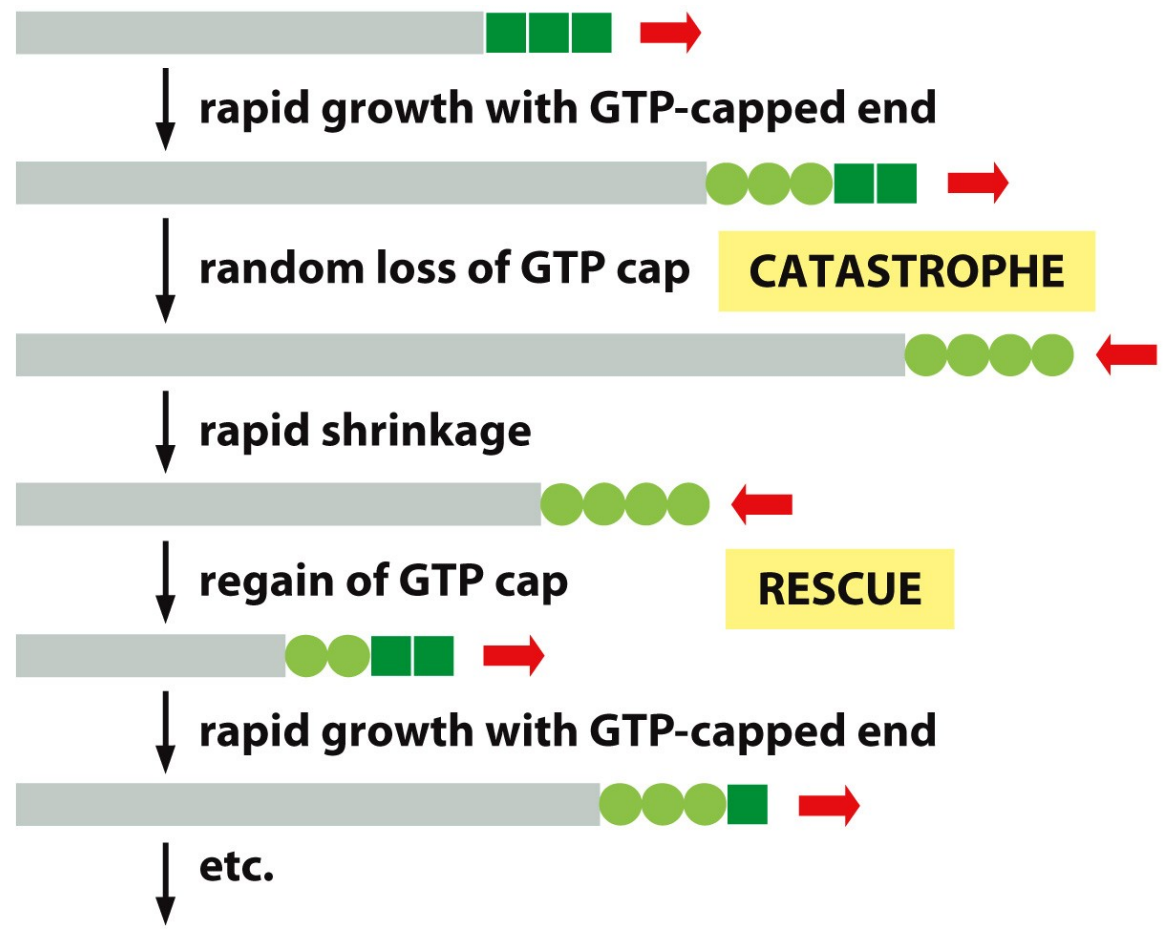


Figure 16-44a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



## Dynamická nestabilita mikrotubulů

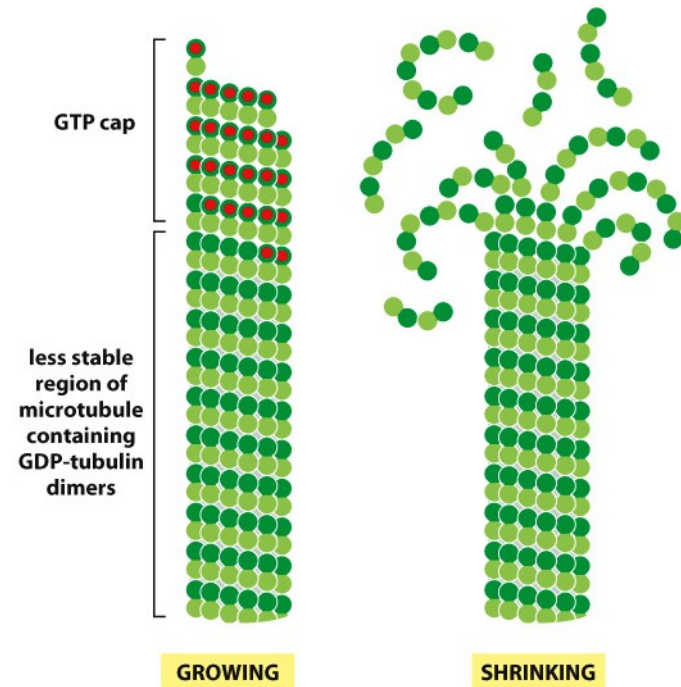
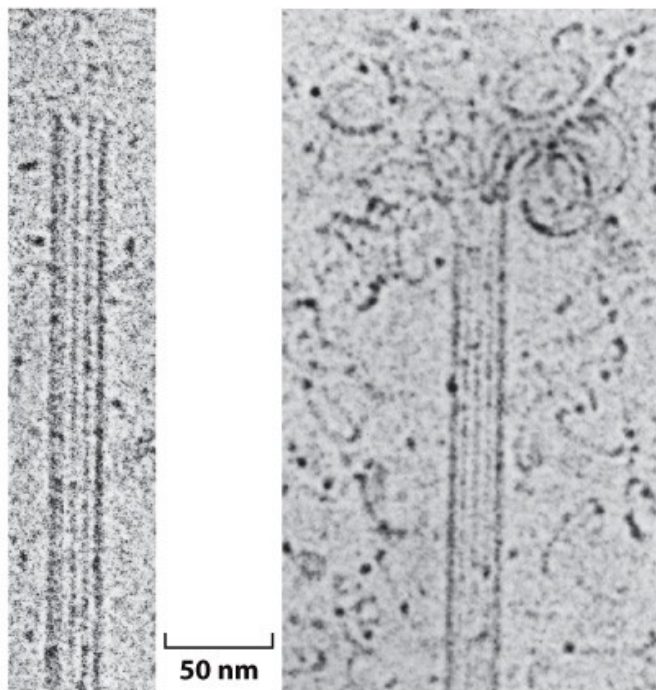


Figure 16-44c Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Centrosom

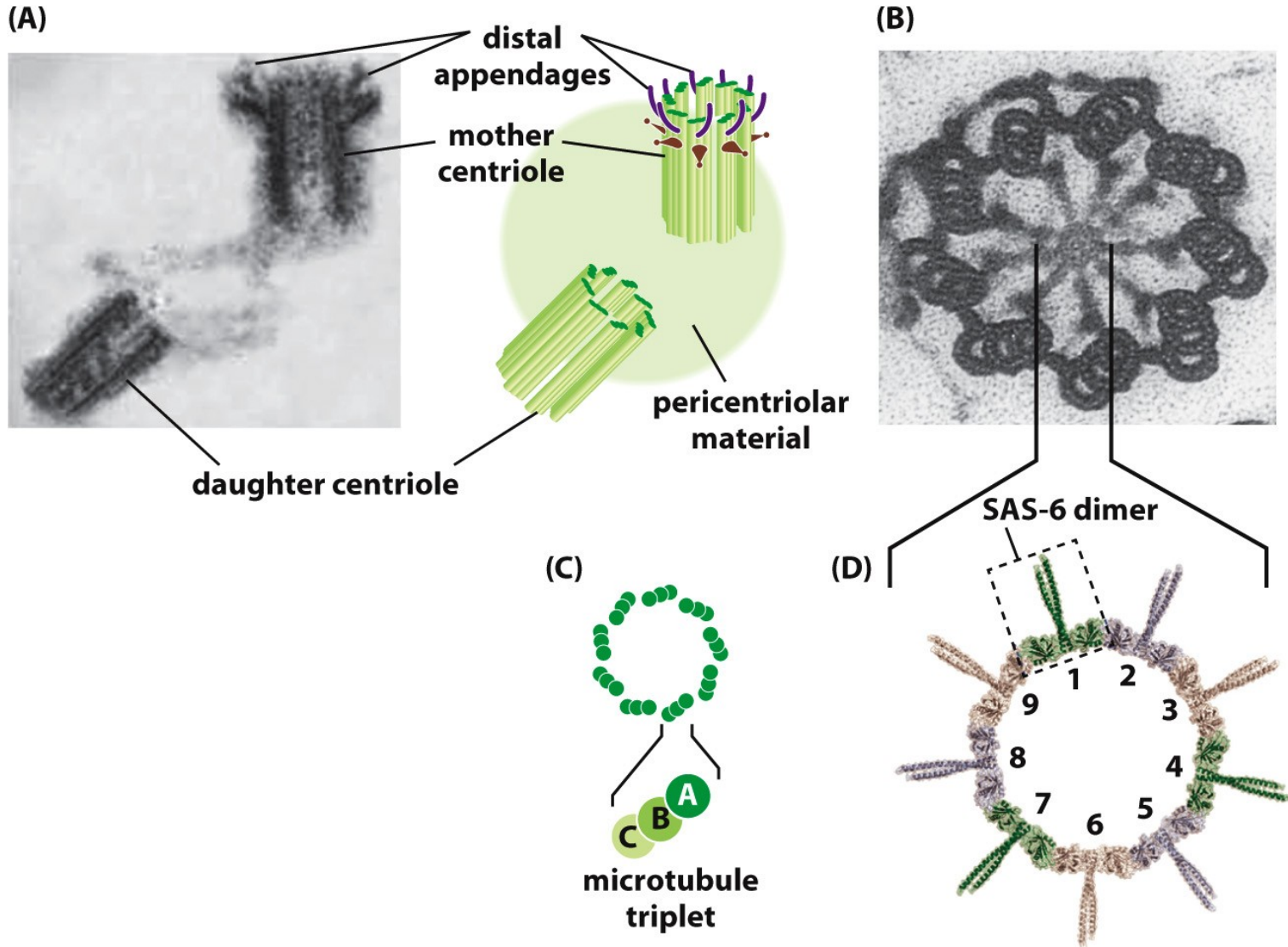


Figure 16-48 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Mikrotubuly – MTOC (microtubule-organizing center)

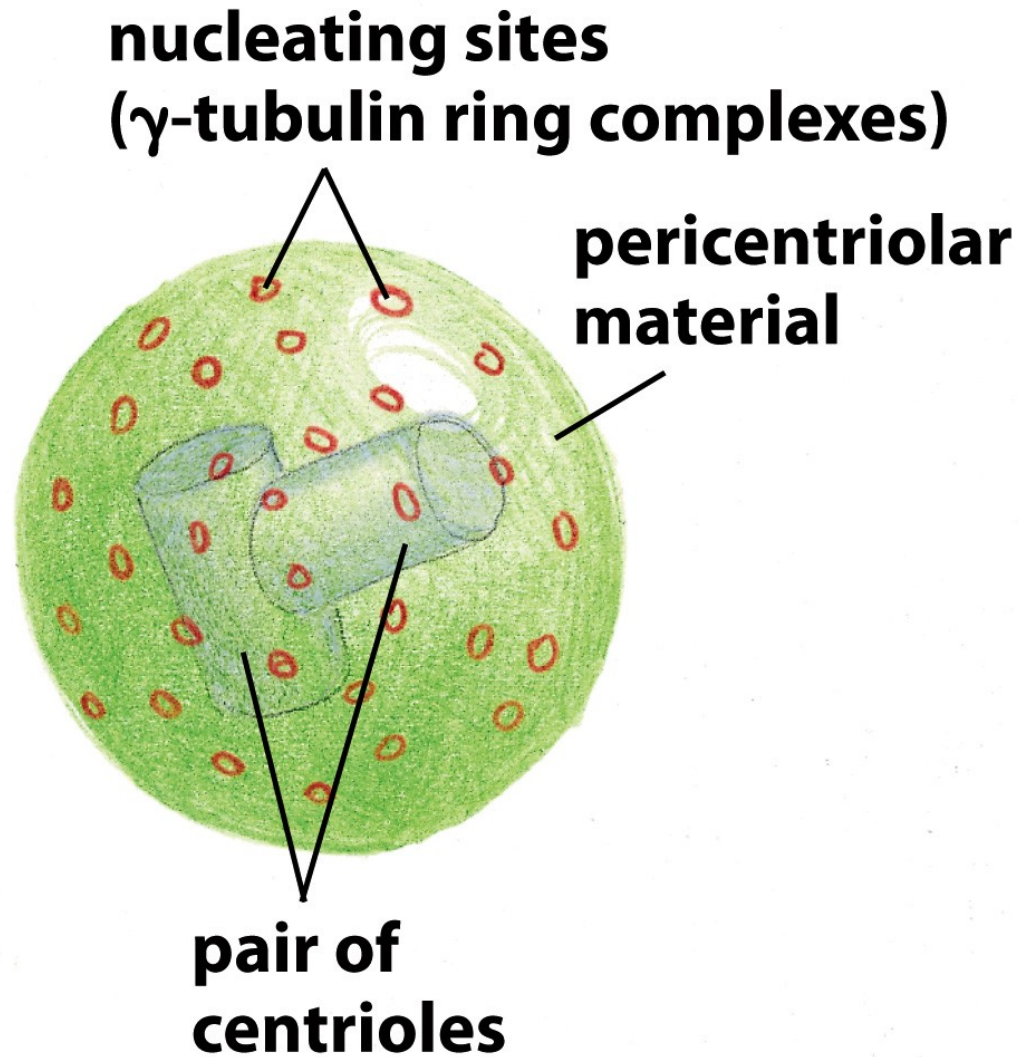
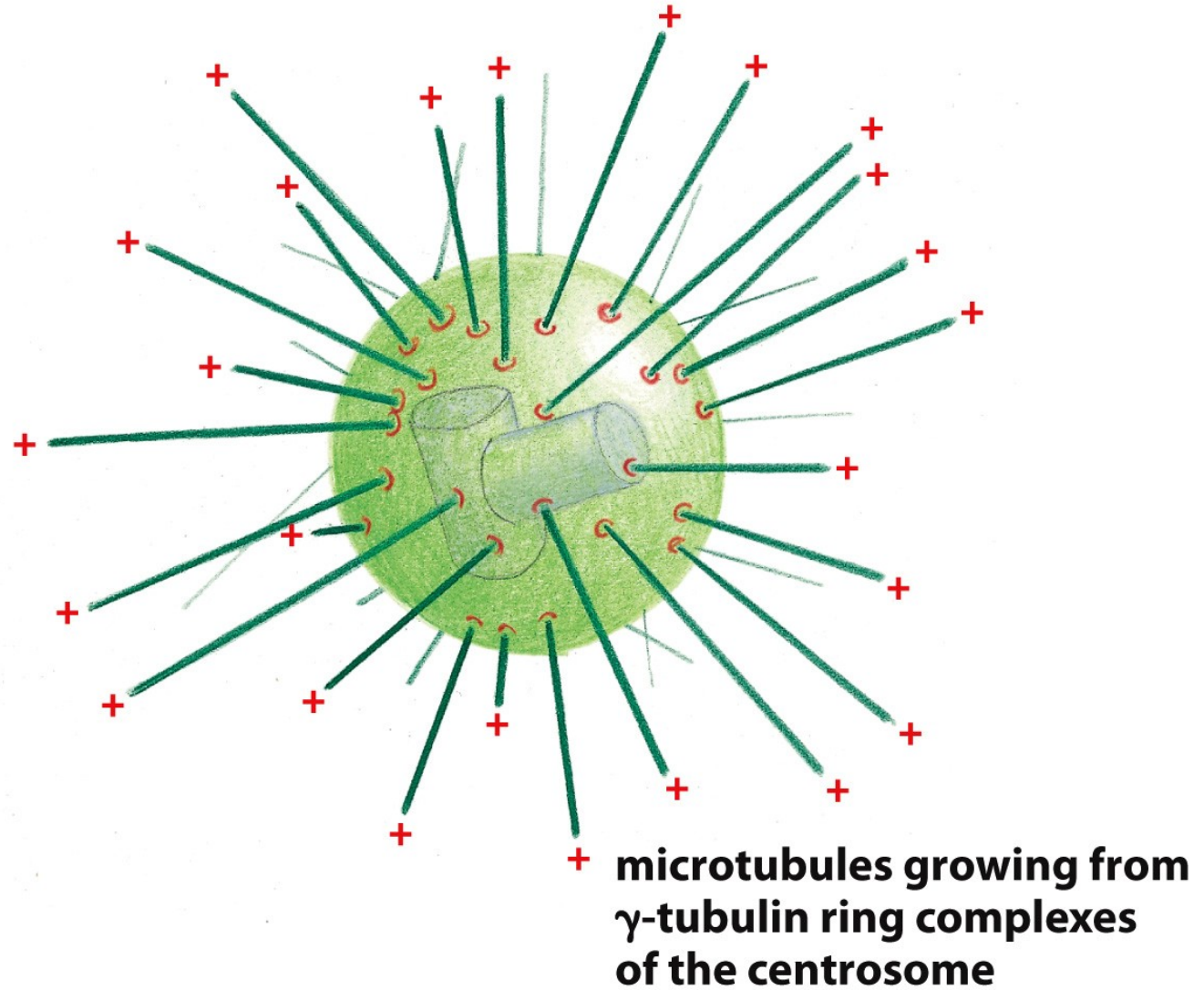


Figure 16-47a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Mikrotubuly – MTOC (microtubule-organizing center)



# Mikrotubuly – MTOC (microtubule-organizing center)

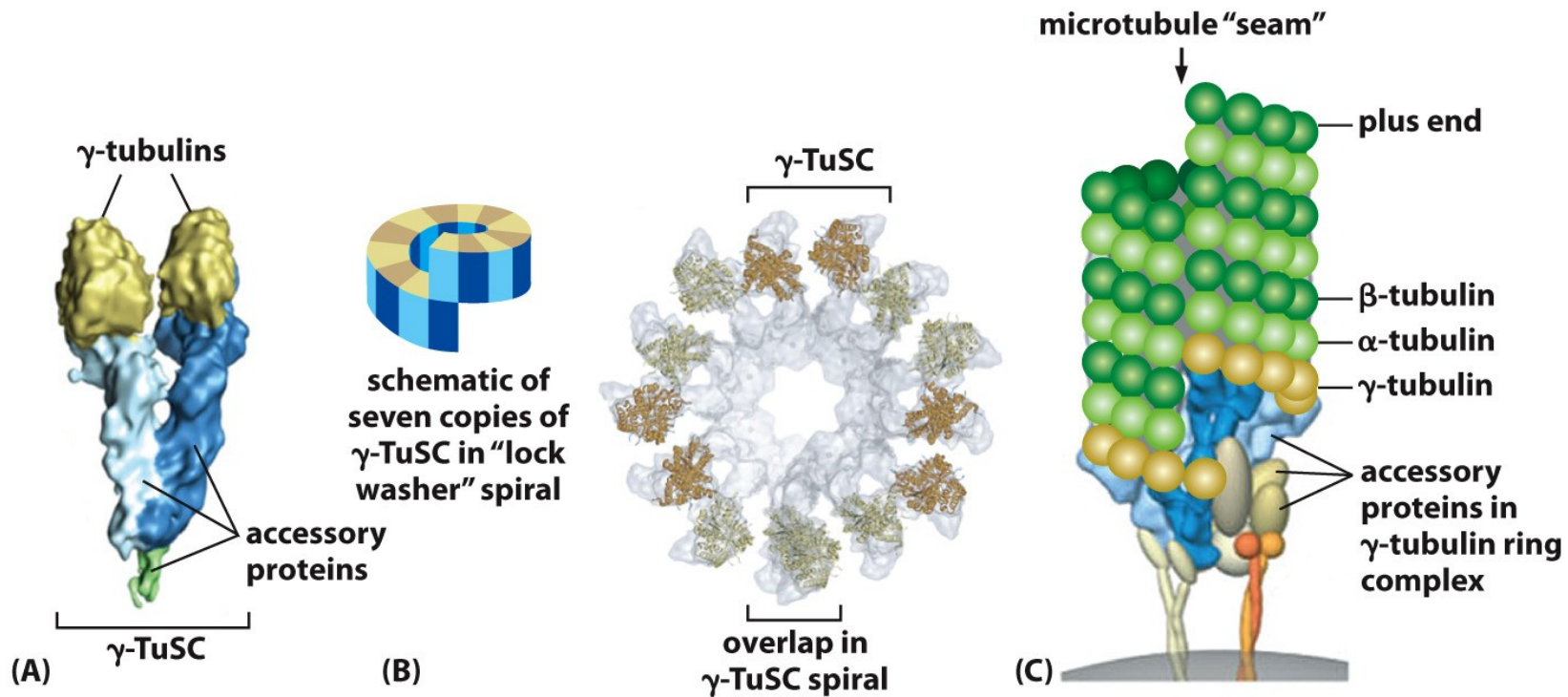


Figure 16-46 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

$\gamma$ -TuSC – gamma tubulin small complex

## Mikrotubuly

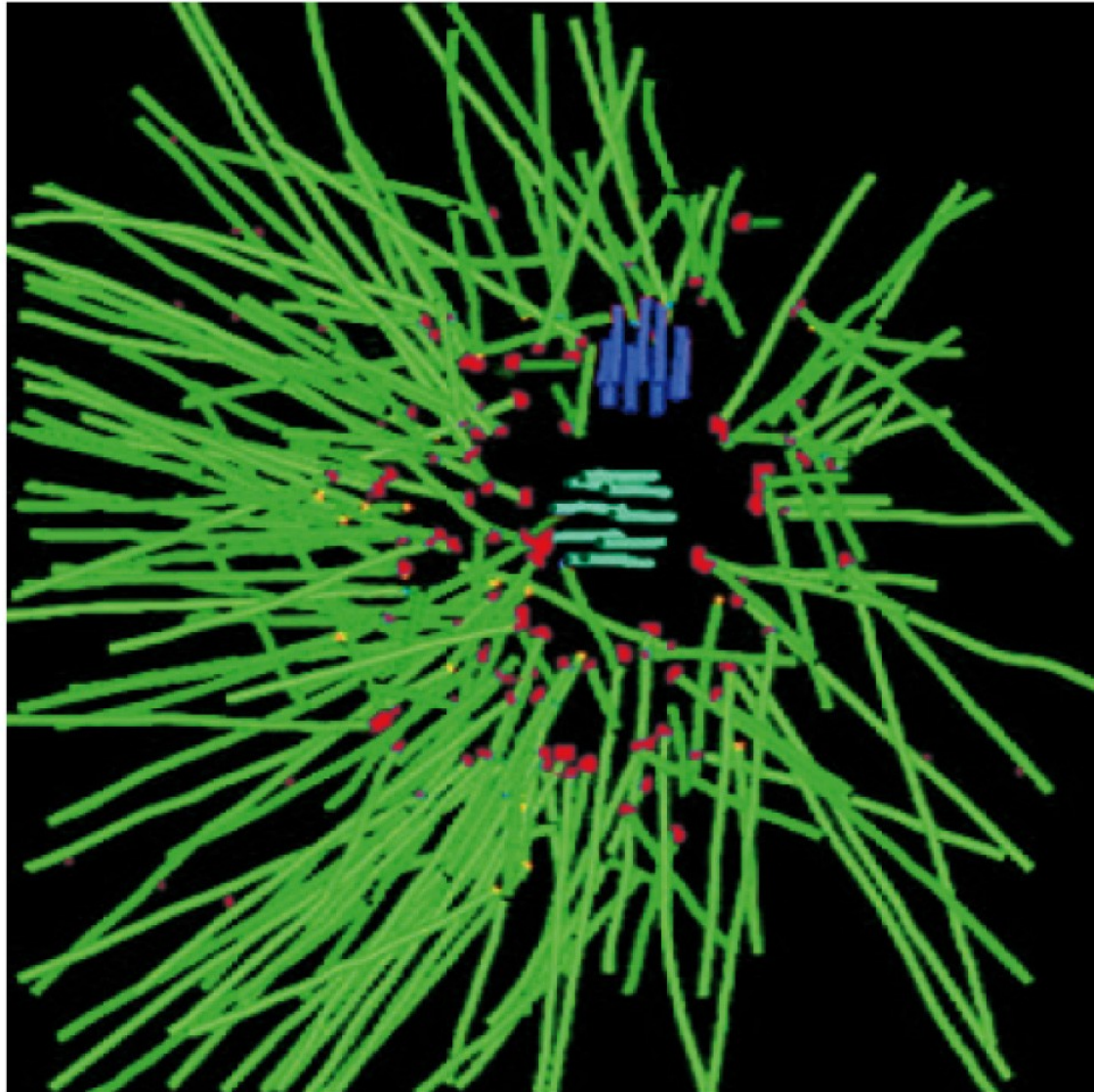
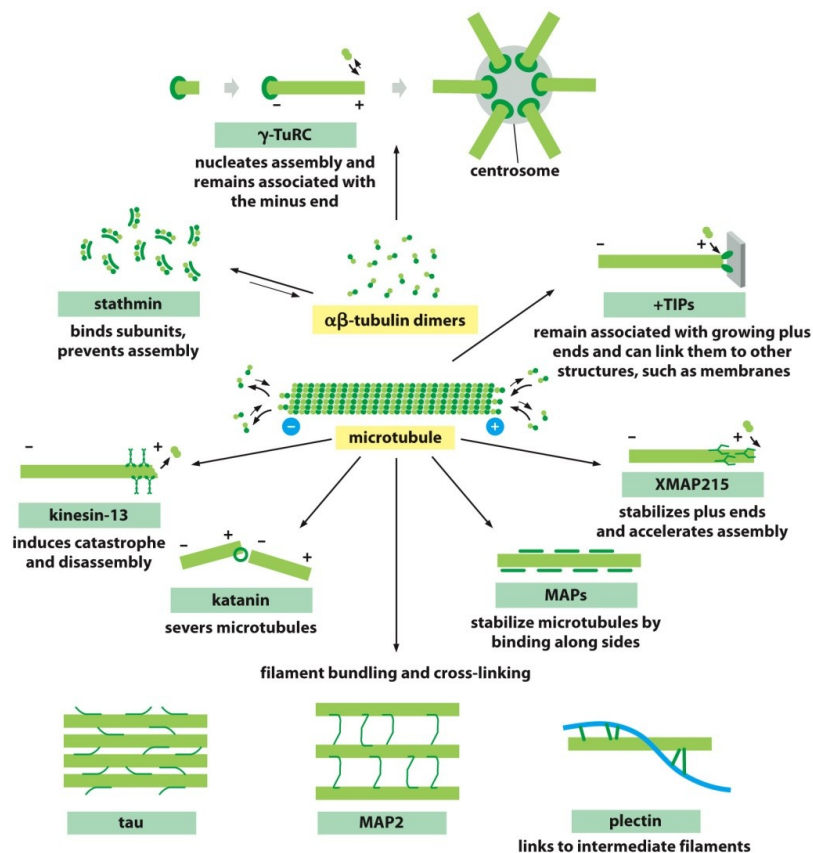


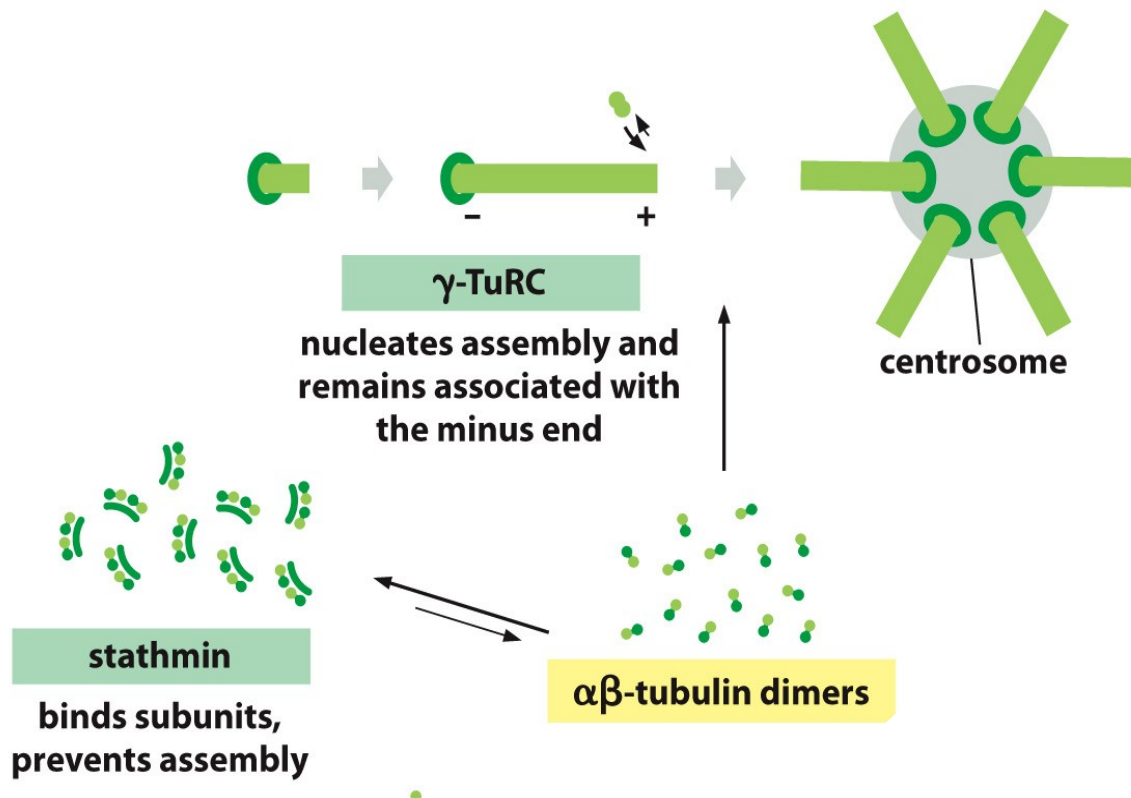
Figure 16-47c Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Proteiny asociované s mikrotubuly

- většina buněk obsahuje více než 100 různých proteinů asociovaných s mikrotubuly a je pravděpodobné, že řada dalších takových proteinů nebyla ještě identifikována

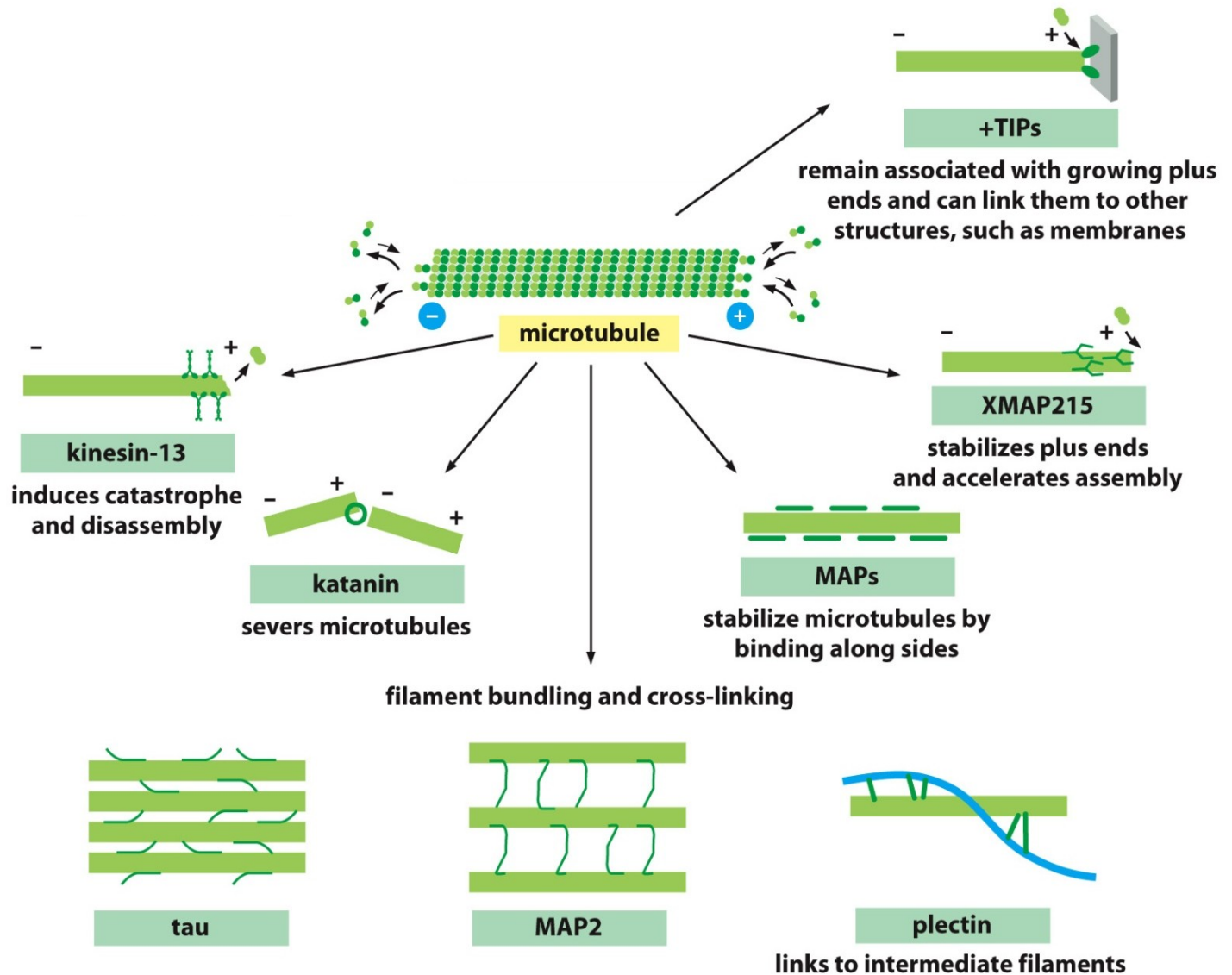


## Proteiny asociované s mikrotubuly

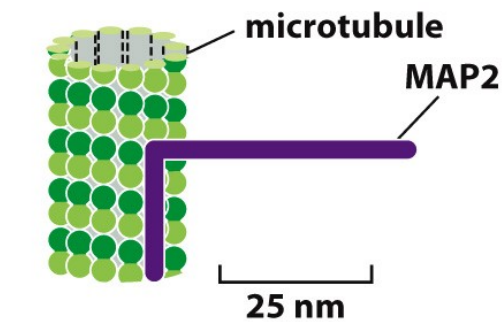




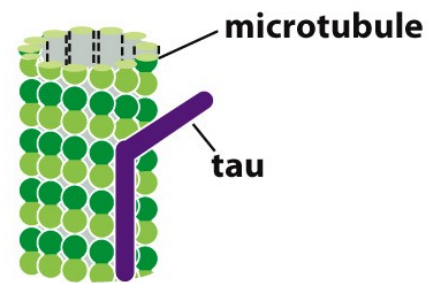
## Proteiny asociované s mikrotubuly



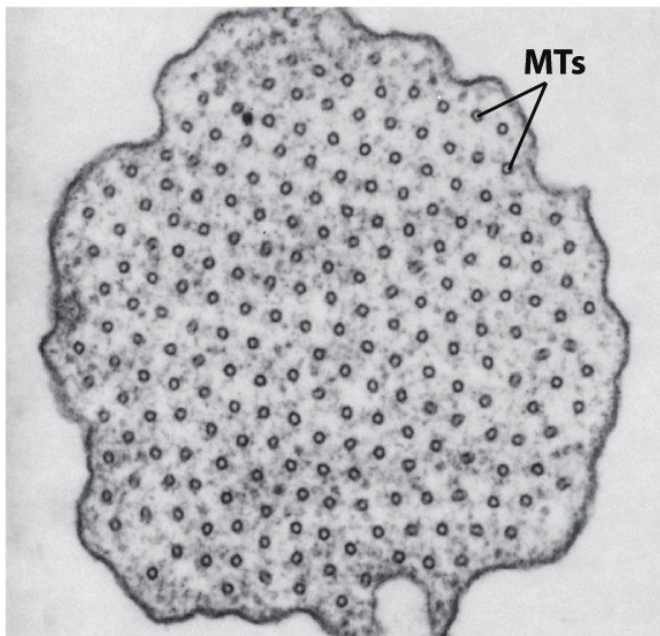
# Proteiny asociované s mikrotubuly



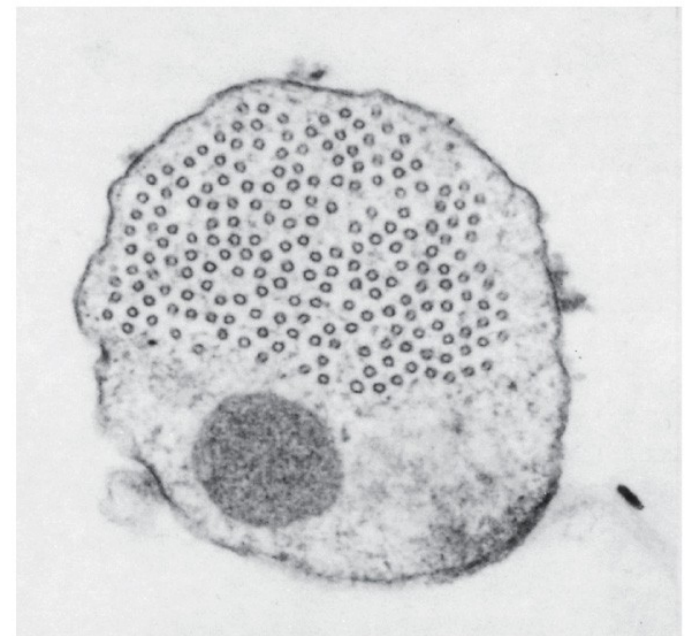
(A)



(B)



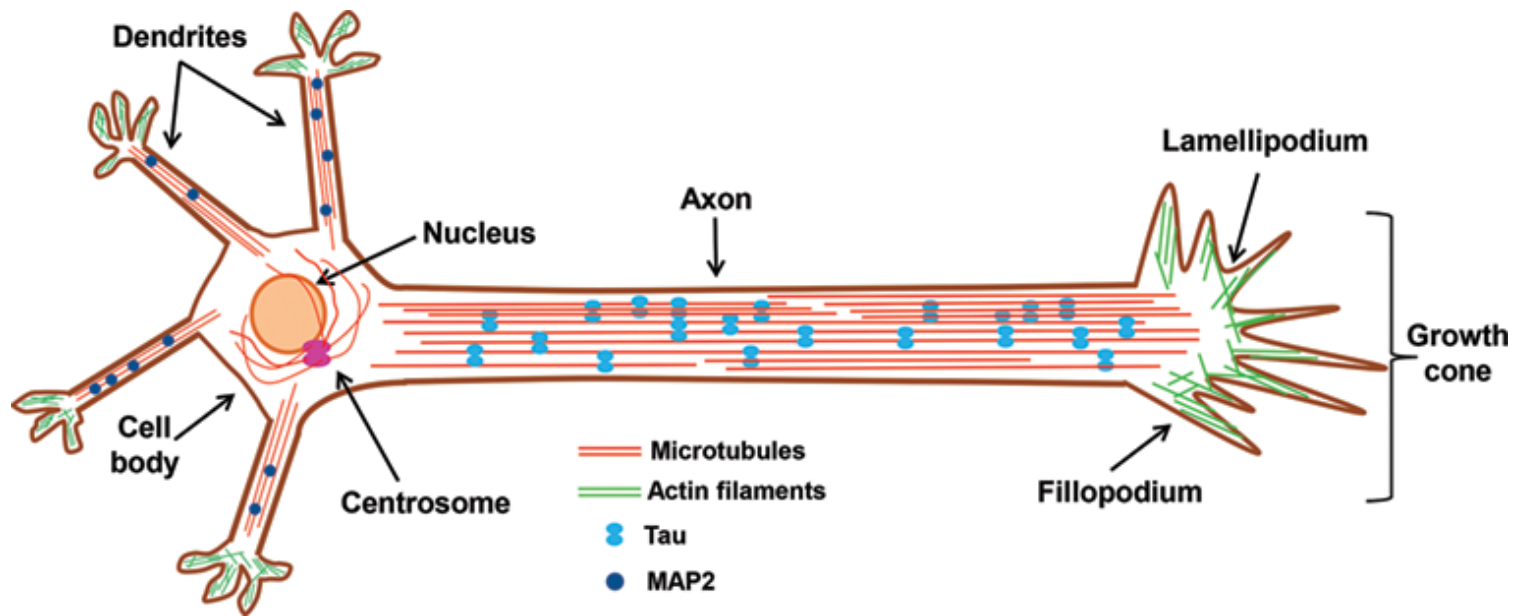
(C)



(D)

300 nm

# CYTOSKELET



# Proteiny asociované s mikrotubuly

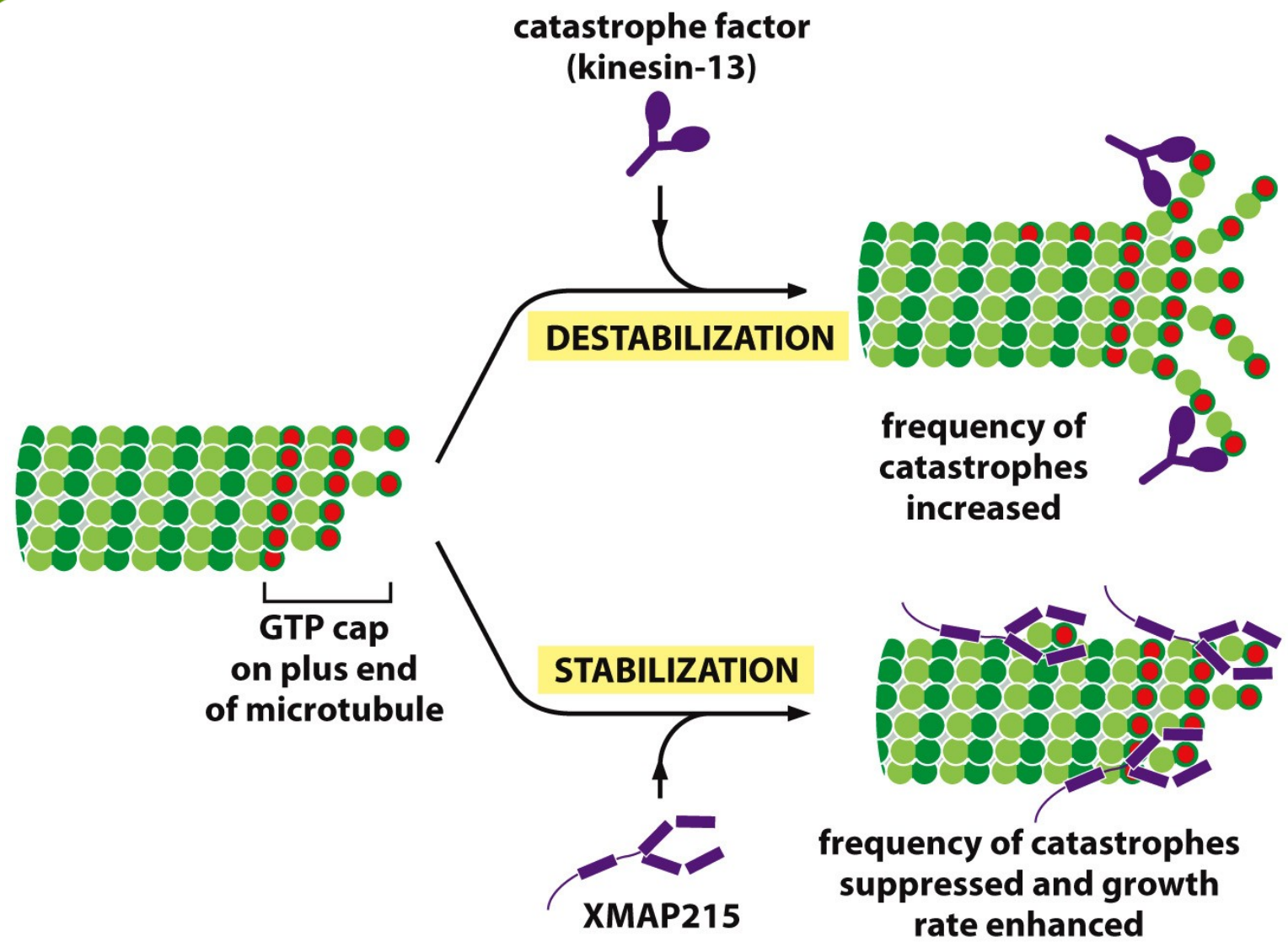


Figure 16-52 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Proteiny asociované s mikrotubuly

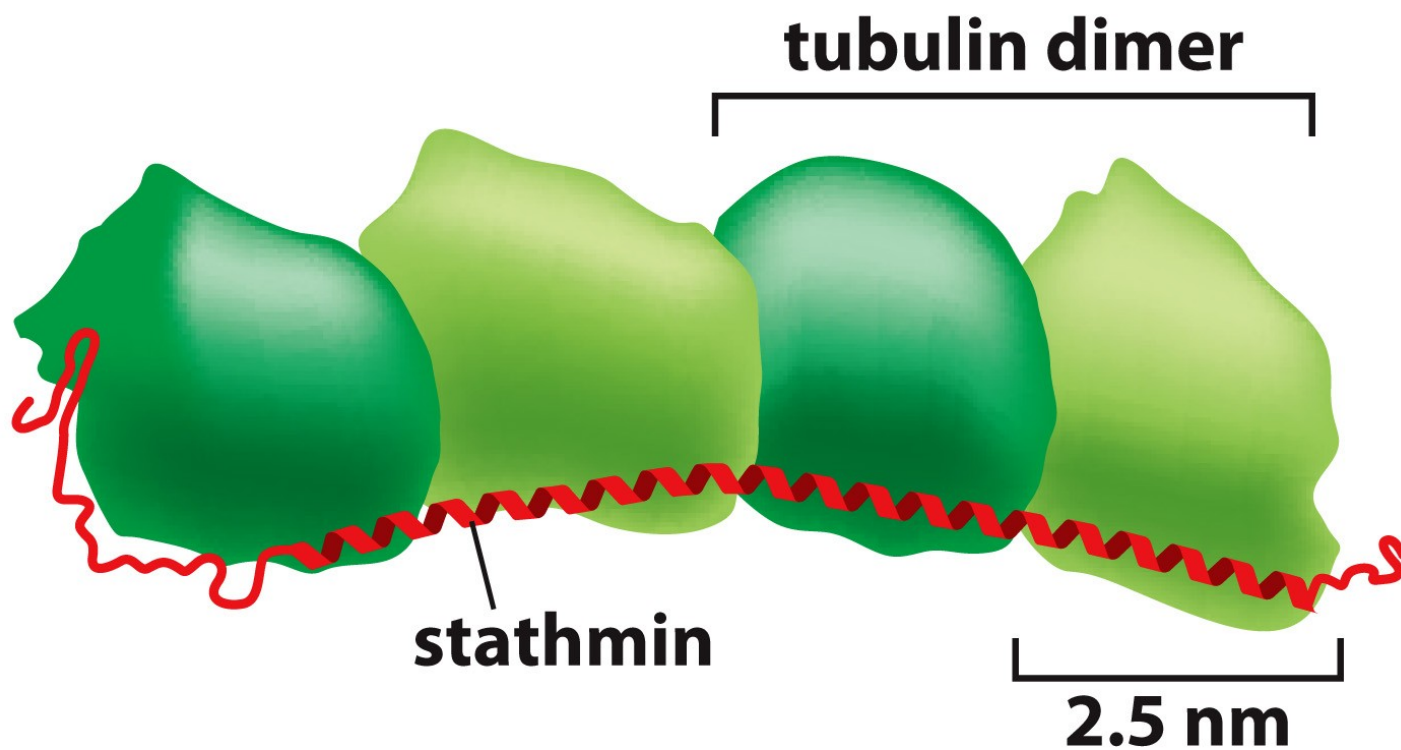


Figure 16-54 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Molekulární motory vozící vozidla po mikrotubulové silnici: kinesiny a dyneiny

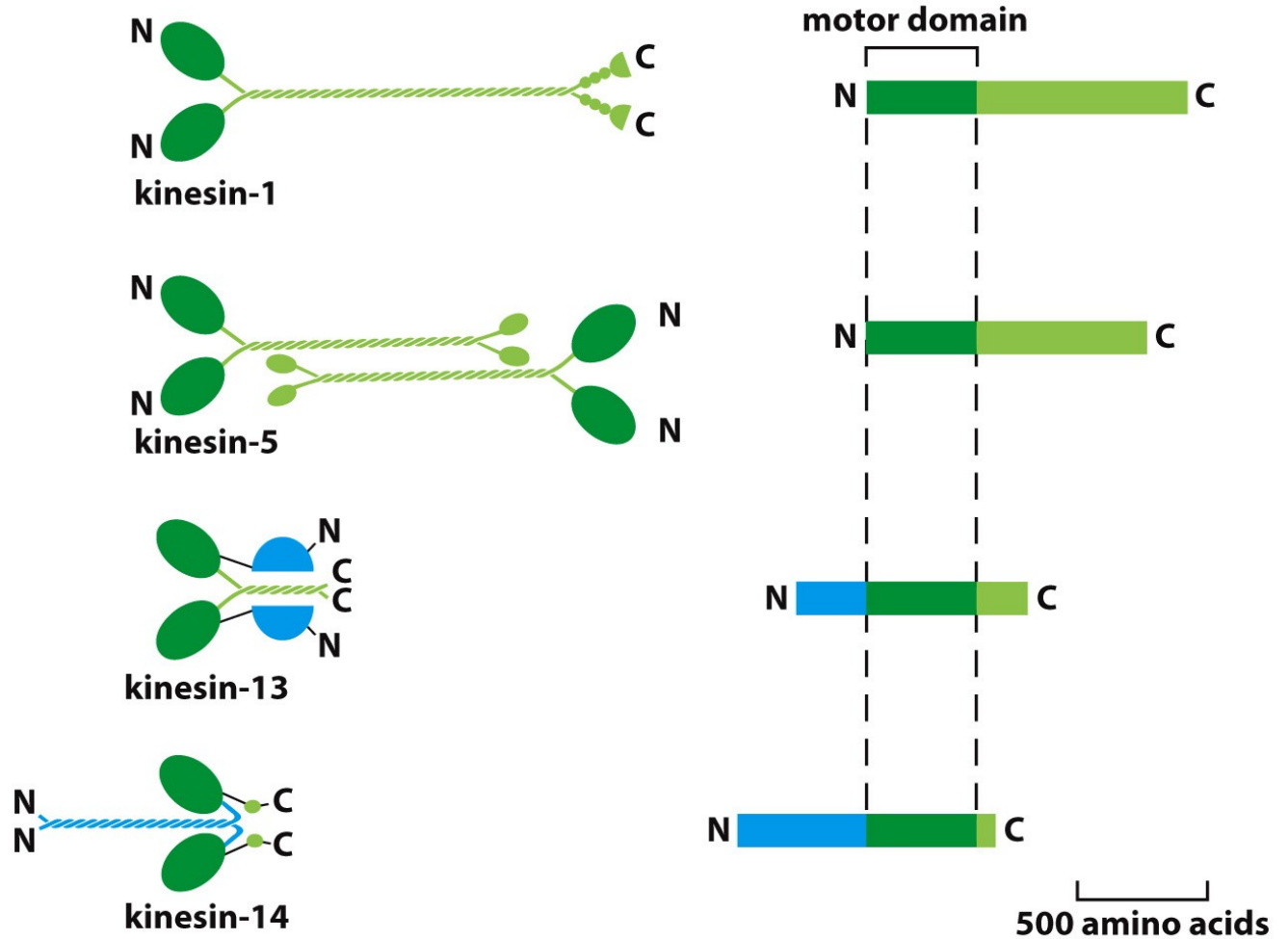


Figure 16-56 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Struktura dyneinu

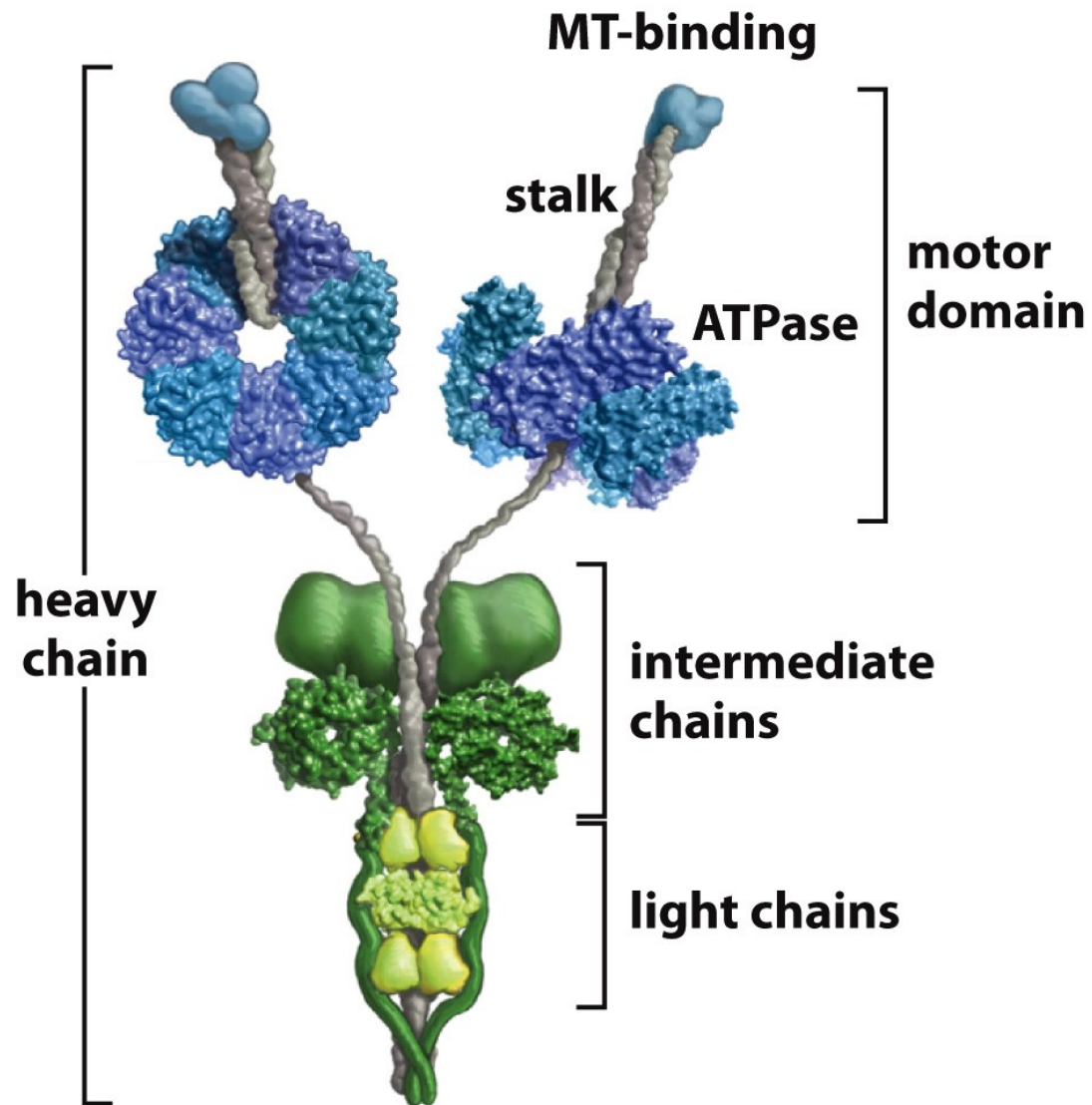
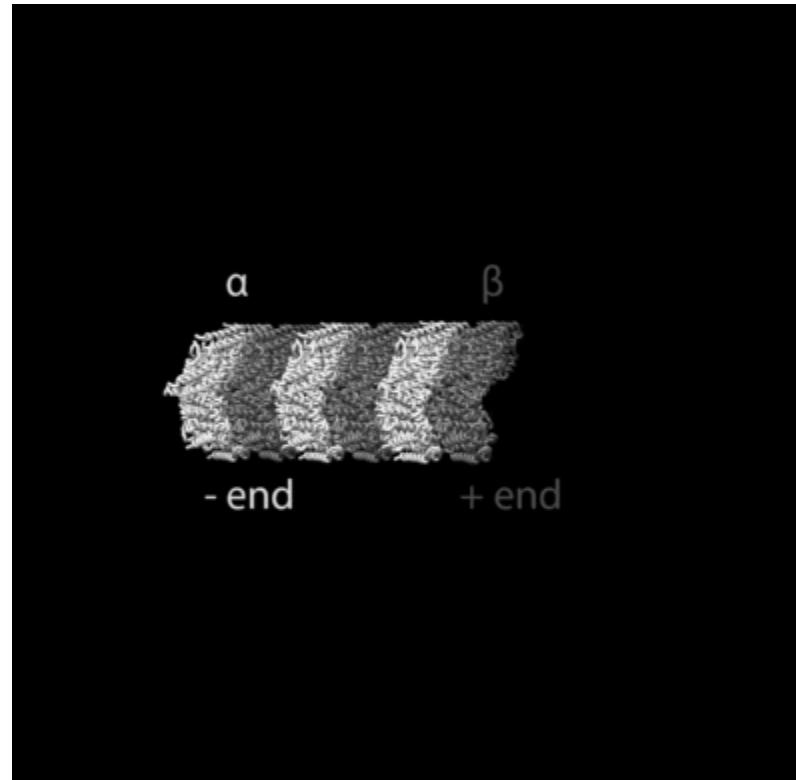


Figure 16-58b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Dyneinový komplex





## Proteiny asociované s mikrotubuly

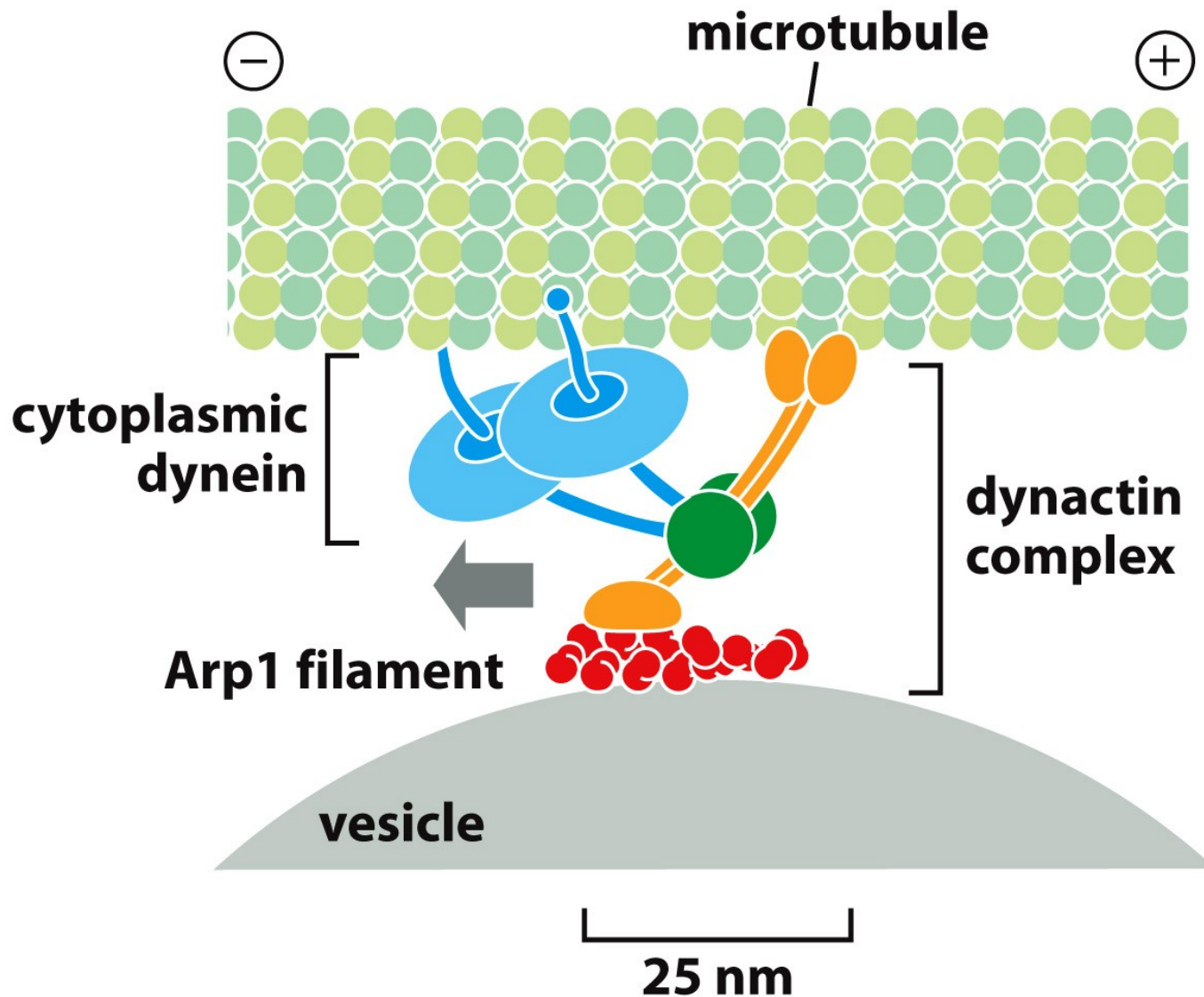
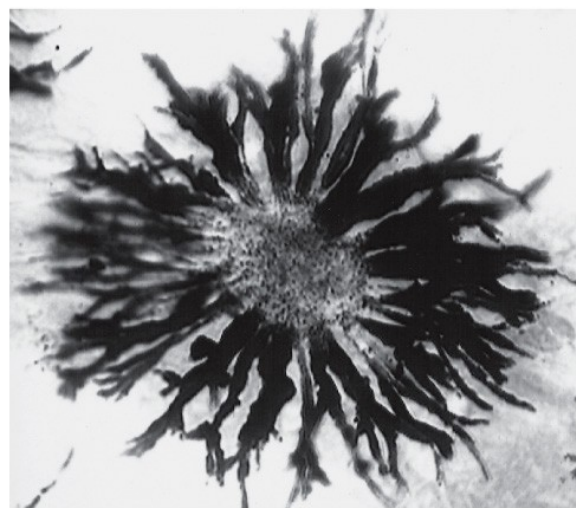
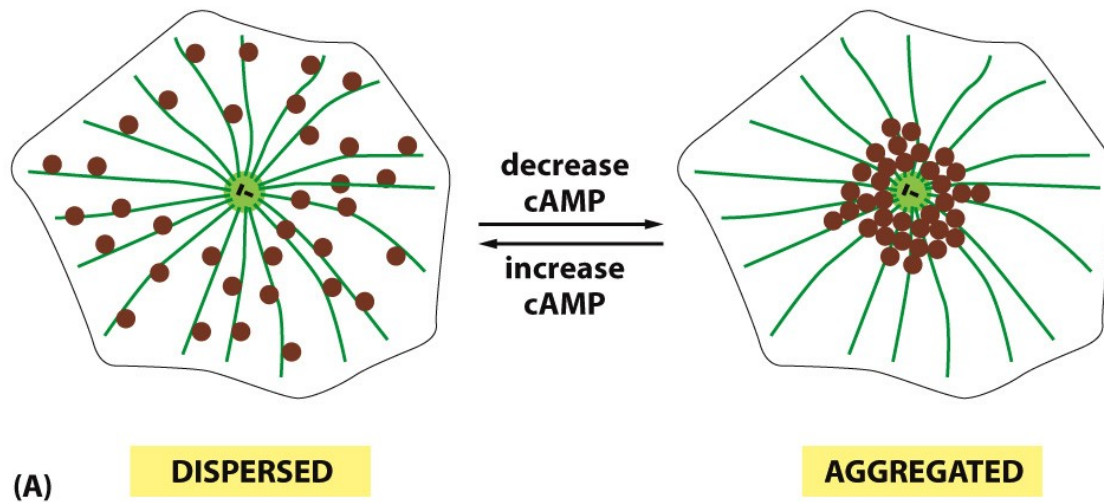


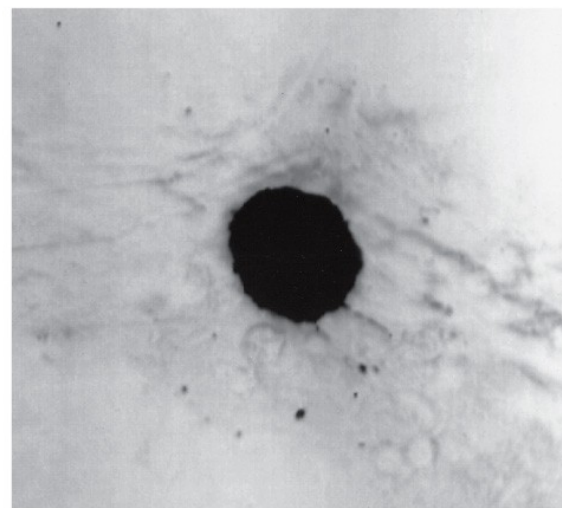
Figure 16-60 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Funkce dyneinu v melanosomu

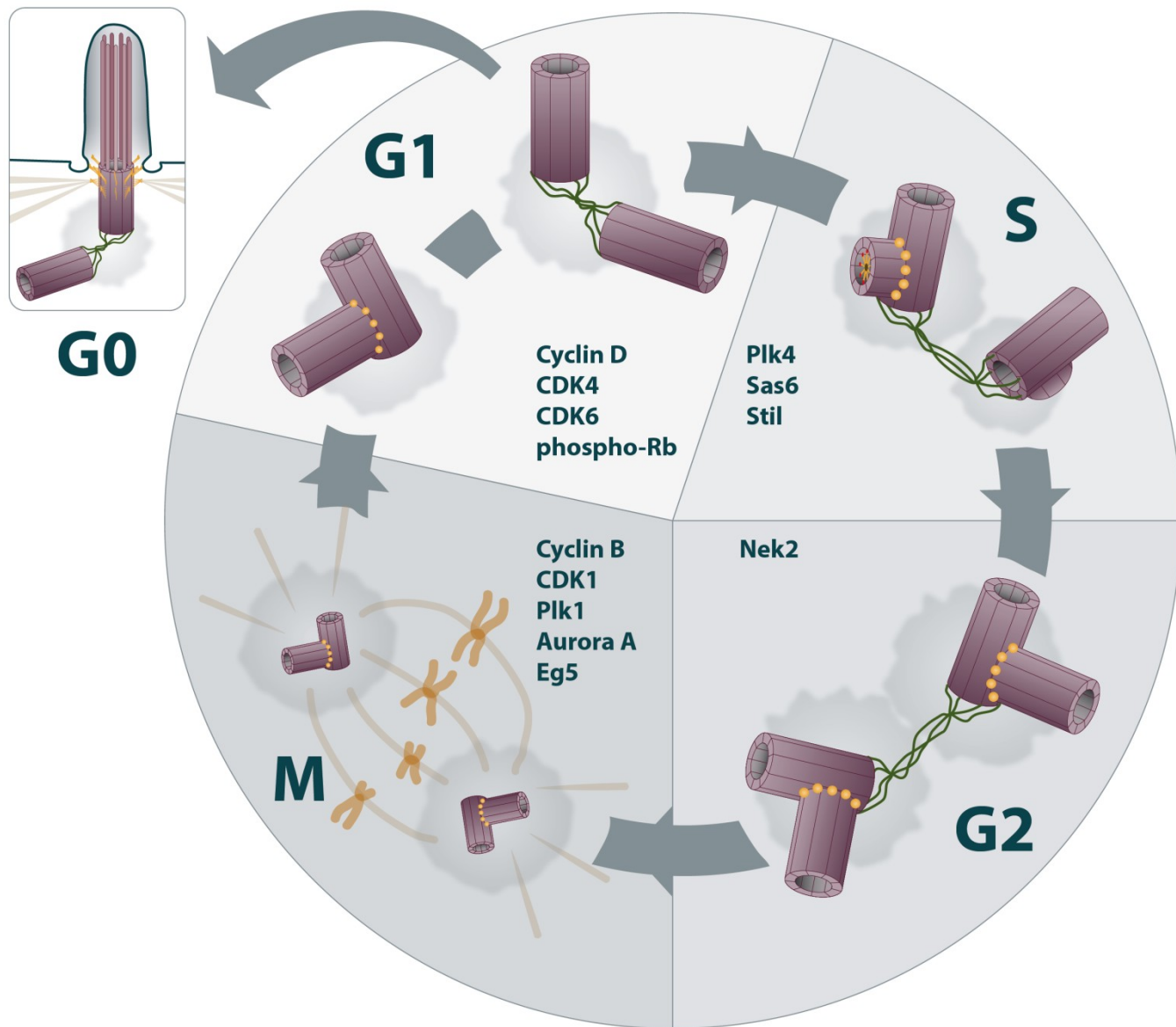


(B)

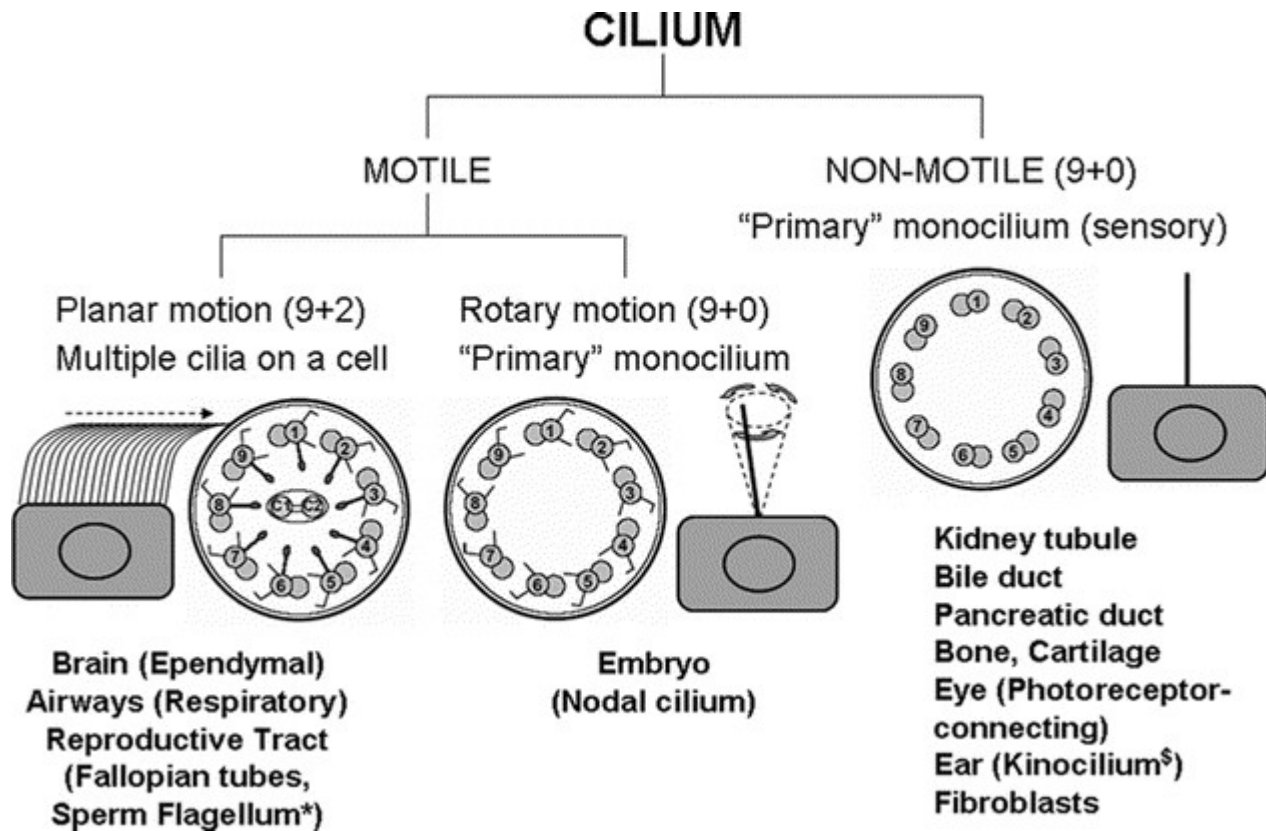
50  $\mu\text{m}$



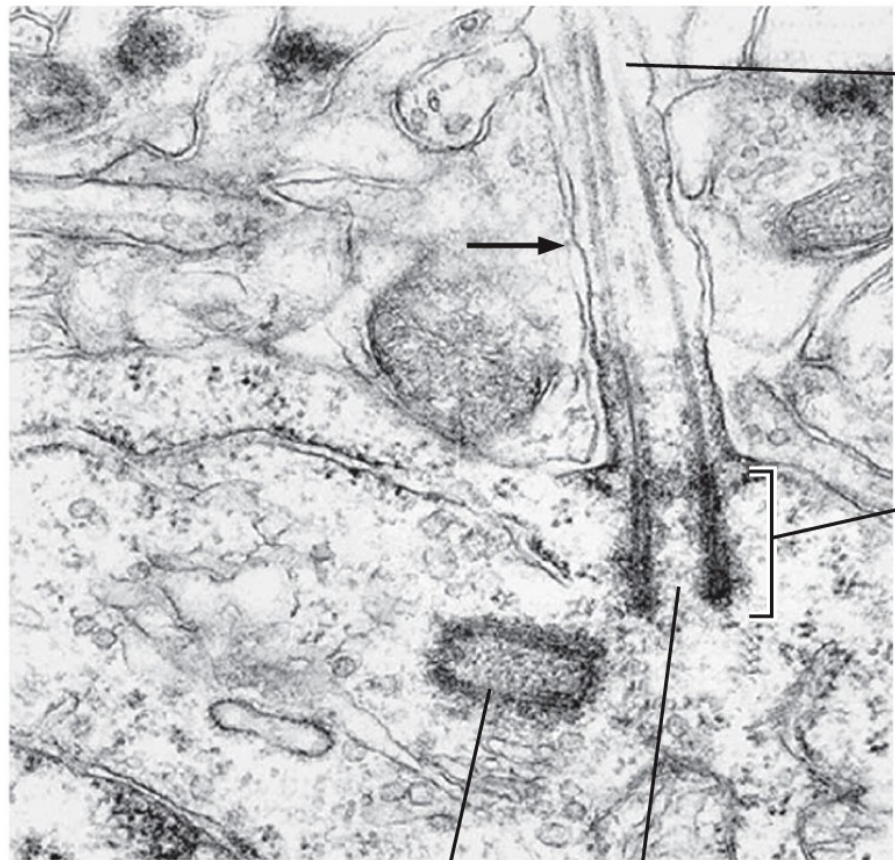
## Centrosom a jeho dynamika



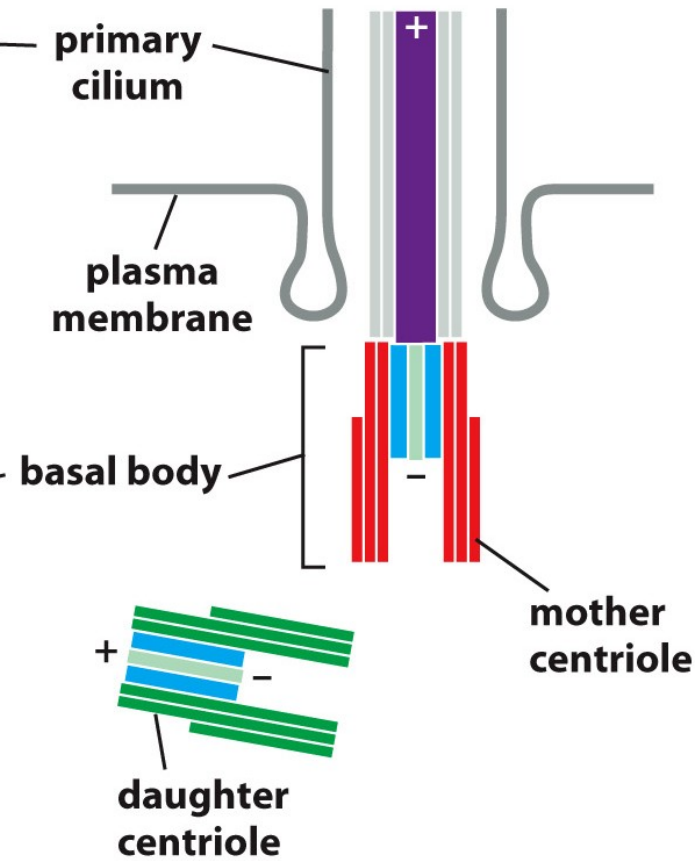
# Cilium (řasinka) – pohyblivá nebo primární cilium



## Primární cilium – vznik bazálního tělíska a jeho ukotvení

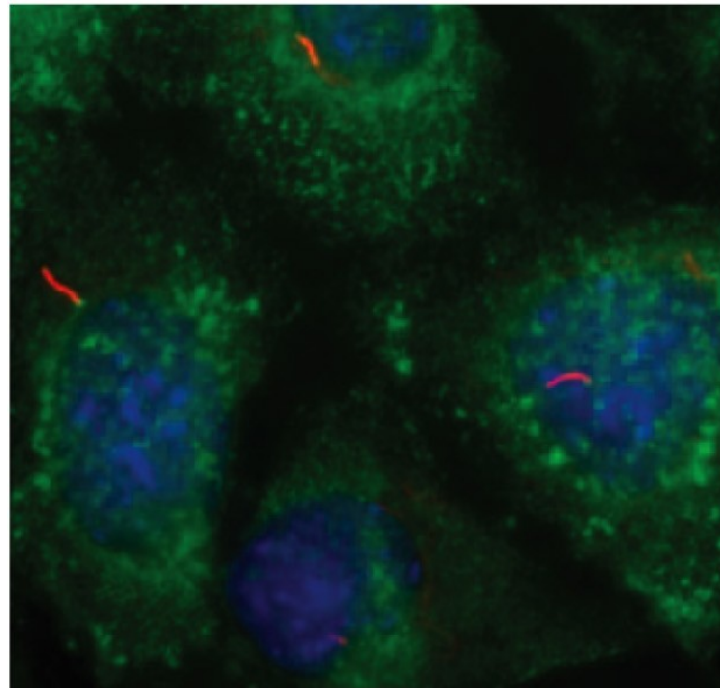


daughter centriole    mother centriole    300 nm



## Primární cilim – obsahuje modifikovaný tubulin

(B)



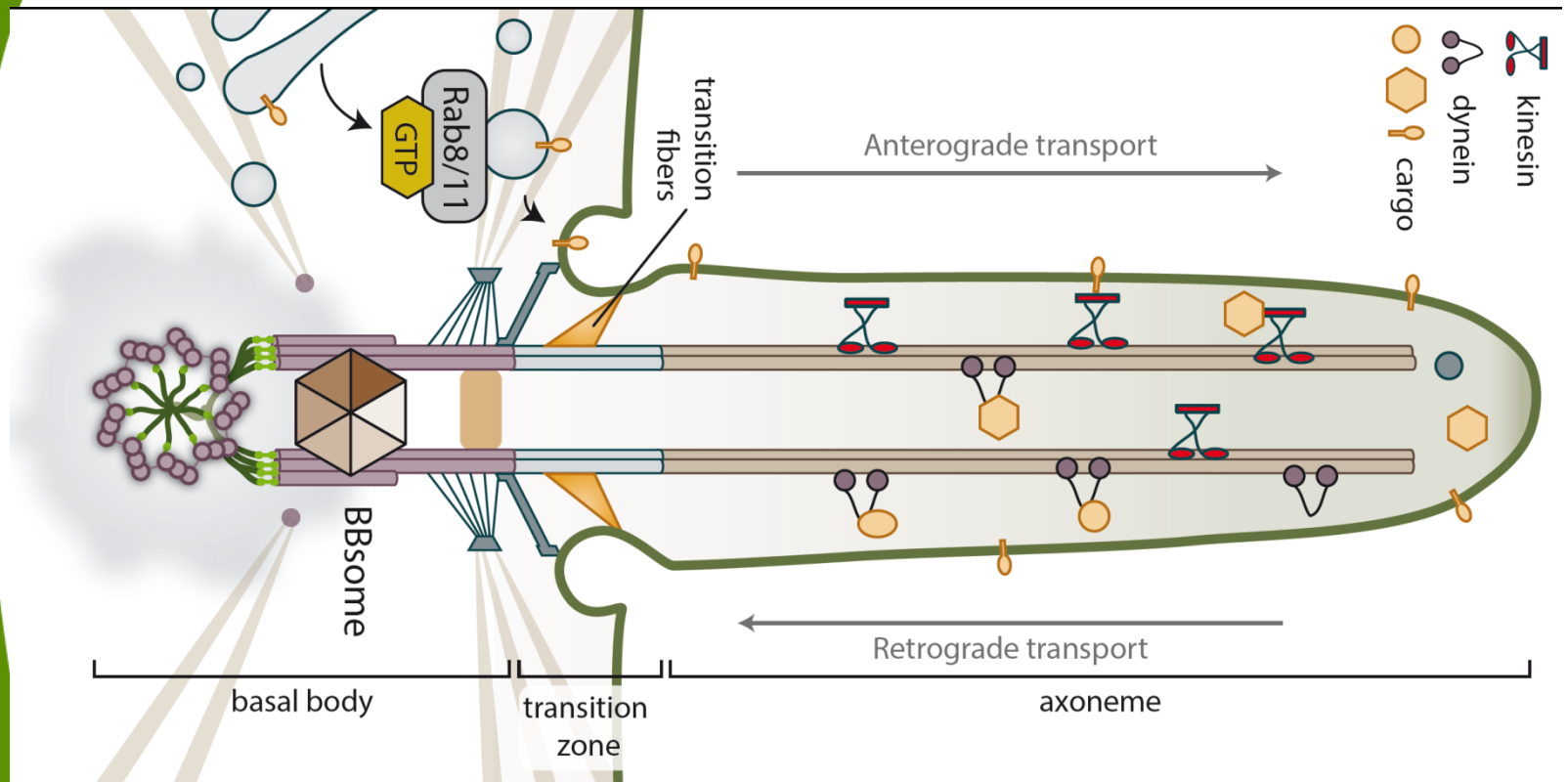
10  $\mu\text{m}$

(C)

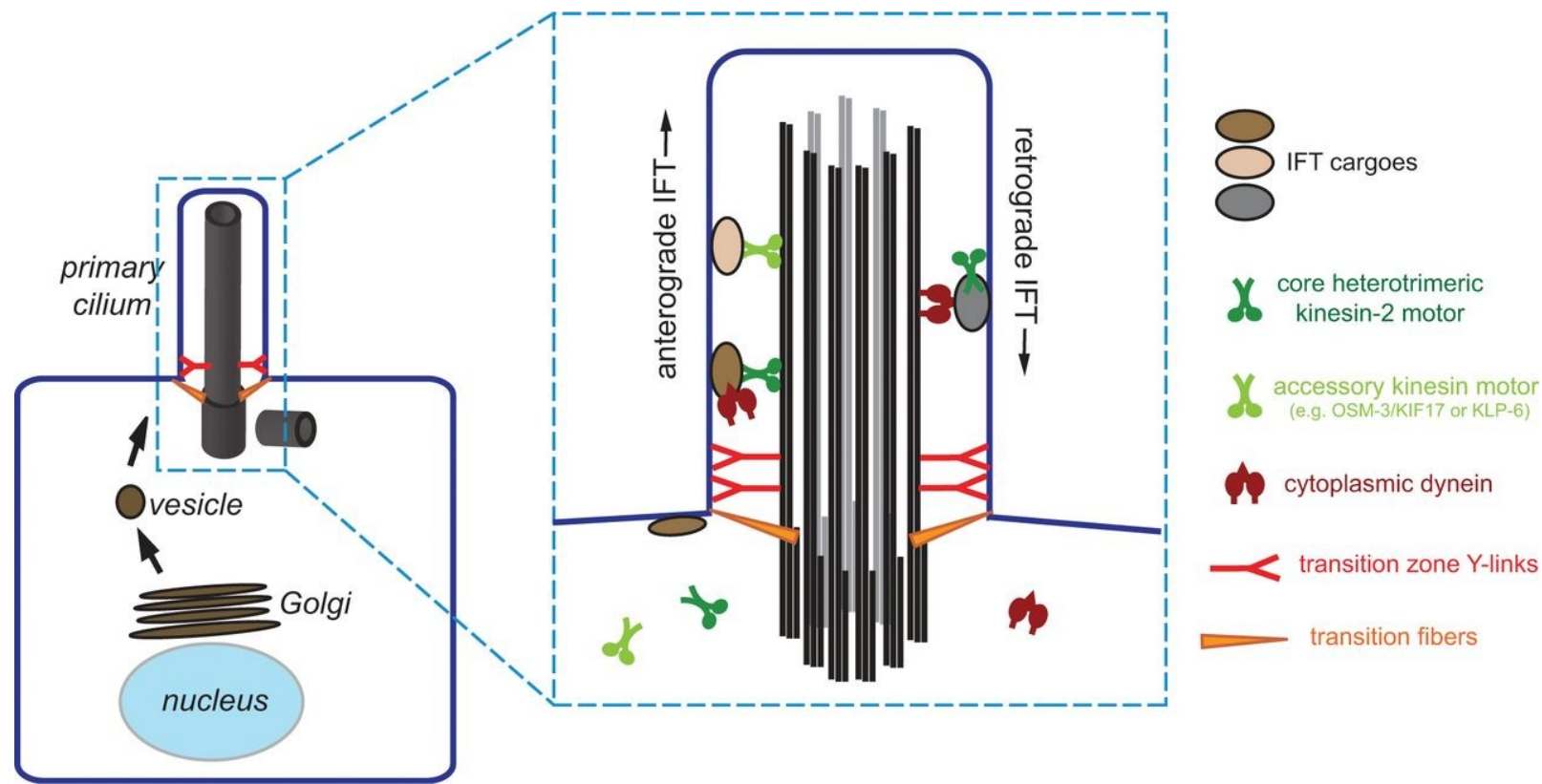


2  $\mu\text{m}$

# Primární cilium – obsahuje modifikovaný tubulin

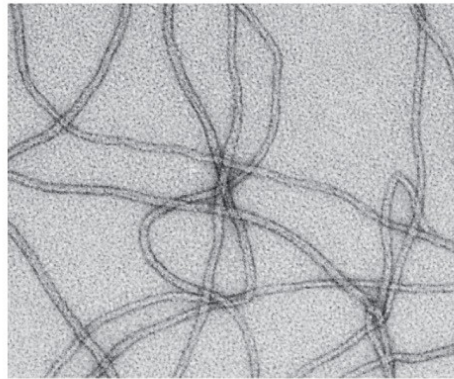


## Recyklace kinesinu a dyneinu v primární cilií





# Intermediální filamenta



0.1  $\mu\text{m}$

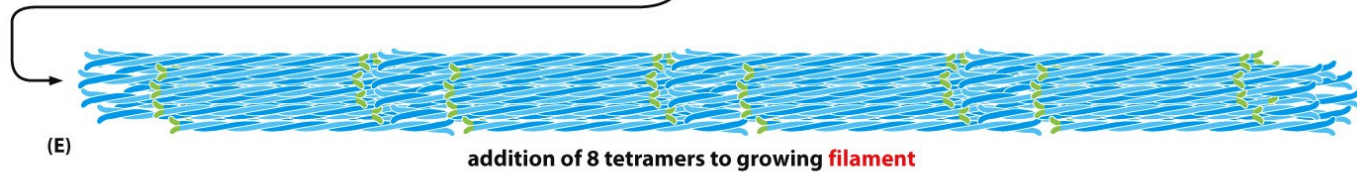
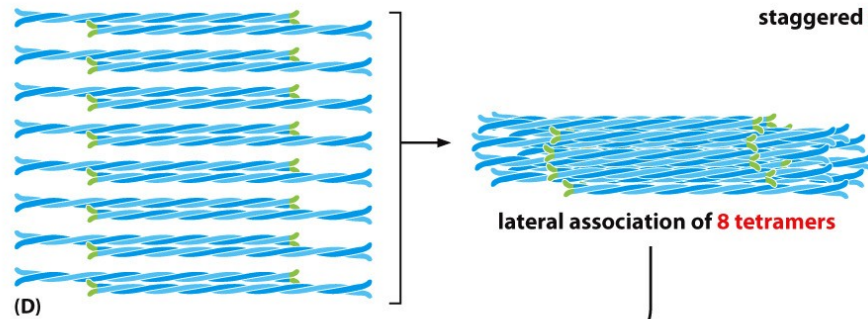
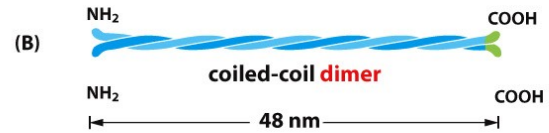


Figure 16-67 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

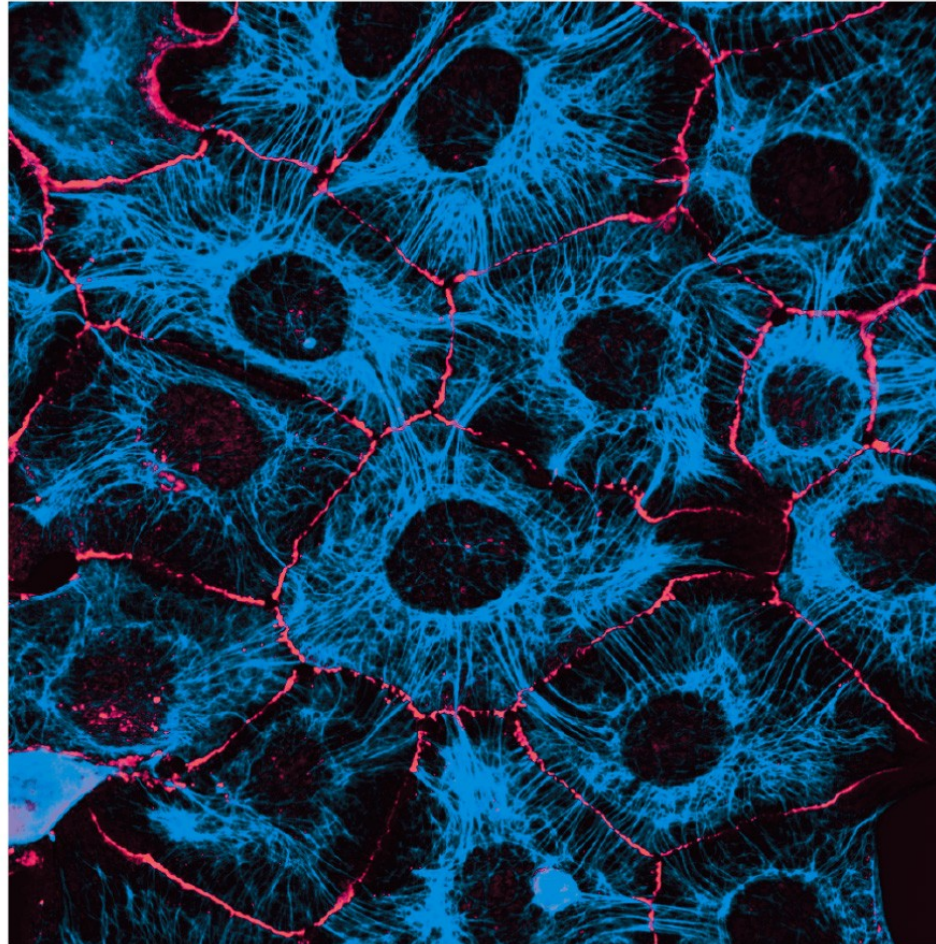
## Intermediální filamenta

- Laminy (jaderná membrána)

Velmi specifické pro individuální buněčné typy

- Vimentin – mesenchymální buňky
- Desmin – sval
- GFAP – gliální buňky
- Keratiny – epitheliální buňky
- Neurofilamentové proteiny (NF-L atd.) - neurony

# Keratin v epiteliálních buňkách



10  $\mu\text{m}$

Figure 16-68 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Cytoskeletální realita běžné buňky

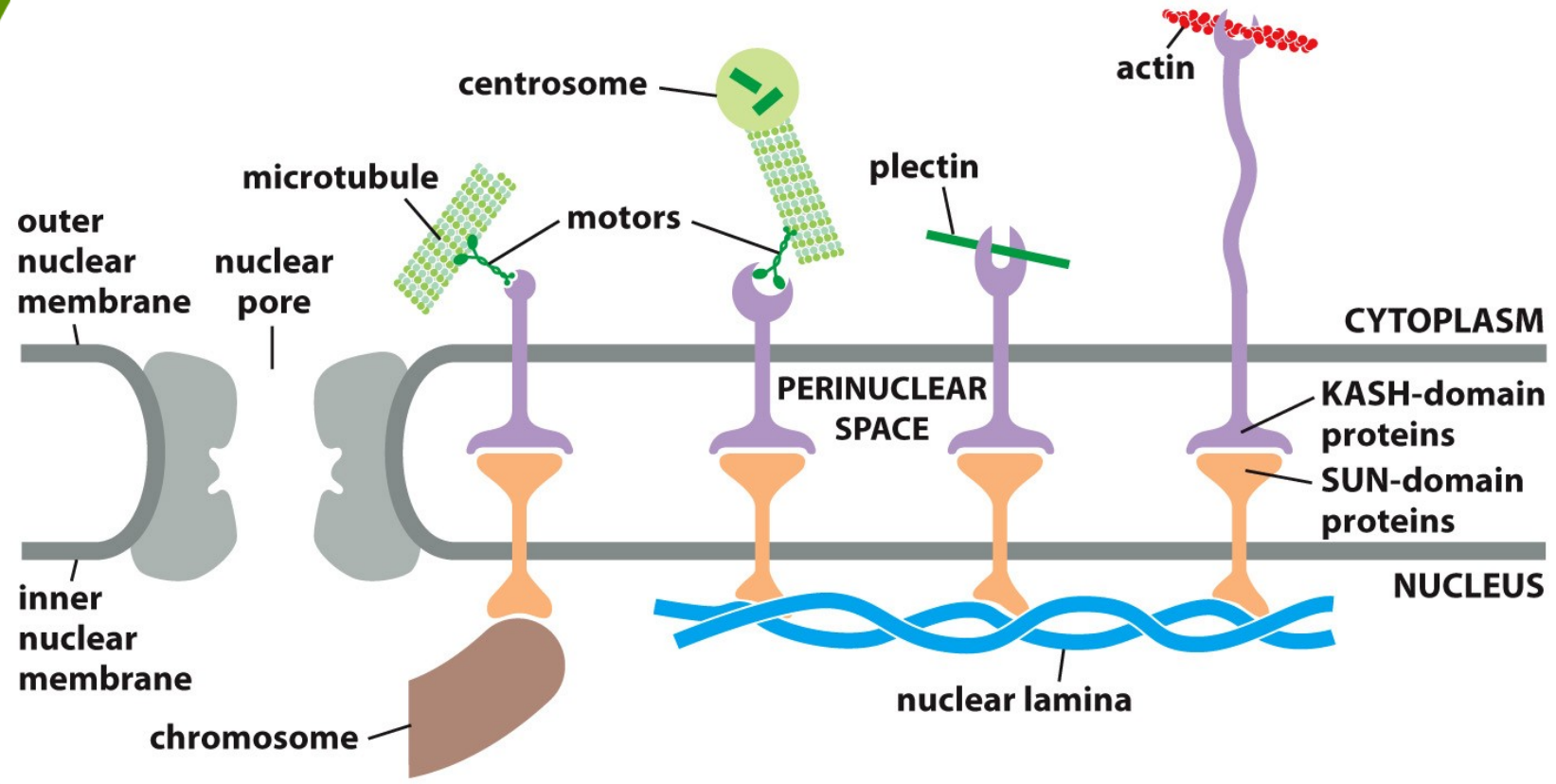


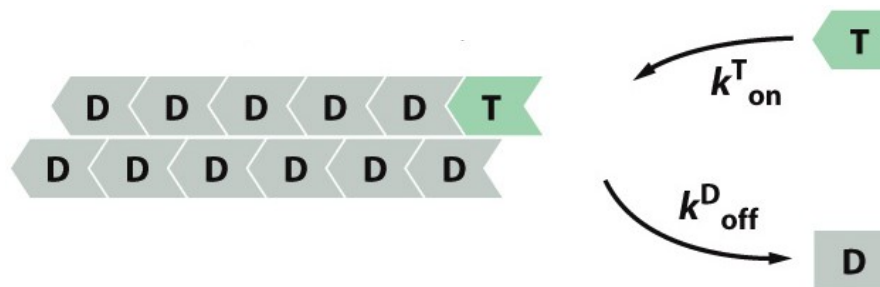
Figure 16-72 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

**Konec prvního dílu**

## Extra slides

## Hydrolýza nukleotidů

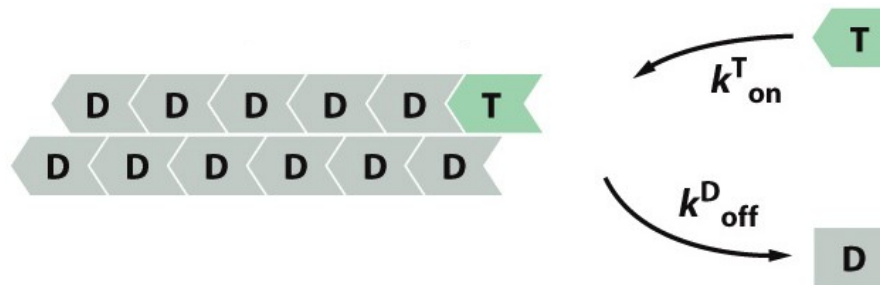
- situace na „plus konci“:



- polymer bude růst, pokud  $C = C_c$  ( $k^D_{on}$  a  $k^T_{off}$  můžeme zanedbat, protože jejich hodnoty jsou obvykle velmi malé), takže polymer roste, když:

$$k^T_{on} C = k^D_{off} \quad \text{or} \quad C_c = \frac{k^D_{off}}{k^T_{on}}$$

## Hydrolýza nukleotidů



$$k^T_{\text{on}} C = k^D_{\text{off}} \quad \text{or} \quad C_c = \frac{k^D_{\text{off}}}{k^T_{\text{on}}}$$

- jedná se o stabilní stav, ale nikoli o skutečnou rovnováhu, protože ATP či GTP, které jsou hydrolyzovány, musí být doplněny reakcí, kdy podjednotka polymeru přechází z D formy do T formy