

# Kosterní svalstvo

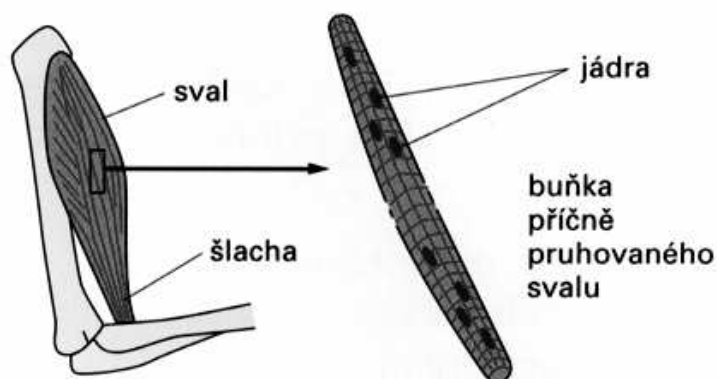
## Základní pojmy:

- Sarkoplazmatické retikulum – zásobárna iontů vápníku
  - depolarizace membrány  $\Rightarrow$  uvolnění vápníku  
v blízkosti kontraktilního aparátu  $\Rightarrow$  vazba na proteiny zajišťující kontrakci  $\Rightarrow$  zkrácení myofibril – kontrakce
- Myofibrily – soubory **tlustých a tenkých filament**, které spolu interagují a v důsledku konformačních změn se po sobě posouvají

## SVAL

Svalové buňky vykonávají práci svým stahem. U obratlovců se vyskytují tři druhy svalových buněk.

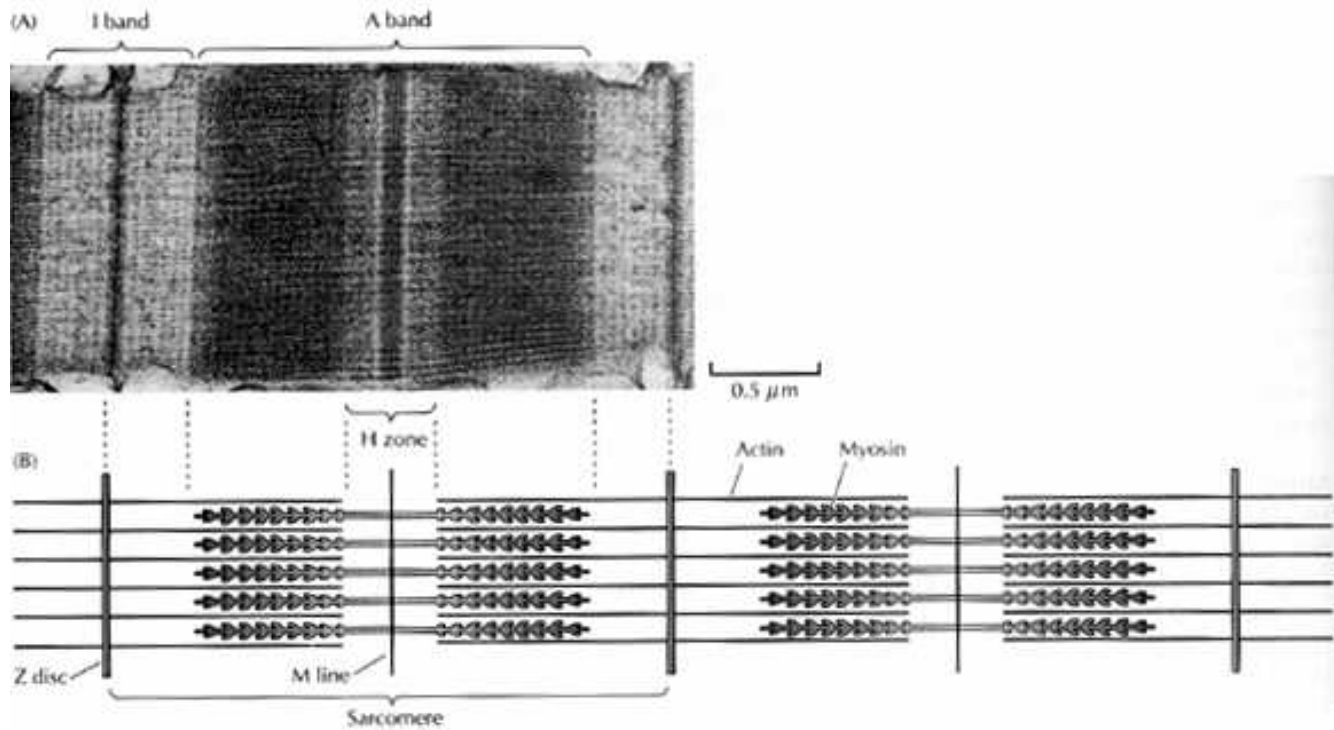
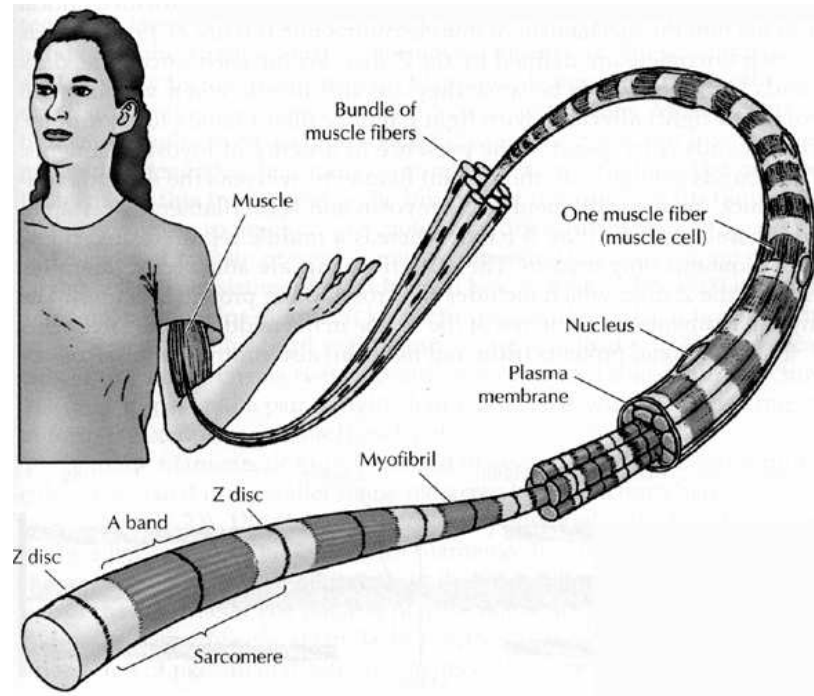
Kosterní sval - ten pohybuje klouby svým rychlým a mohutným stahem. Každý sval je svazkem svalových vláken, každé z nich je ohromnou buňkou s mnoha jádry.



Hladký sval - ten je přítomen v zažívacím traktu, močovém měchýři a v cévách. Je složen ze štíhlých protáhlých, nepruhovaných buněk, každá z nich obsahuje jediné jádro.



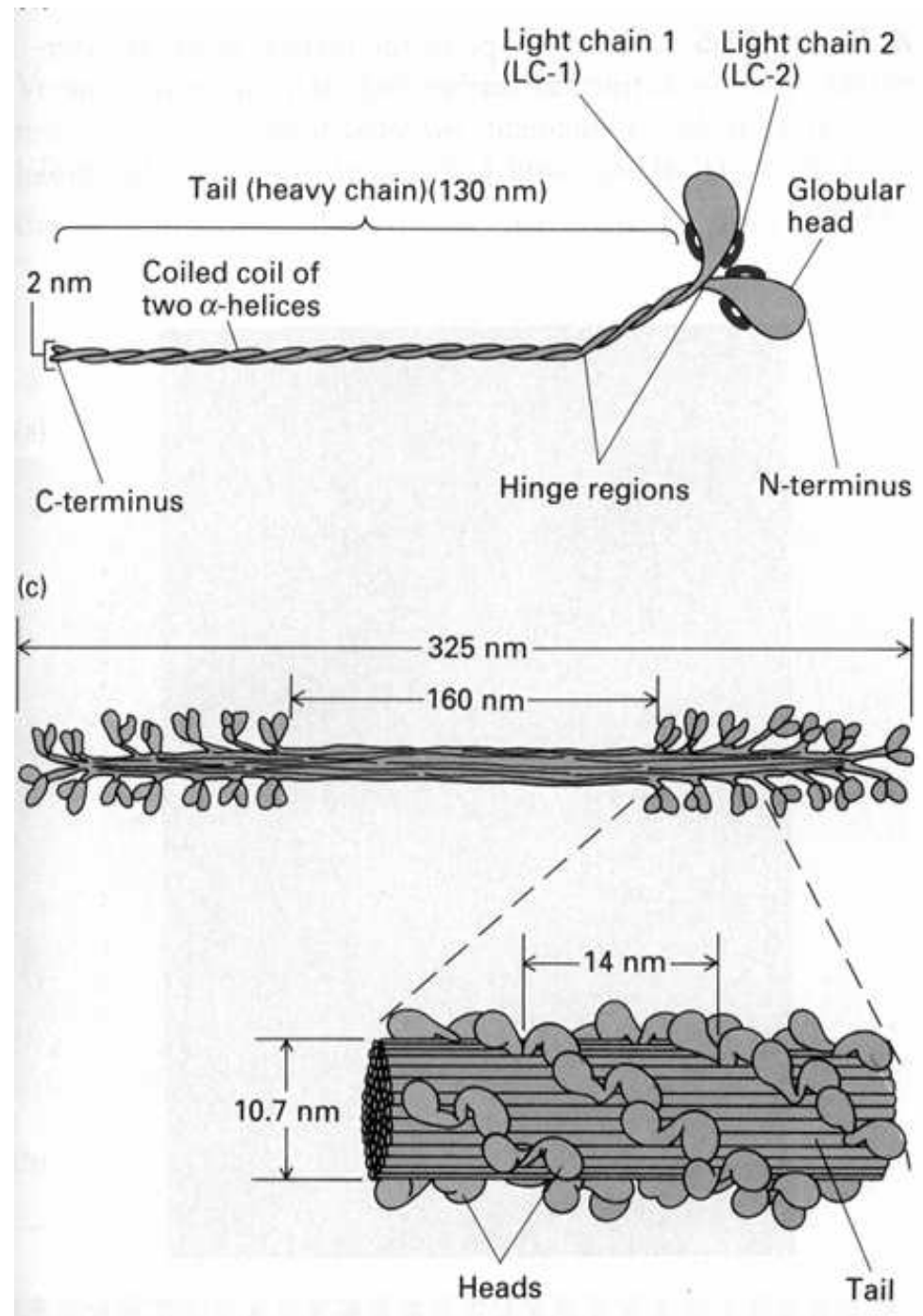
Srdeční sval - jeho rysy leží mezi hladkým a příčně pruhovaným svalem. Sousedící buňky jsou spojeny elektrickými spoji, které zaručují synchronní práci svalu.



# Trusté filamenty

- složeny z **myozinu**
- myozin je dimer 200kDa proteinu “Mhc” (myosinový těžký řetězec)
- dimer stabilizují interakce s  $\alpha$ -helikálními doménami v C-koncové části proteinu
- N-koncová část proteinu Mhc má globulární strukturu a váže dva druhy menších proteinů – myosinové lehké řetězce “Mlc”
- globulární hlavice mhc váže ATP a je schopna ATP-hydrolázové motorické aktivity – umožnění pohybu podél aktinového vlákna

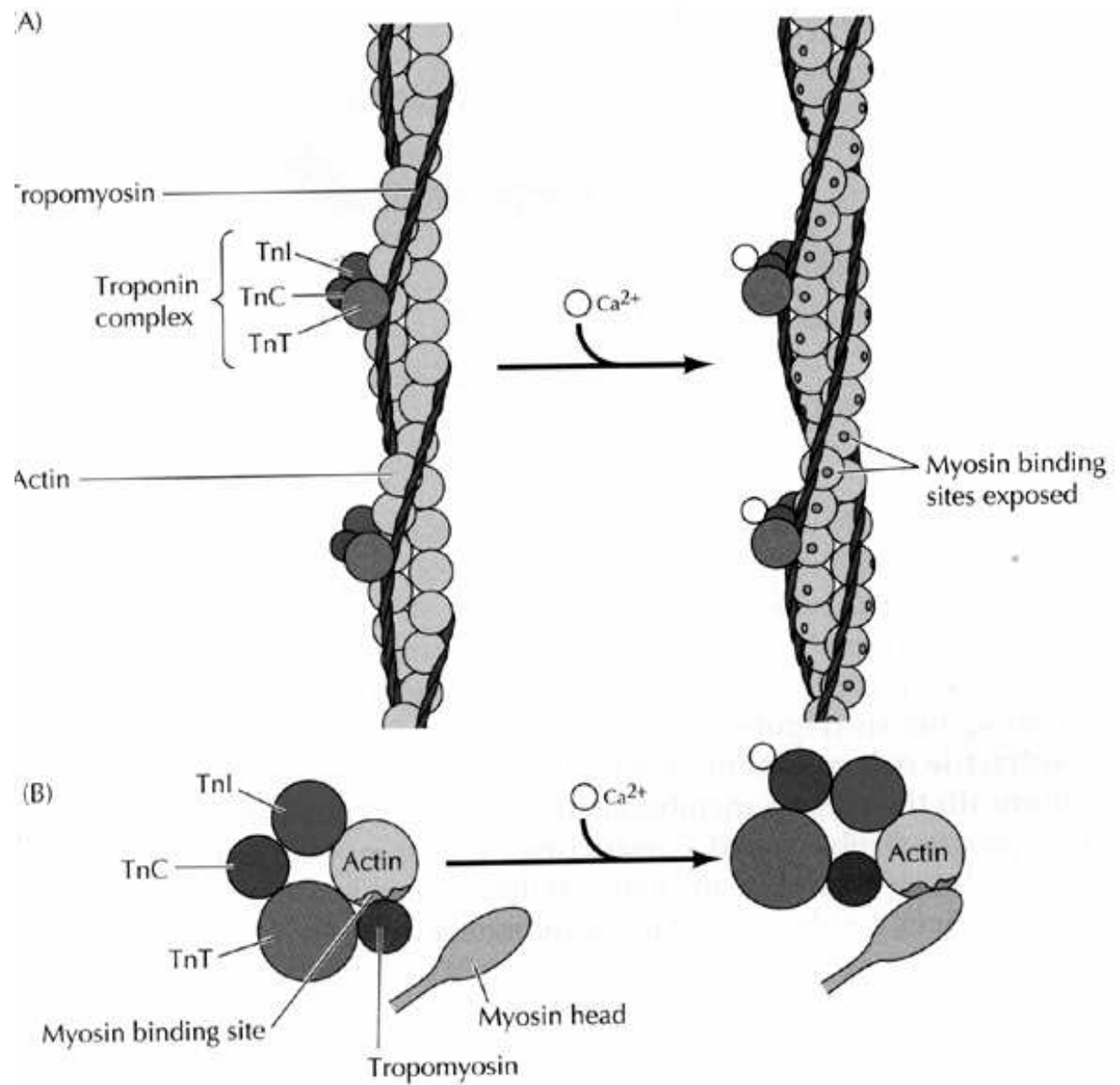
# Struktura molekuly myosinu



# Tenké filamenty

- složeny z podjednotek **G-aktinu**, které polymerují do podoby vzájemně se ovíjejících F-aktinových filament
- uspořádány v charakteristické poloze vzhledem k tlustým filamentům
- funkční propojení s tlustými filamenty zajišťují **tropomyosin a troponiny**
- ukotvení a správnou vzájemnou orientaci tlustých a tenkých filament zajišťují **myomesin a  $\alpha$ -aktinin**

# Struktura tenkých filament



# **Aktinová vlákna jsou tenká a pružná**

- každé aktinové vlákno představuje stočený řetězec, sestávající ze stejných globulárních molekul aktinu
- aktinová vlákna mají strukturní polaritu: rozlišujeme plus- a minus-konce
- obvykle se aktinová vlákna sdružují do silnějších svazků a sítí



# Mechanismus polymerace aktinu a tubulinu je obdobný

- aktinová vlákna rostou přidáváním aktinových monomerů na obou koncích
- větší rychlost růstu na plus-konci vlákna
- každý volný monomer aktinu nese navázaný ATP
- hydrolýza ATP na ADP nastává krátce po zapojení monomeru do aktinového vlákna a způsobí snížení vazby mezi monomery
- schopnost vláken se rozkládat a skládat je nutná pro mnoho funkcí aktinových vláken (např. při pohybu buňky)

# Důsledky poškození aktinových vláken

Např. toxiny některých hub:

- cytochalasiny znemožňují polymeraci aktinu
- faloidin stabilizuje aktinová vlákna a znemožňuje jejich depolymeraci

Důsledky přidání cytochalasinů/faloidinu buňkám:

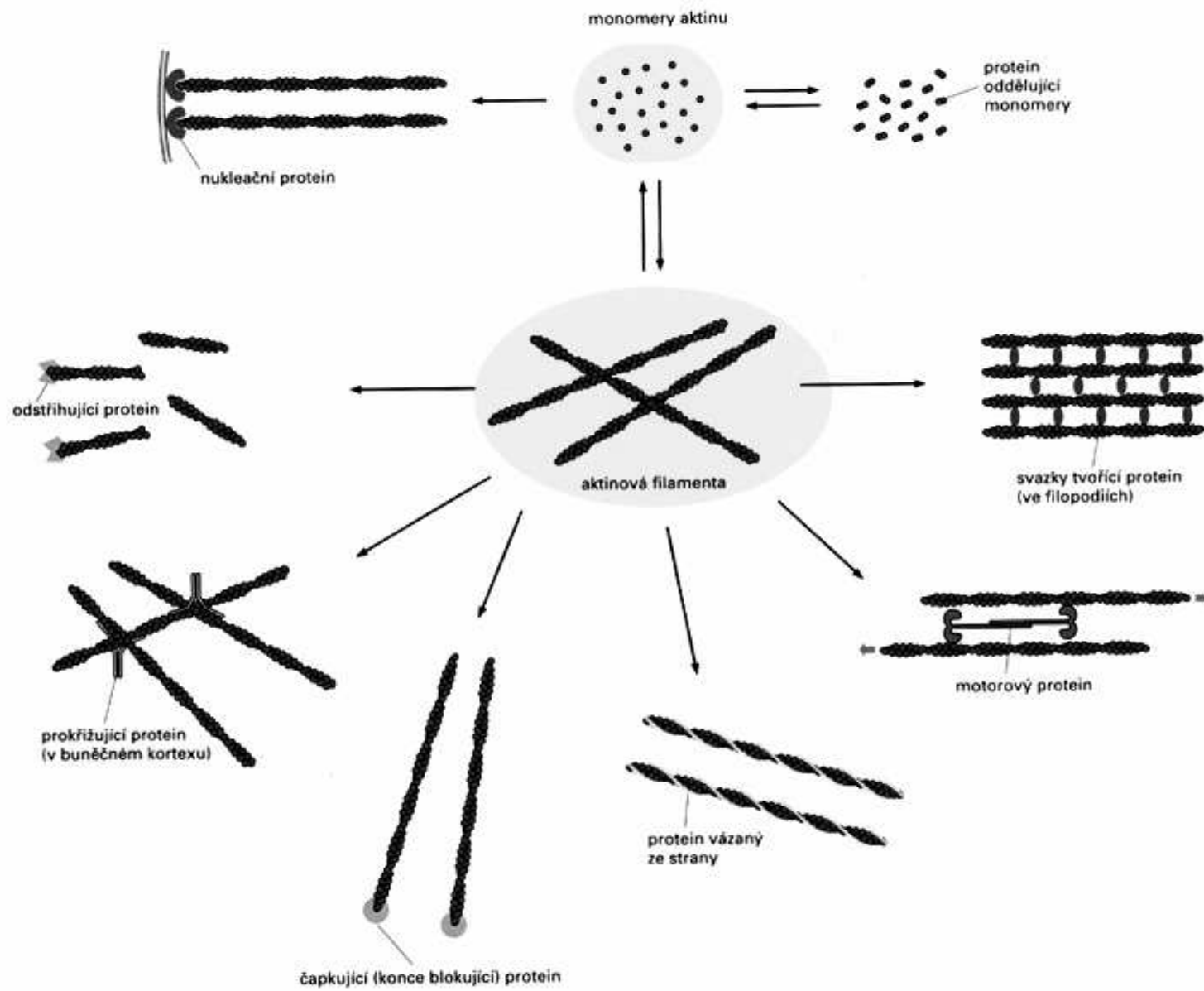
- okamžité zmrazení buněčných pohybů

# Řada proteinů se váže k aktinu a mění jeho vlastnosti

Např. thymosin a profilin:

- vážou se k monomerům aktinu a tím jim zabraňují vázat se na konce vláken - udržování rezervy monomerů - účast v regulaci polymerace aktinu

Další proteiny interagují s vlákny a podílejí se na tvorbě jejich svazků a sítí



# **Aktin se podílí na tvorbě buněčného kortexu**

## Buněčný kortex:

- síť aktinových vláken lokalizované ve vrstvě cytoplazmy těsně pod plazmatickou membránou
- zpevňuje povrch buňky a dodává mu mechanickou odolnost
- podíl na změnách tvaru buněk a jejich pohybu

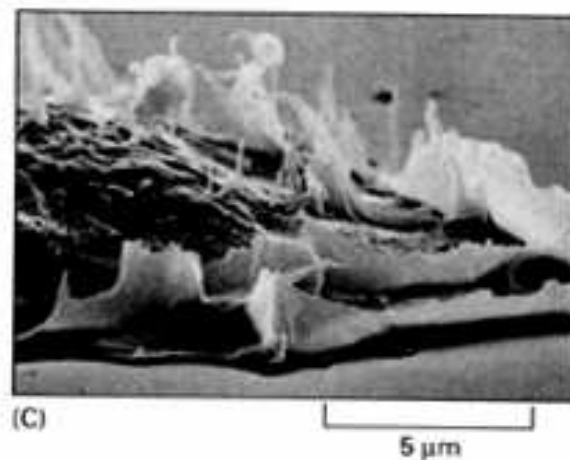
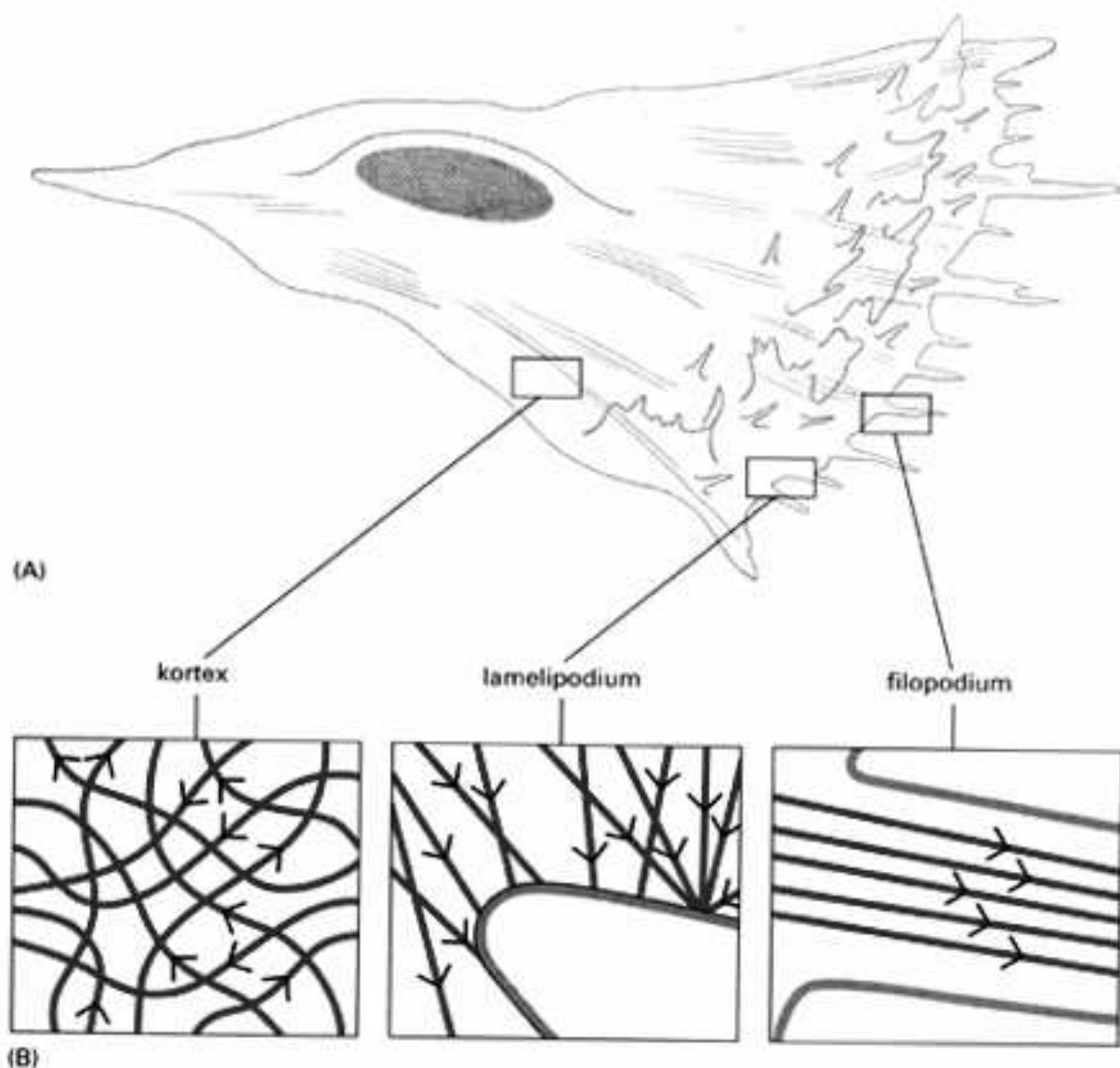
# Pohyb buňky závisí na aktinu

- malá část buněk se pohybuje za pomoci řasinek a bičíků
- většina buněk se posunuje po povrchu podložky: koordinované změny mnoha molekul v různých zónách buňky:
  - a) buňka vysunuje výběžky na „přední straně“
  - b) výběžky přilnou k povrchu, po němž se buňka posunuje
  - c) zbytek buňky se tahem za toto ukotvení přitáhne dopředu

Aktin je potřebný pro všechny tři procesy.

## **Vysunování výběžků je poháněno polymerizací aktinu**

- vedoucí okraj vysouvá tenká listovitá lamelipodia (obsahují hustou síť aktinových vláken)
- mnohé buňky vysouvají tenké, pevné výběžky - filopodia (obsahují svazky 10-20 aktinových vláken)
- lamelipodia a filopodia jsou průzkumné jednotky, rychle se vysouvají a zasouvají, hledají cílové struktury
- vznikají rychlým růstem aktinových vláken pod plazmatickou membránou



Obrázek 16-28. Aktinová vlákna v pohybující se živočišné buňce. (A) Schematické zobrazení fibroblastu s plochými lamelipodii a jemnými filopodii, jež se na buněčném povrchu nacházejí zejména v oblasti vedoucího okraje. (B) Detail uspořádání aktinových vláken ve třech různých oblastech fibroblastu; šípky ukazují k plus-koncům vláken. (C) Snímek pořízený rádkovacím elektronovým mikroskopem ukazuje lamelipodia a filopodia na vedoucím okraji lidského fibroblastu během jeho pohybu v buněčné kultuře.



# Přilnutí buněk k substrátu

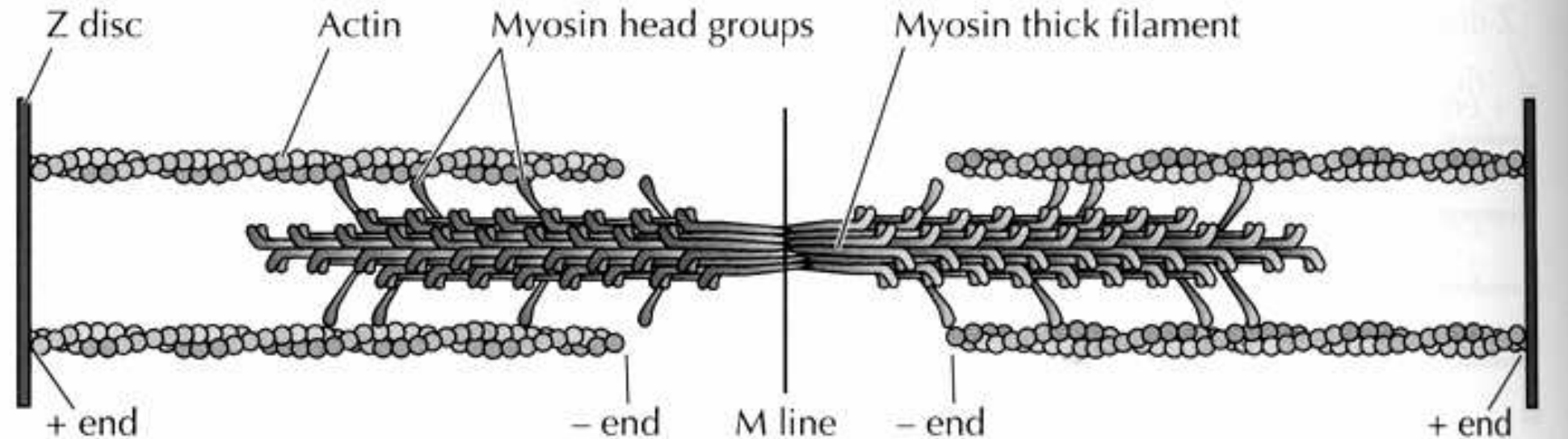
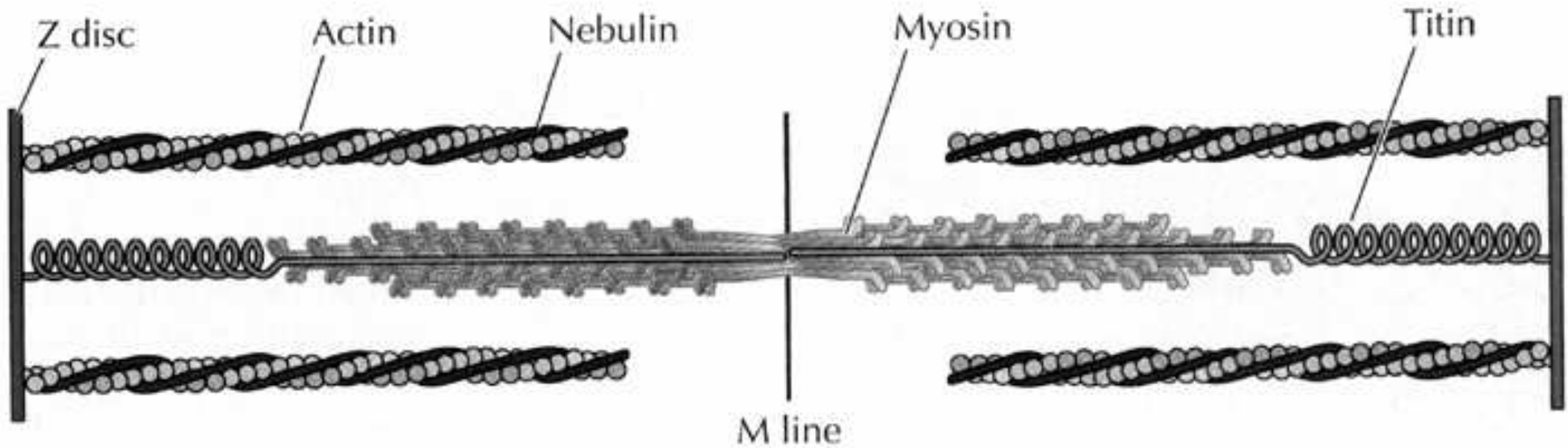
Dotyk výběžků k příhodnému substrátu indukuje:

- adherenci integrinů k molekulám matrix nebo k povrchu jiné buňky
- zachycení aktinových vláken na vnitřní straně plazm. membrány na integriny - vzniká kotvicí systém

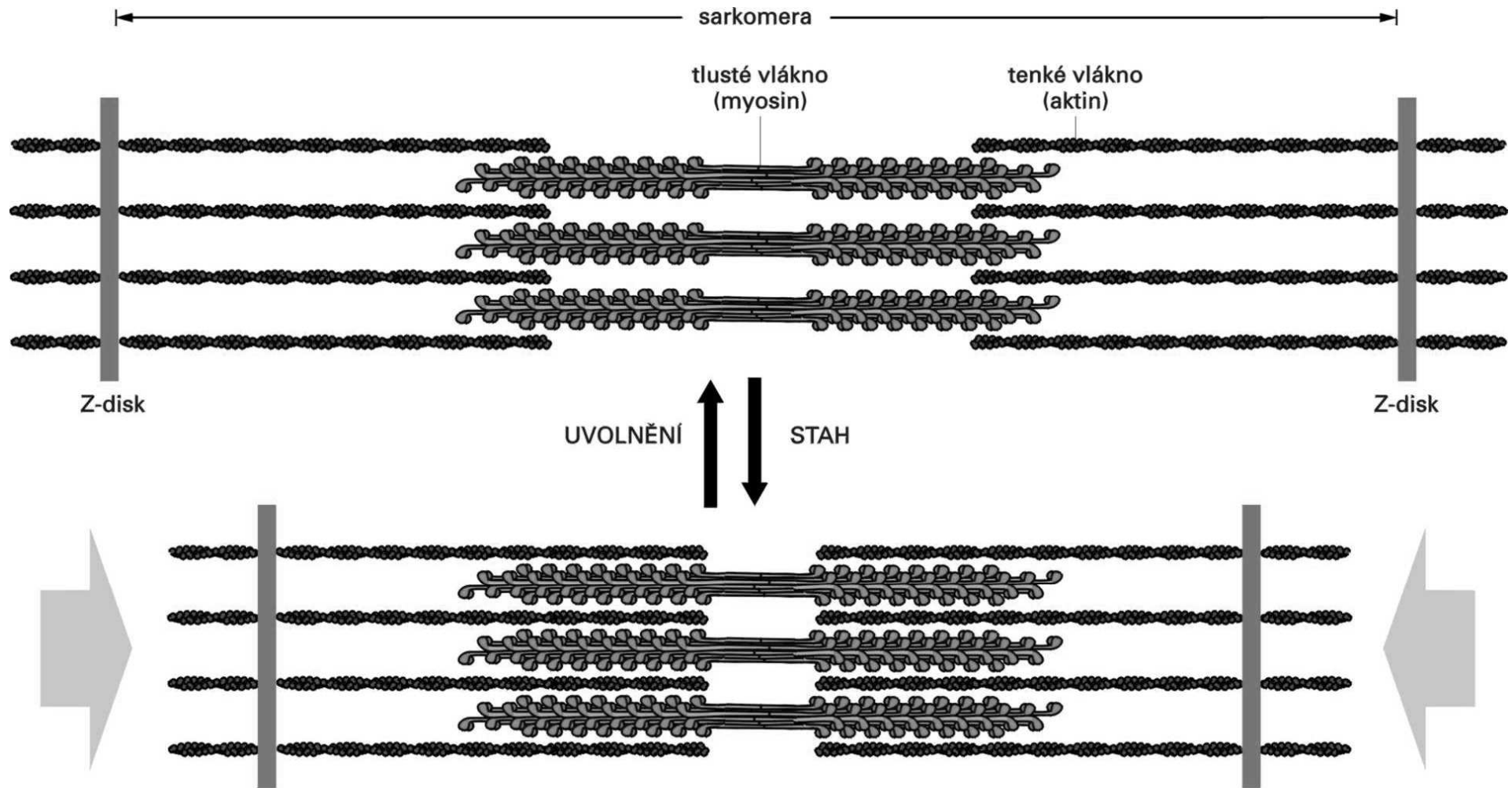
# Posun buňky

- vnitřní kontrakce přitáhne zadní část buňky
- využití opory kotvícího systému
- nutná koordinace činnosti aktinových a myosinových vláken

## Vzájemné uspořádání tlustých a tenkých filament



# Model posunujících se vláken vysvětluje svalový stah



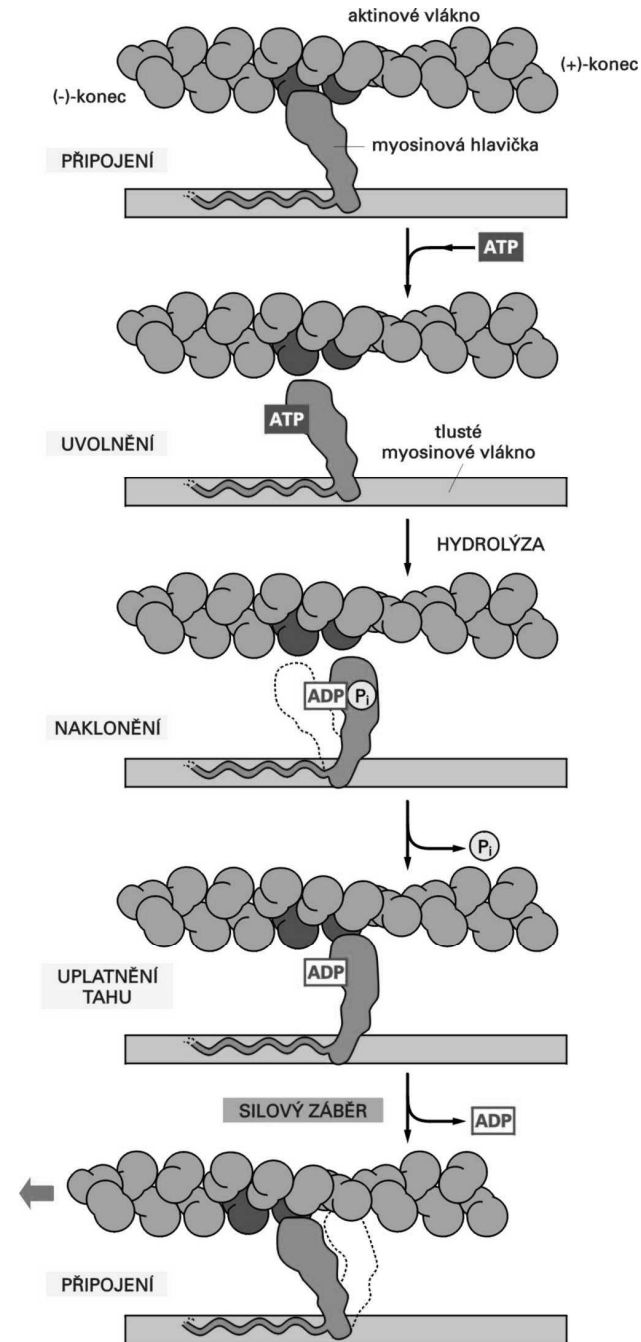
# Svalová buňka

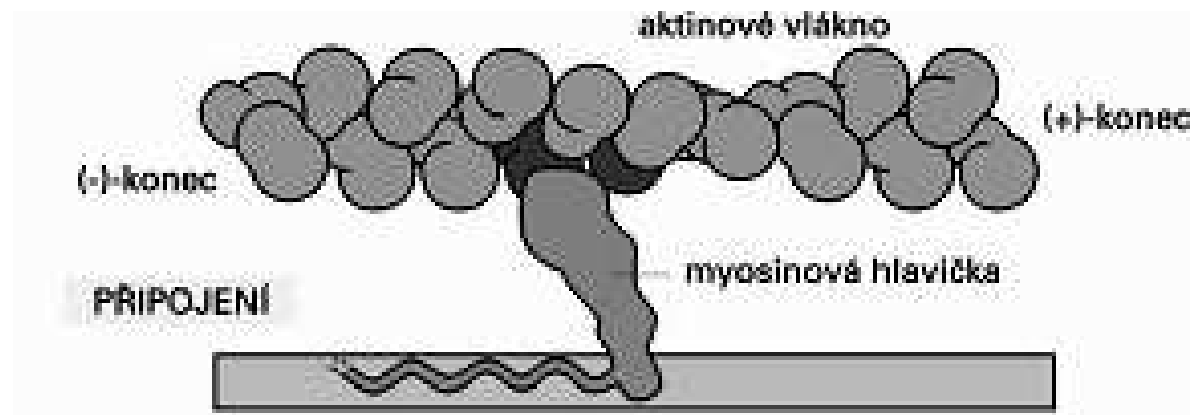
- dlouhé mnohojaderné vlákno
- vzniká fúzí jednojaderných myogenních buněk během embryonálního vývoje
- obklopena proteiny příbuznými kolagenu – ukotvení do buněčného cytoskeletonu
- inervována axony motorických neuronů

# Kontrakce

- Depolarizace plazmatické membrány  $\Rightarrow$  prostřednictvím membrán a tubulů T přenos depolarizace na membránu **sarkoplazmatického retikula**  $\Rightarrow$  uvolnění **vápníku** do myofibrilárních prostor  $\Rightarrow$  ionty  $\text{Ca}^{2+}$  se vážou na **troponin C**
- Troponin C se v pravidelných intervalech váže prostřednictvím **troponinu T** na **tropomyosin**
- po vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  na troponin C  $\Rightarrow$  konformační změna **troponinu I**
- troponin I za nepřítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  zabraňuje interakcím aktinu s myosinem
- za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  nastává interakce mezi hlavicemi Mhc a aktinem  $\Rightarrow$  za současné hydrolýzy ATP dochází k **posunu tenkých filament podél filament tlustých**
- relaxace nastává po uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z troponinu C a jeho transportu zpět do sarkoplazmatického retikula  $\Rightarrow$  opětá inhibice interakce aktin-myosin

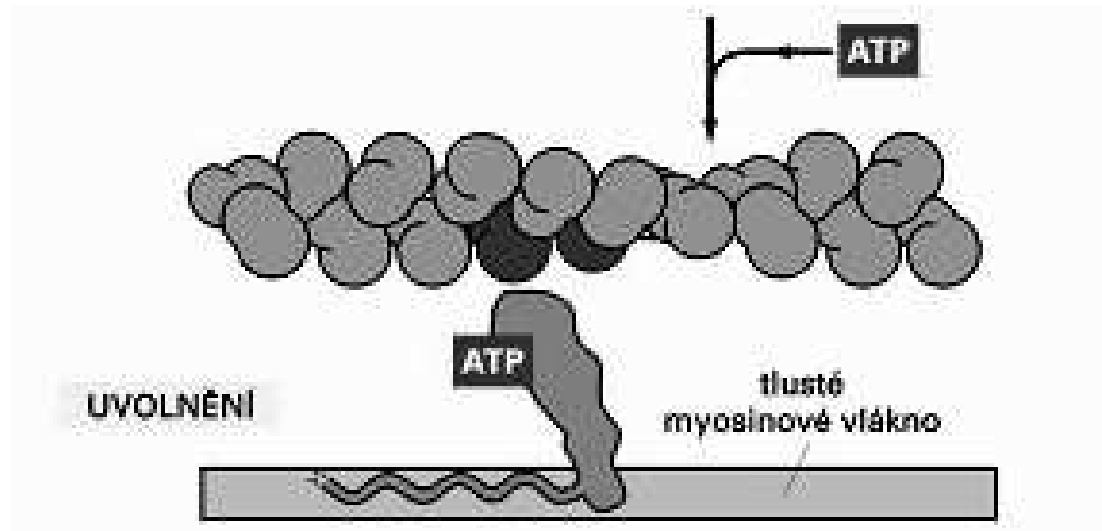
# Cyklus změn, pomocí nichž dochází ke „kráčení“ molekul myosinu podél aktinového vlákna



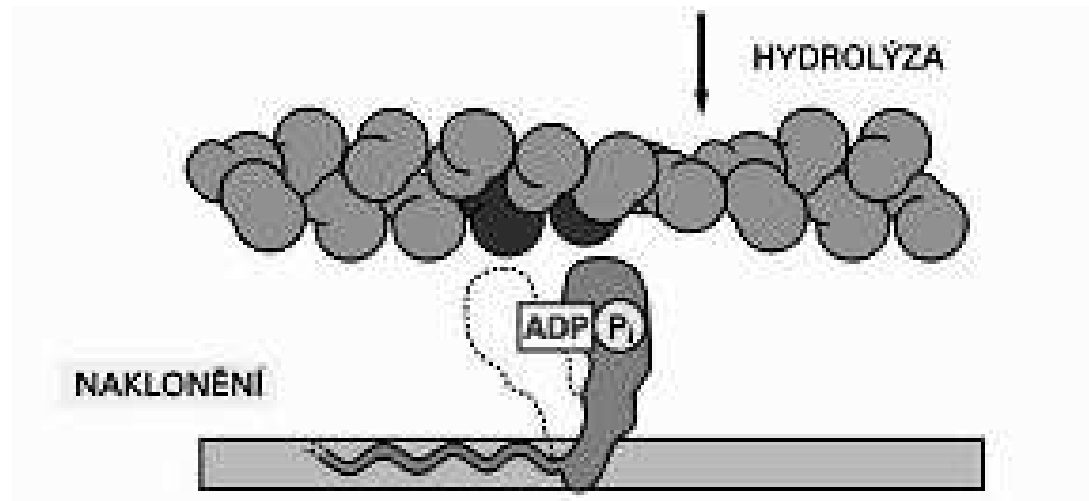


- myosinová hlavička je bez navázaného nukleotidu pevně spojena s aktinovým vláknem v tzv, rigorové konfiguraci (příčina *rigor mortis*)
- v aktivně pracujícím svalu je tato fáze velmi krátká
- fáze končí navázáním ATP

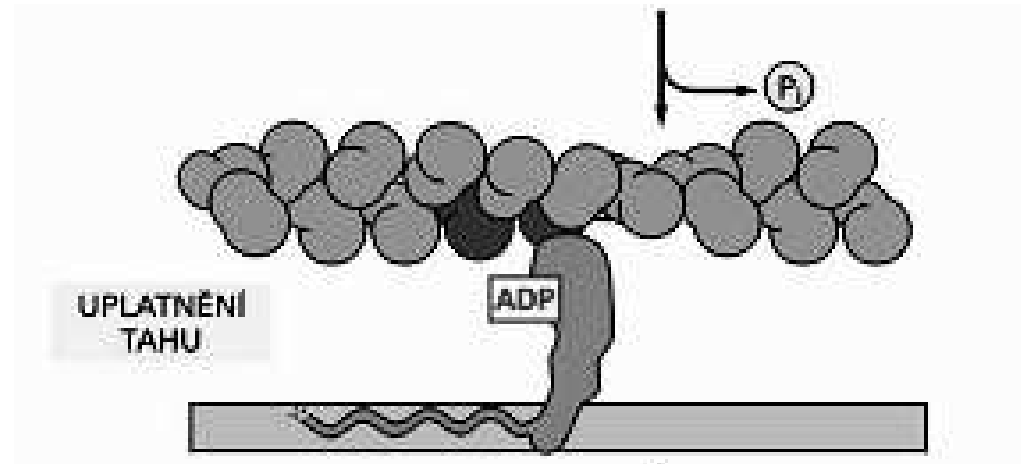




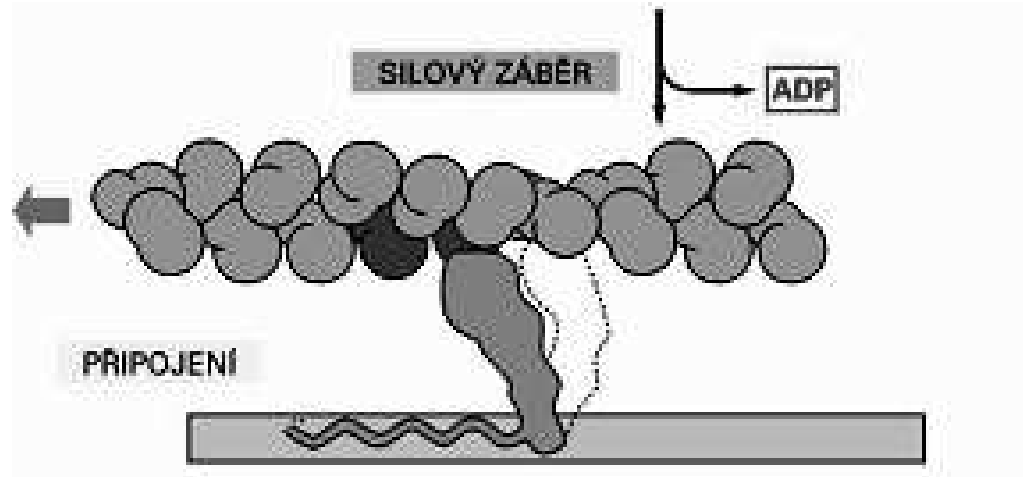
- molekula ATP se váže k velkému zářezu na „zadní“ straně hlavičky
- změna v konformaci domén, které tvoří aktin-vázací místo
- snížení afinity hlavičky vůči aktinu, umožnění pohybu podél vlákna



- hydrolyza ATP
- vznikající ADP a Pi zůstávají vázány k proteinu
- hlavička se posunuje podél vlákna o přibližně 5 nm

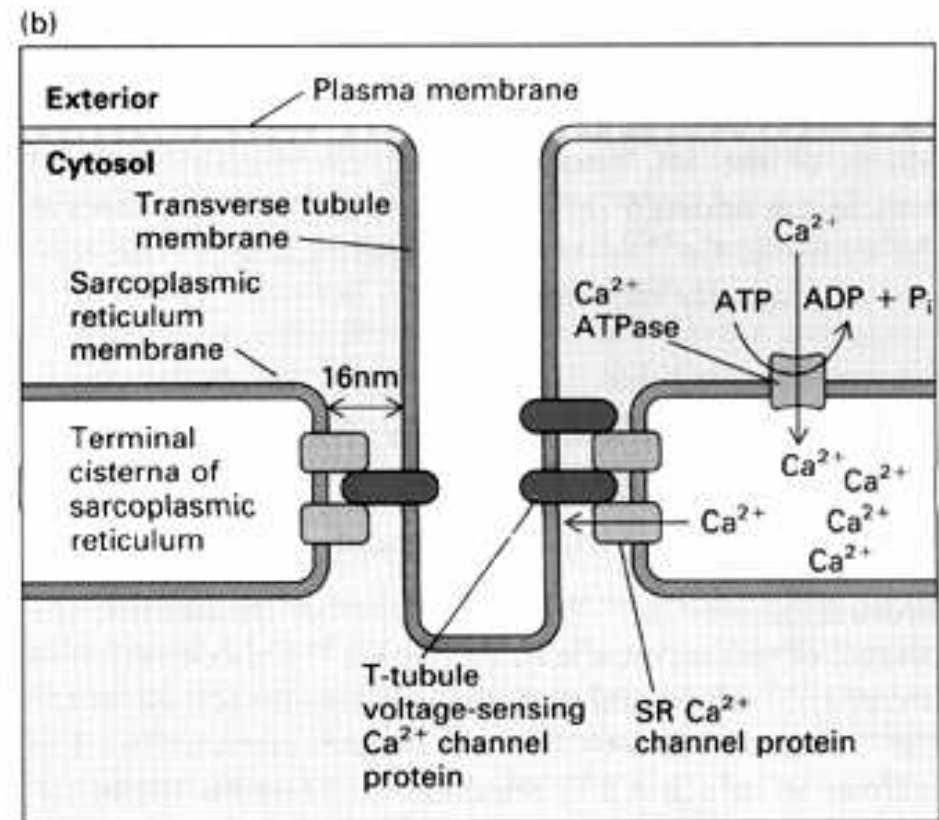
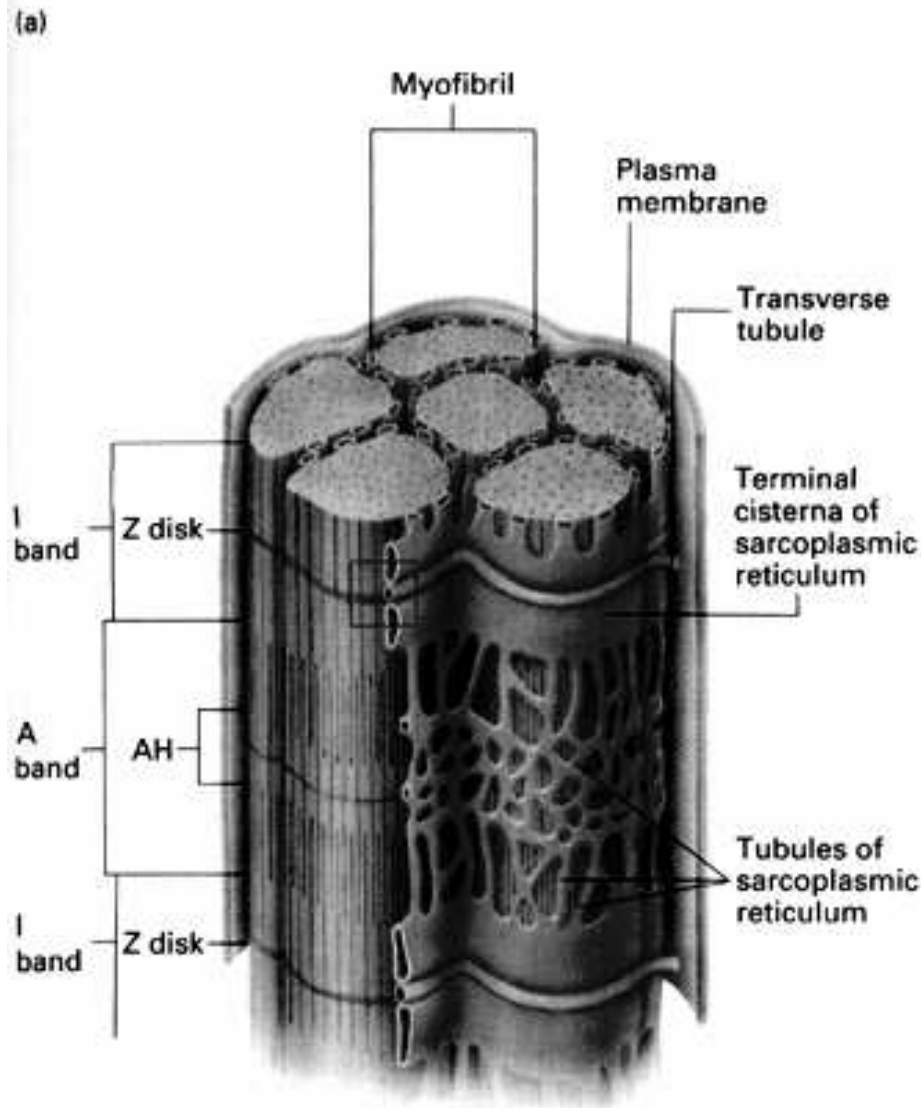


- slabá vazba hlavičky myosinu k novému místu na aktinovém vlákně způsobí uvolnění anorganického fosfátu
- následuje pevné uchycení hlavičky na aktinové vlákno
- „silový záběr“: změna tvaru molekuly, kterou hlavička myosinu získává původní konformaci
- během silového záběru ztrácí hlavička navázaný ADP

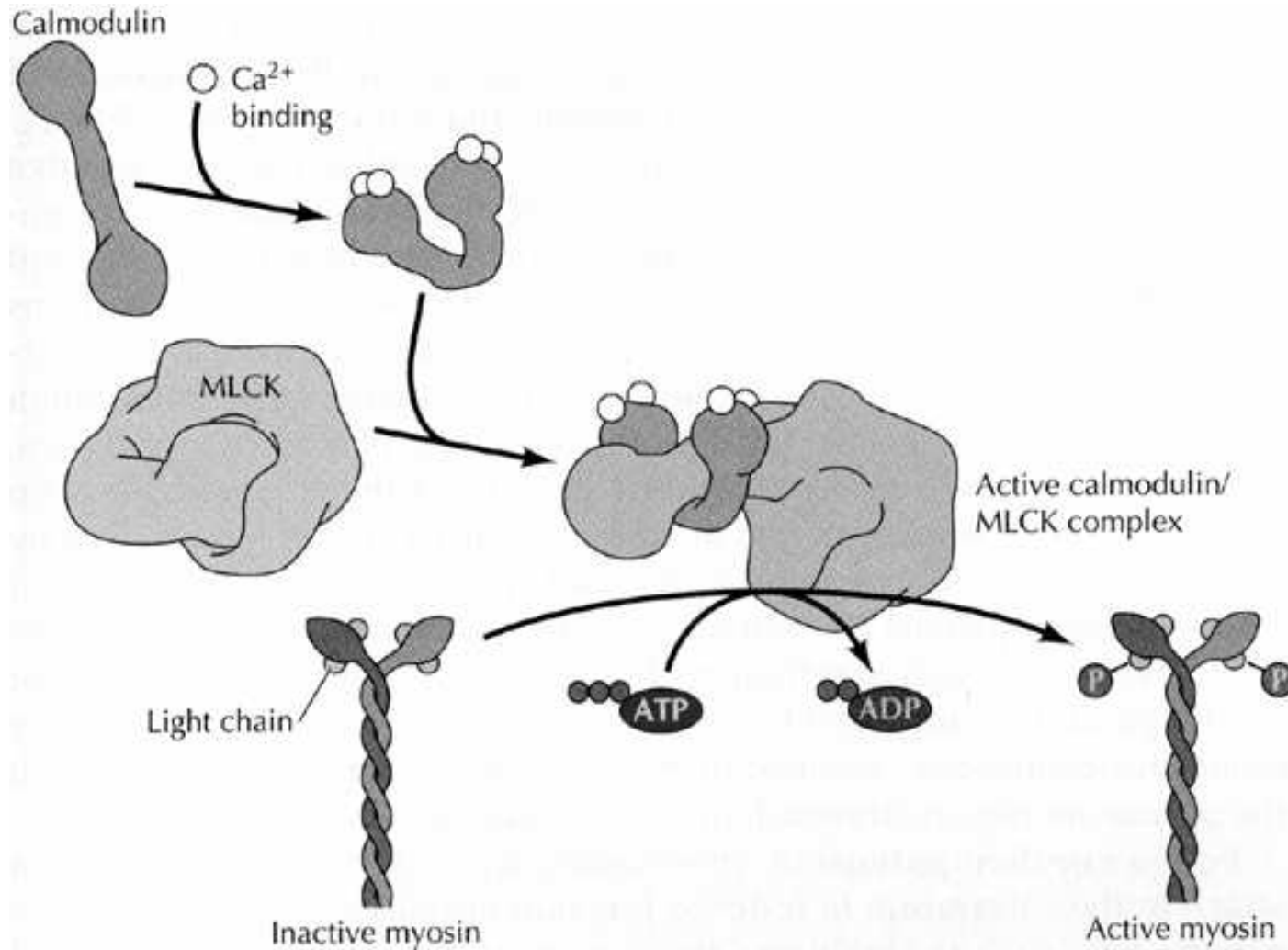


- myosinová hlavička je opět v těsném spojení s aktinovým vláknem, ale posunula se do nové polohy

# Kontrakci svalu spouští uvolnění $\text{Ca}^{2+}$ ze sarkoplazmatického retikula



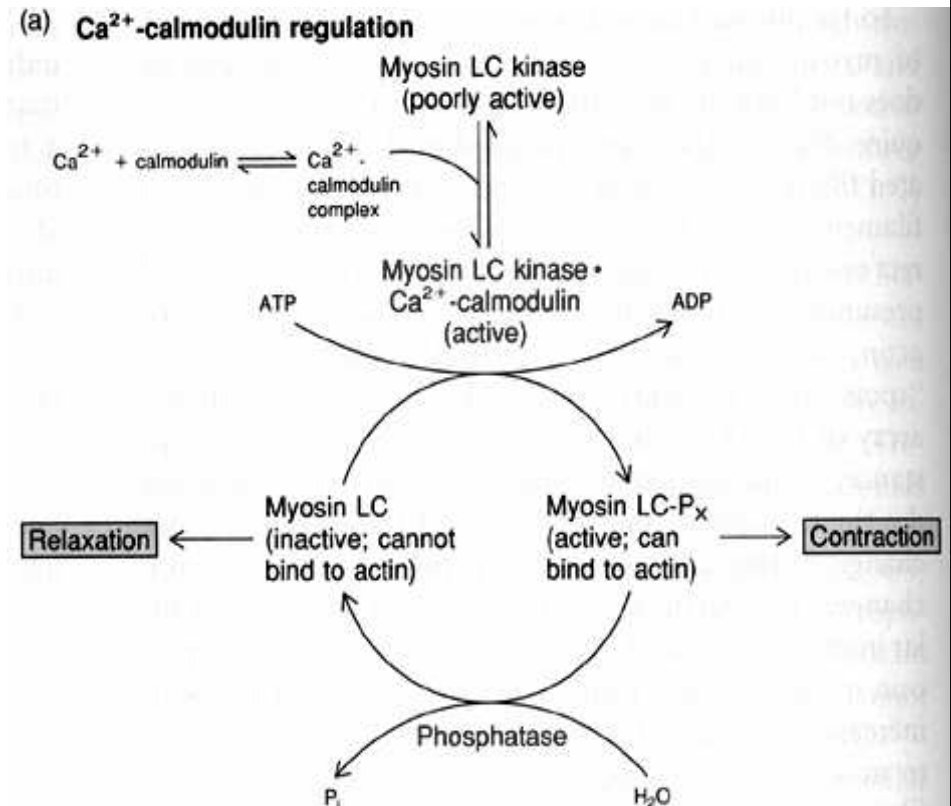
# Regulace myosinu fosforylací



# Mechanismy regulace kontrakce a relaxace u hladkého svalstva obratlovců

## A: regulace vápenatými ionty

1.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin aktivuje MLCK
2. MLCK fosoryluje MLC v místě X
3. Fosorylovaný MLC indukuje kontrakci svalu

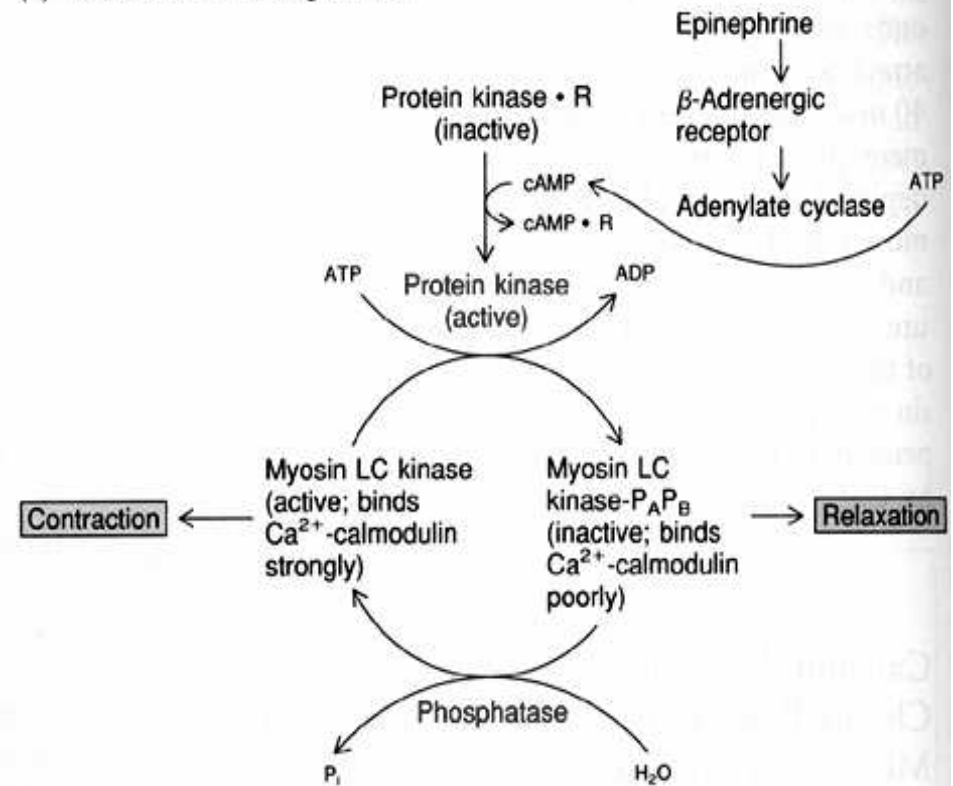


# Mechanismy regulace kontrakce a relaxace u hladkého svalstva obratlovců

## B: regulace cAMP

1. Vazba adrenalinu k  $\beta$ -adrenergnímu receptoru
2. Aktivace c-AMP dependentní PK
3. PKA fosforyluje MLCK v místech A, B
4. Tato úprava MLCK způsobuje oslabení vazby  $\text{Ca}^{2+}$ /kaldmodulinu
5. MLC není fosforylován
6. Uvolnění svalu

(b) cAMP-mediated regulation

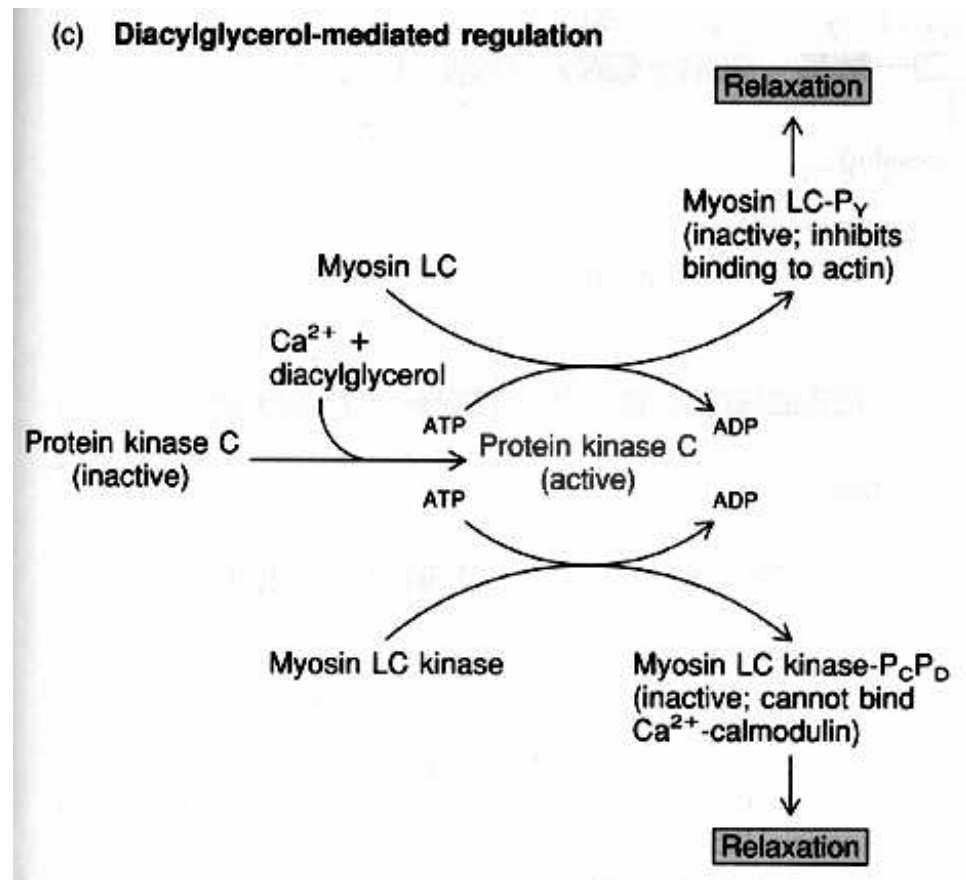




# Mechanismy regulace kontrakce a relaxace u hladkého svalstva obratlovců

## C: regulace diacylglycerolem

1. Diacylglycerol aktivuje PKC
2. PKC fosforyluje MLCK v místech C, D a myosinový lehký řetězec v místě Y.
3. Tyto úpravy cílové molekuly inaktivují
6. Uvolnění svalu

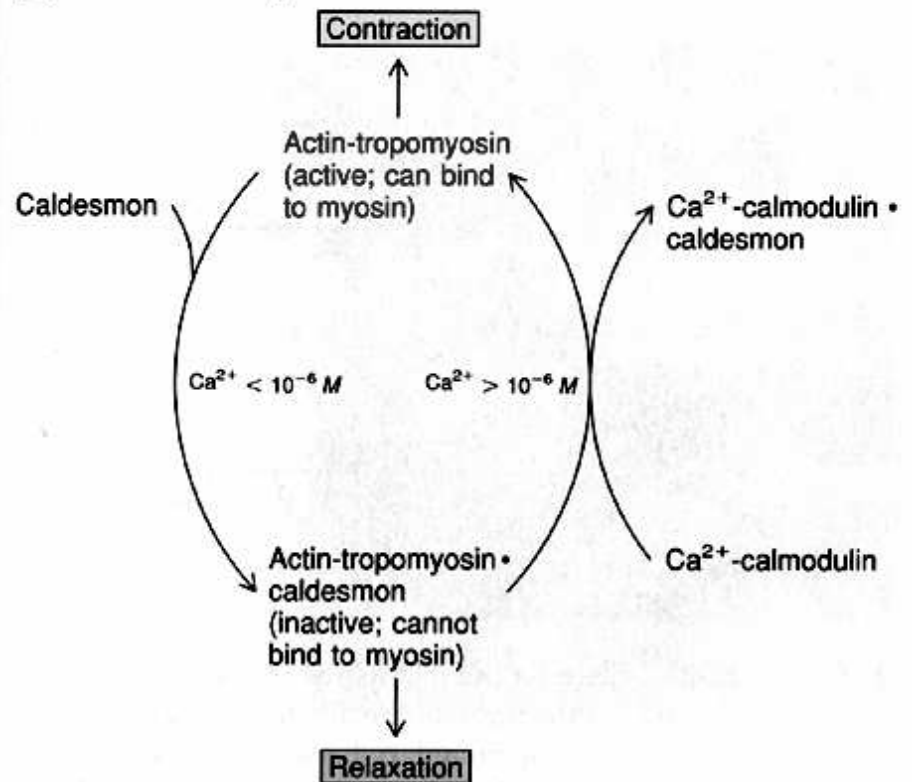


# Mechanismy regulace kontrakce a relaxace u hladkého svalstva obratlovců

## D: regulace kaldesmonem

1. Kaldesmon inhibuje interakce mezi aktinem a myosinem
2. Vazbou  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinu se kaldesmon inaktivuje
3. Interakce aktinu s myosinem
4. Kontrakce svalu

(d) Caldesmon regulation



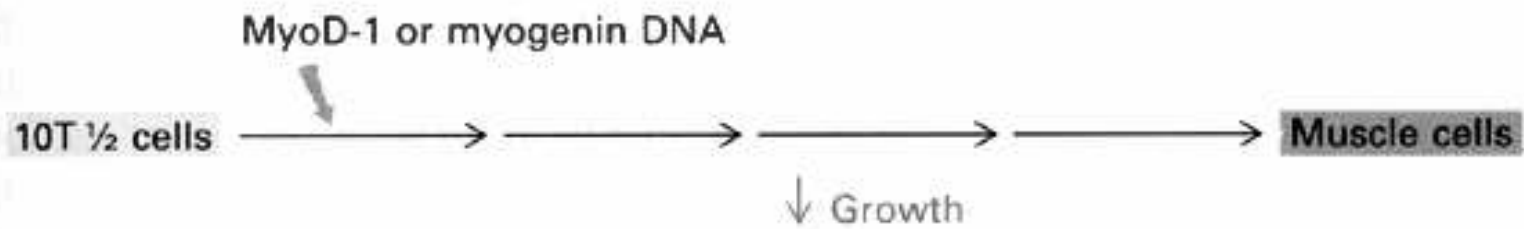
## Embryonická diferenciacie kosterného svalstva

- vlákna kosterného svalstva – produkt **fúze progenitorových myoblastů** (proto obsahují mnoho jader)
- **myoblasty** – lze pěstovat v kultuře, kde je fúzi možno navodit uměle
- diferenciacie a proliferace řízena např. TGF $\beta$  nebo FGF
- růstové faktory stimulují proliferaci
- snížení hladiny růstových faktorů indukuje zastavení růstu v G<sub>1</sub>, fúzi a diferenciaci
- diferenciacie je doprovázena aktivací transkripce souboru genů kódujících **kontraktilní proteiny** (aktin, myosin), **receptorové proteiny a proteiny iontových kanálů** b. **membrány** (pro nervovou stimulaci svalu)

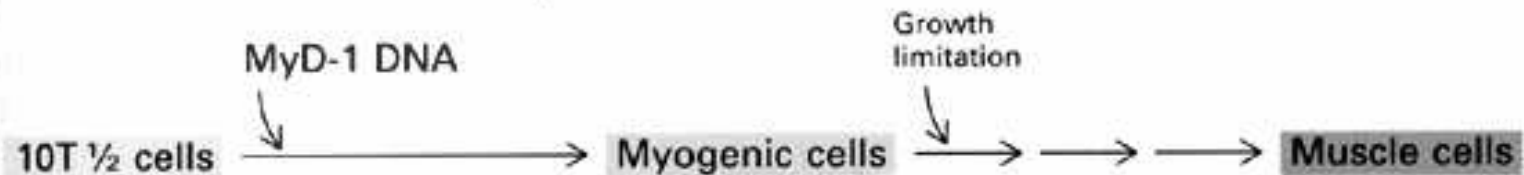
- exprese svalově-specifických genů nastává koordinovaně se začátkem fúze myoblastů
- geny kódující kontraktilní proteiny (např. těžký řetězec myosinu, aktin, receptor pro acetylcholin) mají ve svých promotorových oblastech typické **regulační elementy**
- svalově specifické regulační elementy jsou relativně malé (60-120 pb), mají společné sekvence a fungují jako **zesilovače transkripce** (enhancery)
- koordinaci transkripce genů pro kontraktilní proteiny zajišťují transkripční faktory (proteiny MyoD1, Myd, myogenin, Myf5 a MRF4)
- přenosem cDNA kódující MyoD do fibroblastů a indukci její exprese lze navodit fúzi fibroblastů a jejich přeměnu na buňky podobné buňkám svalovým (aktivace exprese endogenních genů MyoD1, myf5, genu pro myogenin)

# Diferenciace svalových buněk

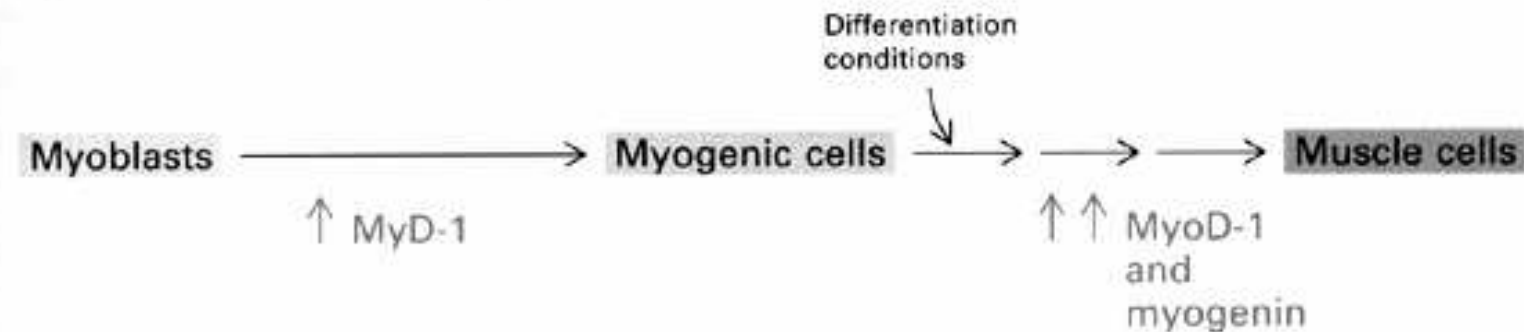
(a) Transformed with promoter-enhanced MyoD-1 myogenin DNA



(b) Transformed with normal MyD-1 DNA



(c) Normal muscle cell development and differentiation



# Struktura proteinů typu MyoD1

- výskyt u mnoha obratlovců i bezobratlých
- struktura zvaná “helix-loop-helix”:
  - oblast bazických aminokyselin – vazba na DNA, transaktivace
  - první  $\alpha$ -helikální doména
  - smyčka “loop” bez nápadné sekundární struktury
  - druhá  $\alpha$ -helikální doména – interakce s jinými proteiny HLH (např. proteinem Id, E2)
- vážou se na sekvenční motiv CANNTG
- zastavují dělení myoblastů, indukují diferenciaci při nedostatku růstových faktorů