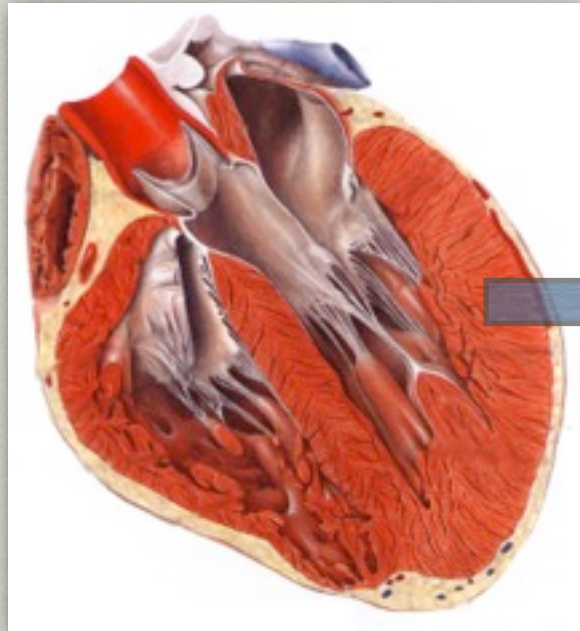


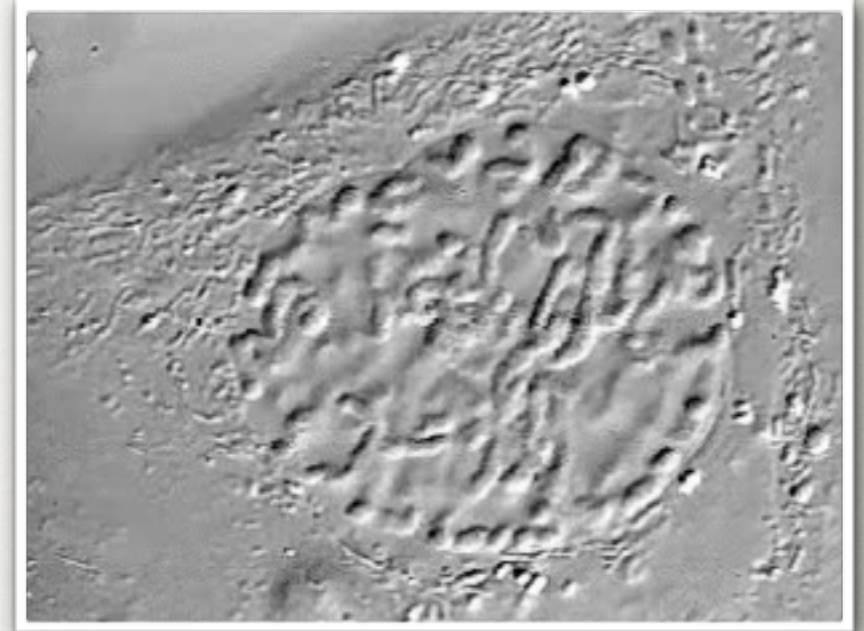
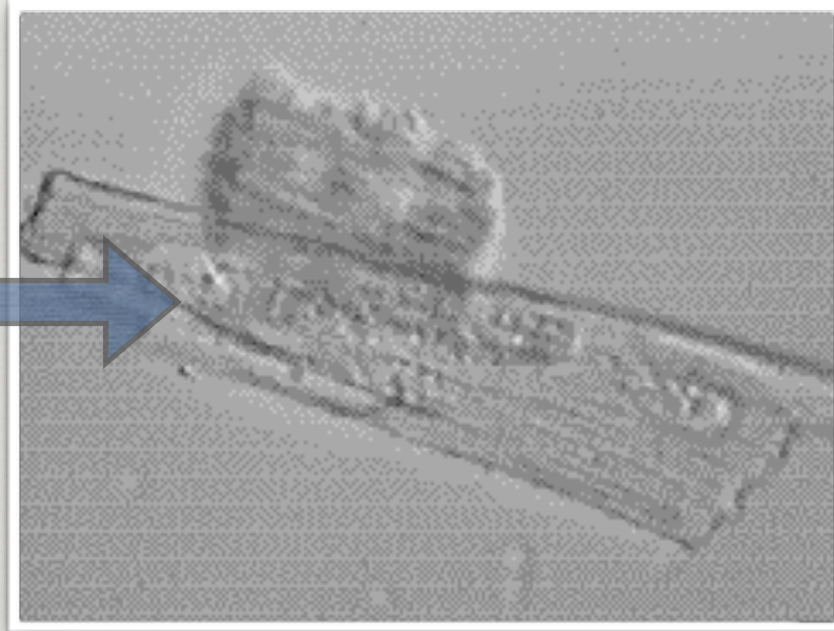
DINAMIKUS FEHÉRJERENDSZEREK A SEJT BEN

KELLERMAYER MIKLÓS

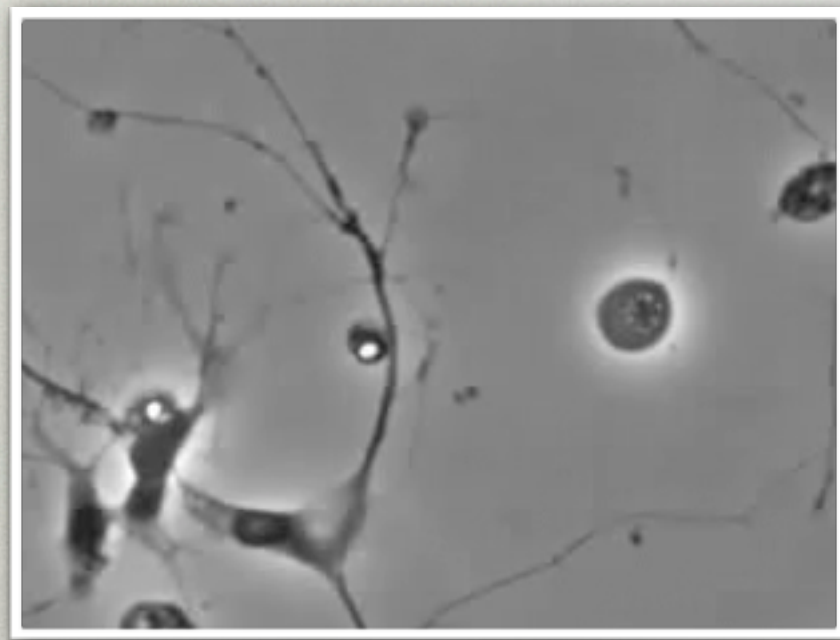
Biológiai mozgások



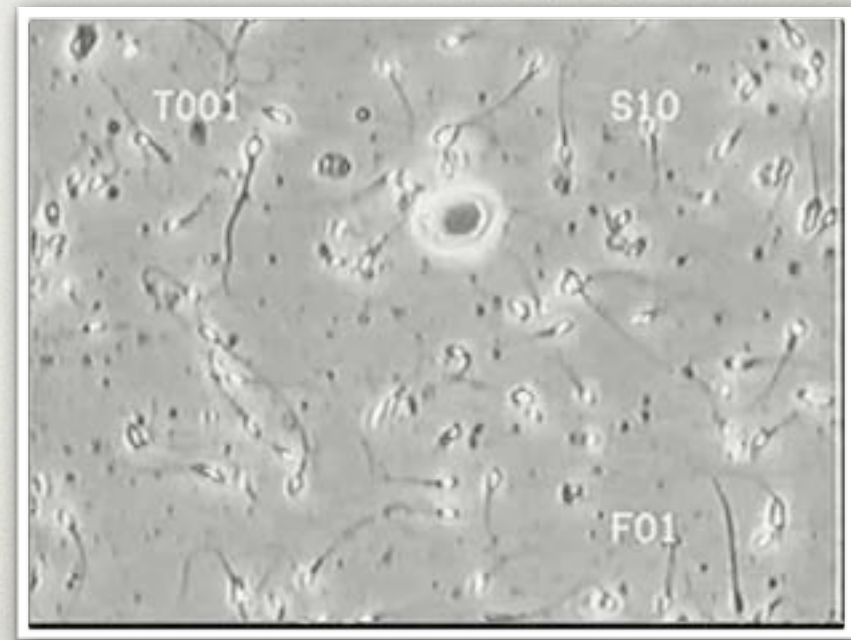
Ritmusosan összehúzódó szívizomsejt



Osztódó sejt

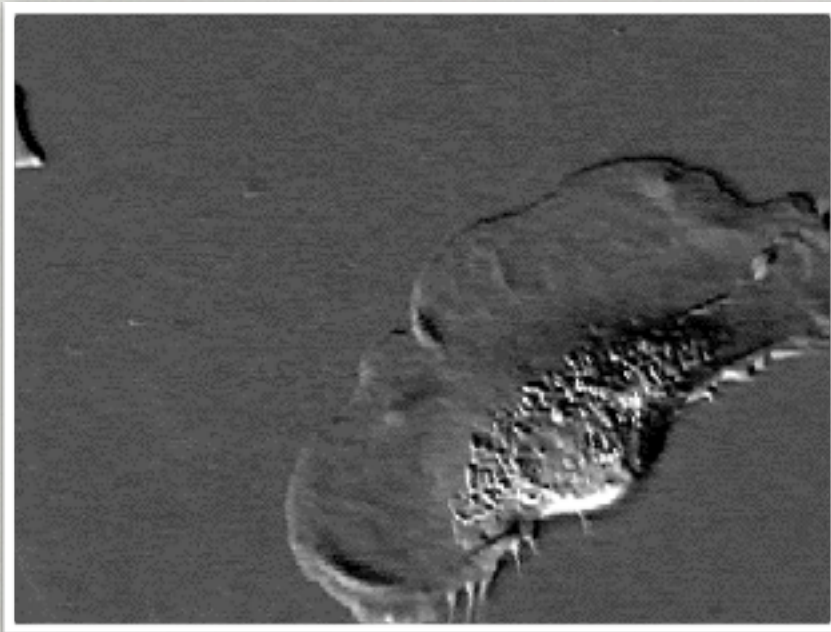


Axon (neurit) növekedés

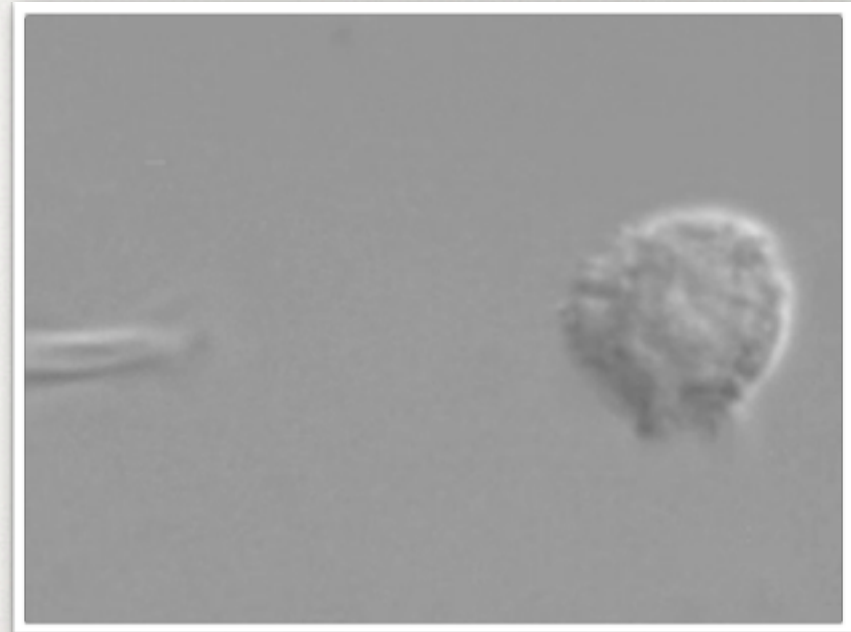


Mozgó spermatoцитák

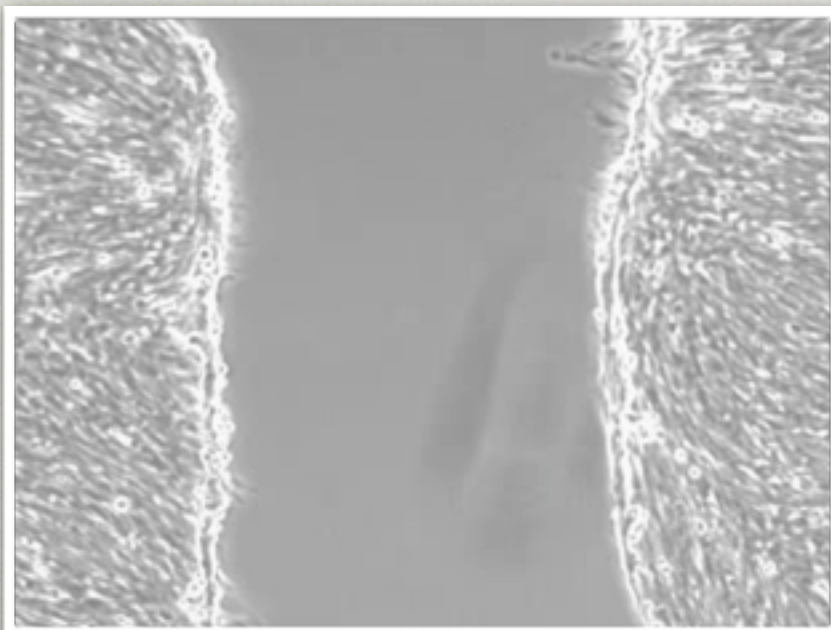
BIOLOGIAI MOZGÁSOK



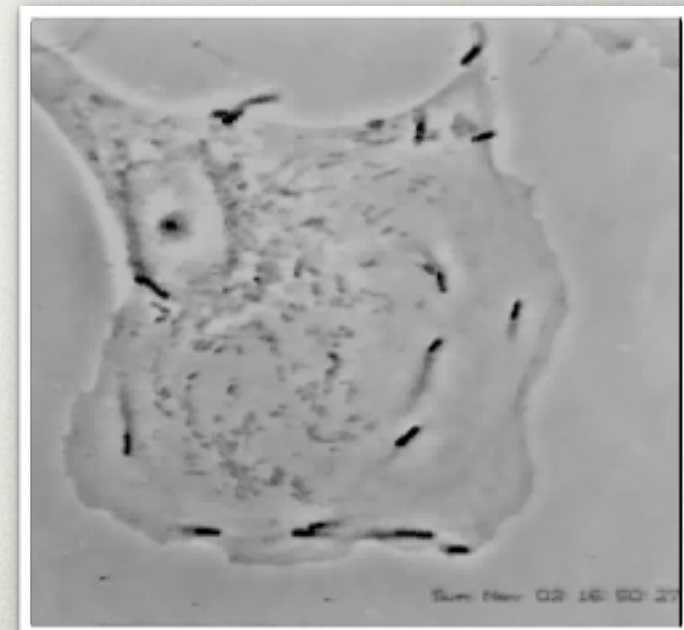
Tovakúszó keratinocita



Kemotaxis



Sebgyógyulás modell - fibroblasztok
kollektív mozgása



Listeria baktériumok
intracelluláris mozgása

A citoszkeletális rendszer

Intracelluláris dinamikus fehérje vázrendszer

Három fő filamentum-osztály:

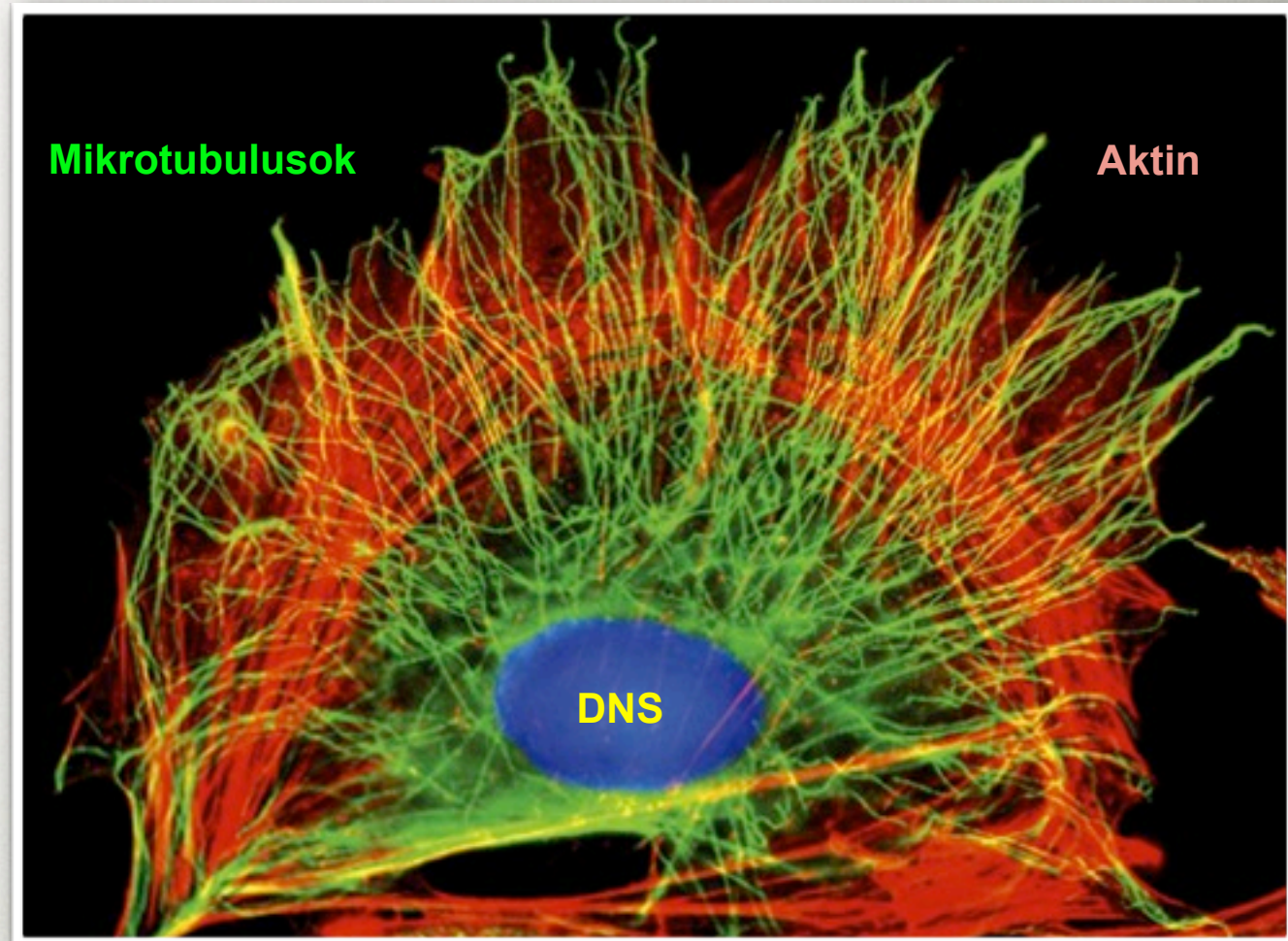
- A. Vékony (aktin)
- B. Intermedier
- C. Mikrotubulus

Filamentumok mechanikája fontos

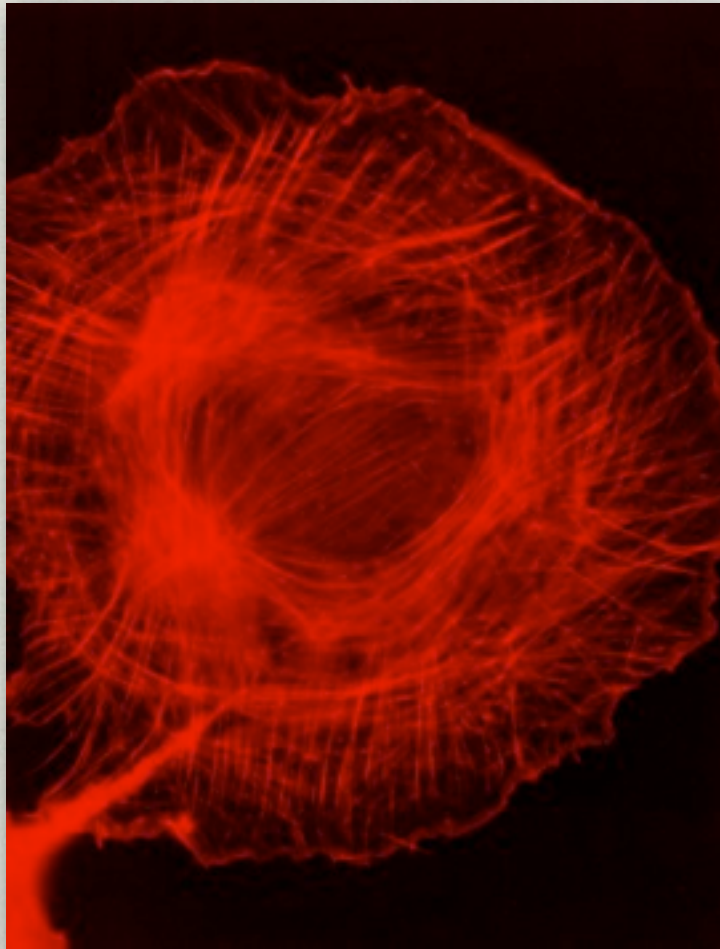
Polimerizáció: “okos téglá” alegységekből

Szerep:

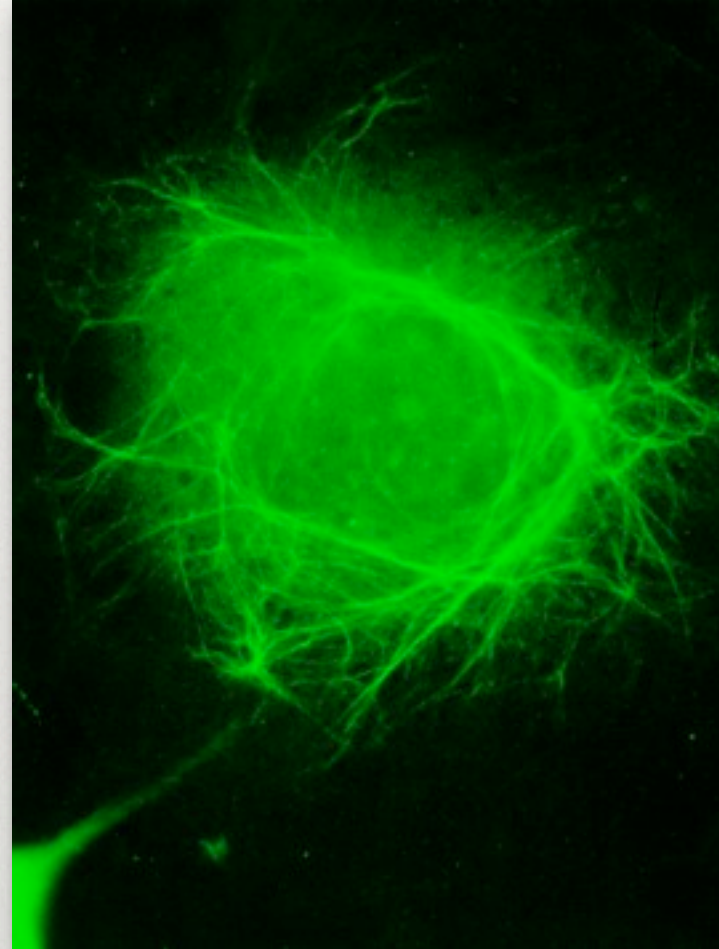
- A. Mozgás, alakváltozás
- B. Sejtosztódás
- C. Intracelluláris transzport



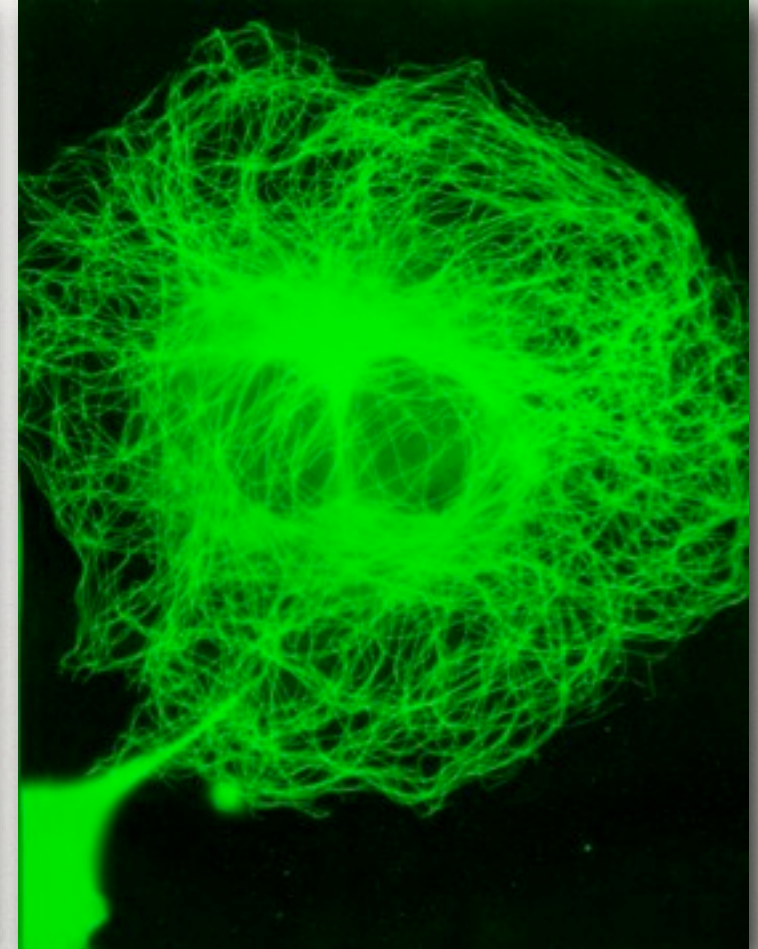
A citoszkeletális rendszer



Aktin
(rodamin-phalloidin)



Vimentin
(anti-vimentin)



Mikrotubulusok
(GFP-tubulin)

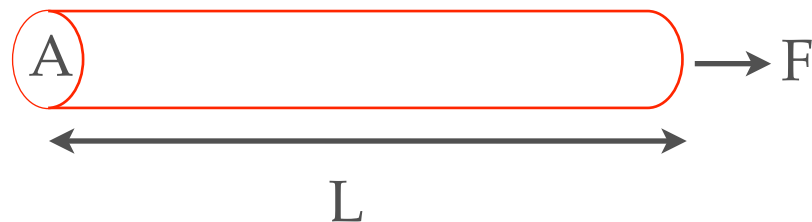
1. Mechanika
2. Polimerizáció

A citoszkeletális filamentumok rugalmassága

Hook-féle rugalmasság

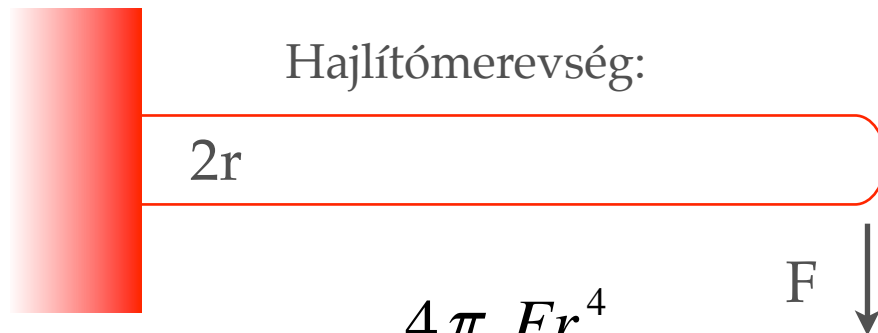
- A rugó- (vagy merevségi) állandó ($k=F/\Delta L$) nem anyagfüggő paraméter.
- A rugóállandó (k) függ a test alakjaitól, az erő irányától,
- és azt mutatja meg, hogy egységnyi megnyúlást mekkora erő idéz elő.

Longitudinális merevség:



$$\kappa = \frac{F}{\Delta L} = \frac{EA}{L}$$

Hajlítómerevség:



$$\kappa = \frac{4\pi}{3} \frac{Er^4}{L^3}$$

“Termikus” rugalmasság

A polimerlánc átlagos alakja leírható egyszerű paraméterek segítségével:

$$\langle R^2 \rangle = 2L_p L$$

A perzisztenciahossz a lánc hajlítómerevségével áll összefüggésben:

minél rövidebb L_p , annál hajlékonyabb a lánc, és megfordítva.

$$L_p = \frac{EI}{k_B T}$$

EI = hajlítómerevség

E = Young modulus

I = hajlítási tehetetlenségi nyomaték

(körkeresztmetszetű rúd esetében $I = r^4 \pi / 4$)

k_B = Boltzmann állandó

T = abszolút hőmérséklet.

Merev lánc

$$l \gg L$$



Szemiflexibilis lánc

$$l \sim L$$



Flexibilis lánc

$$l \ll L$$

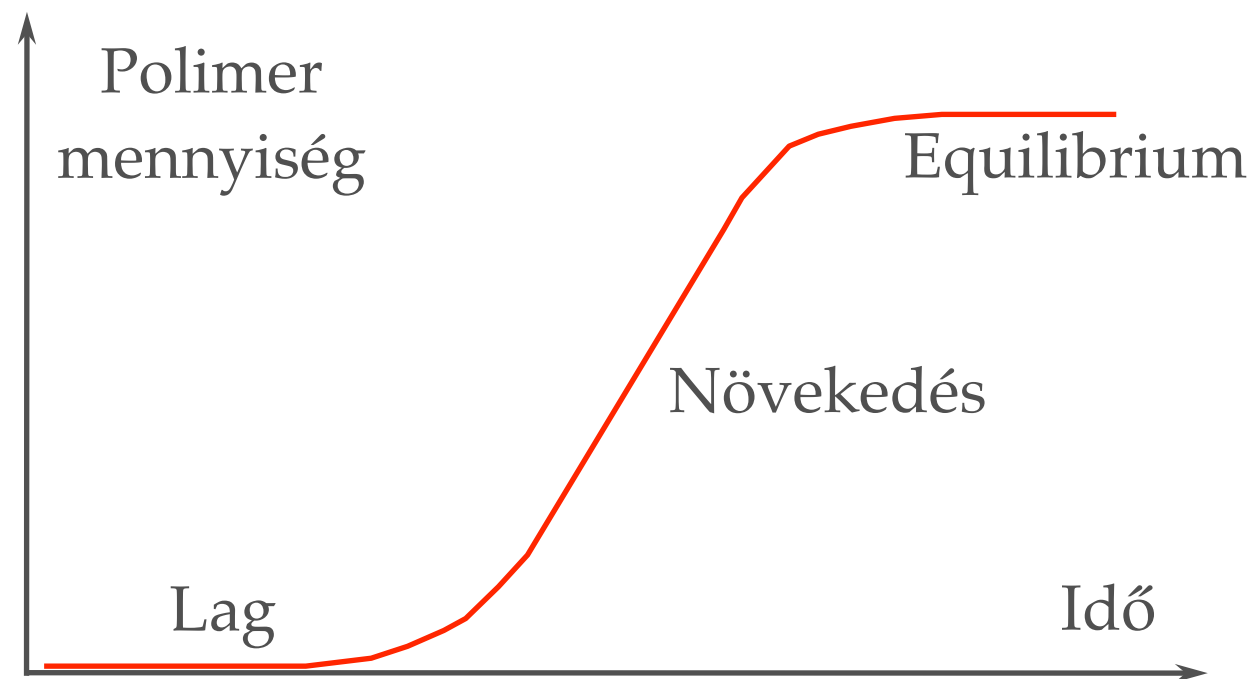


Polimerizáció

Alegységek összeállításának folyamata

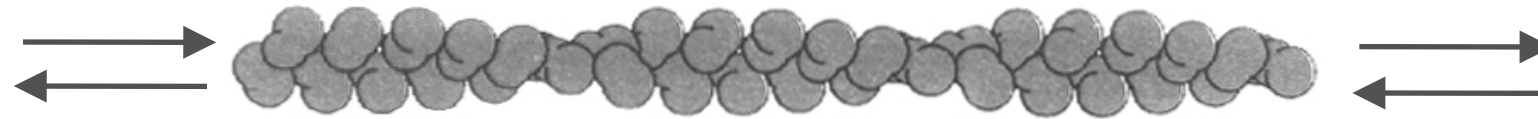
A polimerizáció fázisai:

1. Lag fázis: nukleáció
2. Növekedés fázisa
3. Equilibrium (egyensúly) fázisa



Polimerizációs egyensúlyok

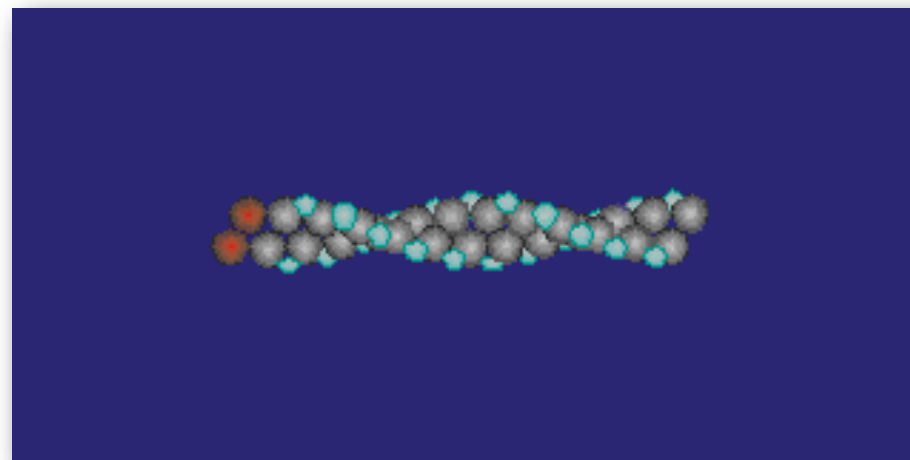
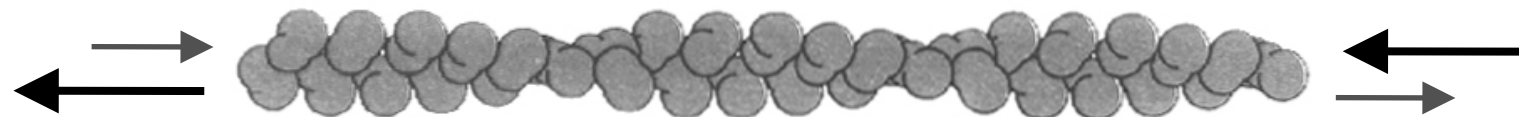
1. valódi equilibrium



2. dinamikus instabilitás: folyamatos, lassú növekedést követő katasztrofikus depolimerizáció

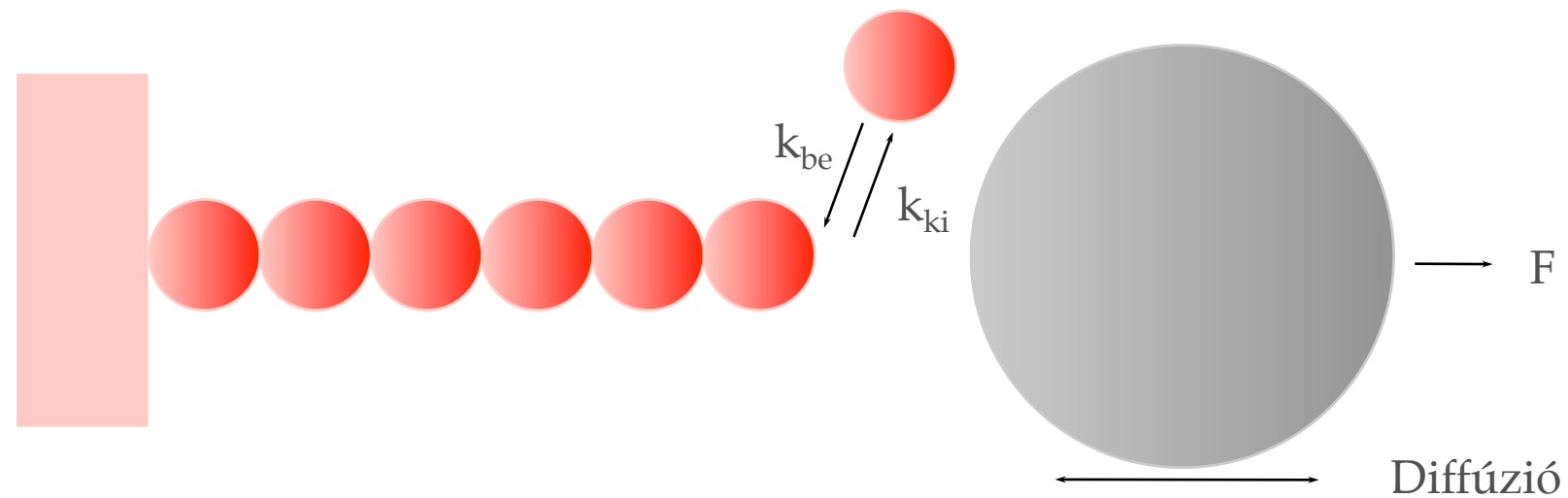
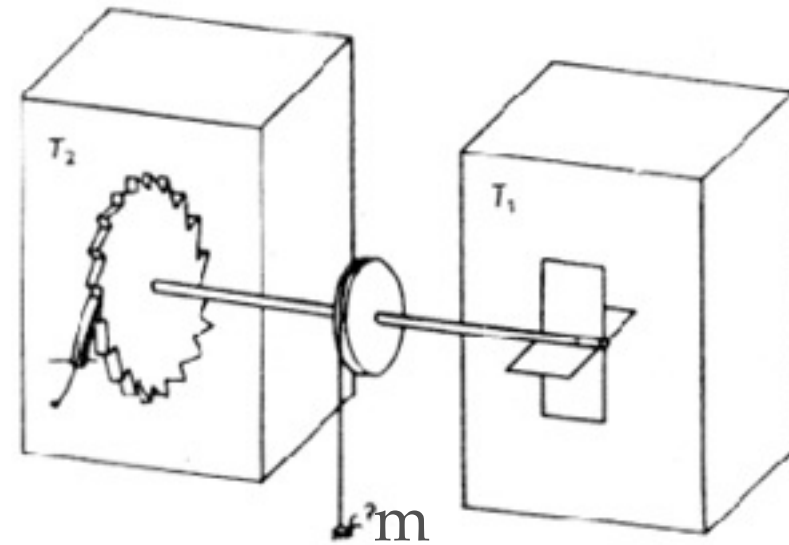


3. Treadmilling:
taposómalom



Erőkifejtés citoszkeletális filamentum polimerizációjával

Brown-féle kilincskerék
mechanizmus



Az aktin monomer (G-aktin)

Az eukarióta sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje (az összfehérje 5%-a)

Koncentrációja a sejtben: 2-8 mg / ml (50-200 μ M)

[G-aktin oldat esetére ez 25 nm átlagot molekulák közötti távolságot jelent]

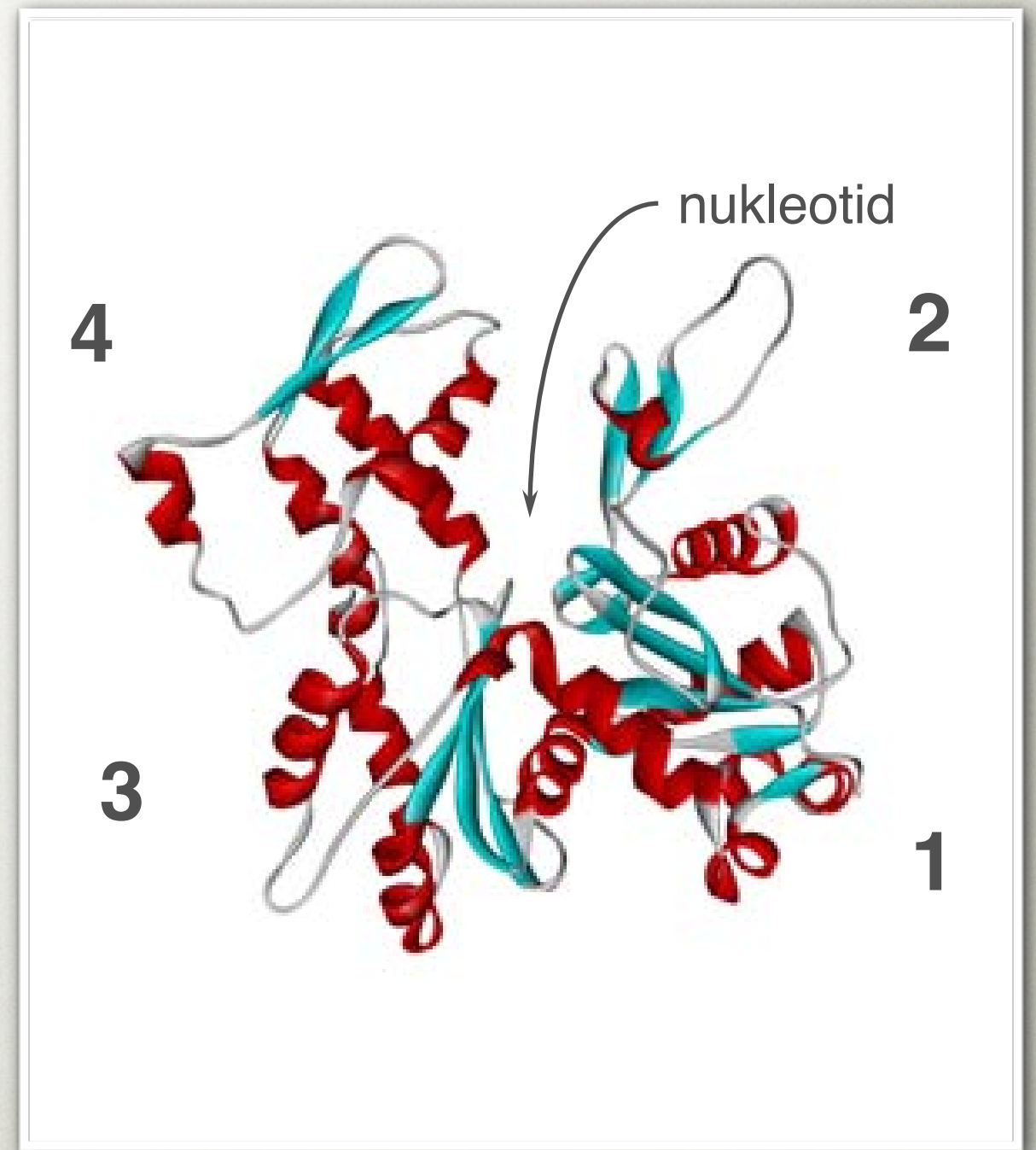
Alegység: globuláris (G-) aktin

MW: 43 kDa, 375 aminosav,

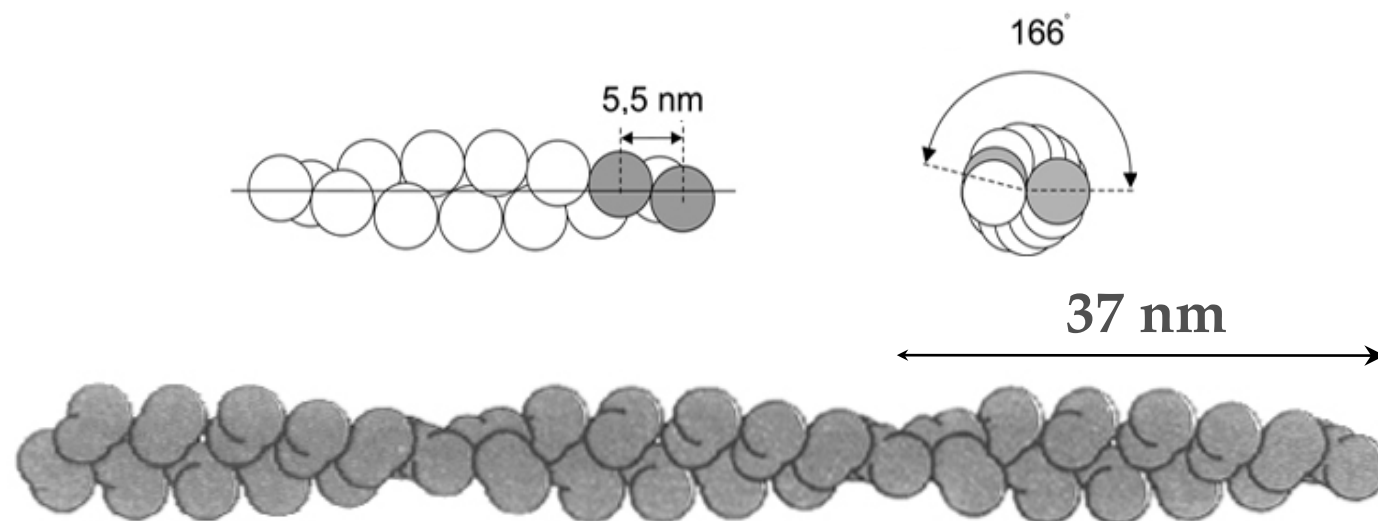
1 molekula kötött adenzin nukleotid (ATP vagy ADP)

Szubdomének (4)

Genetikai variabilitás: emlősökben 6 különböző aktin, három családban (α izomeredetű, β , γ nem-izomeredetű)



Az aktin filamentum (F-aktin)



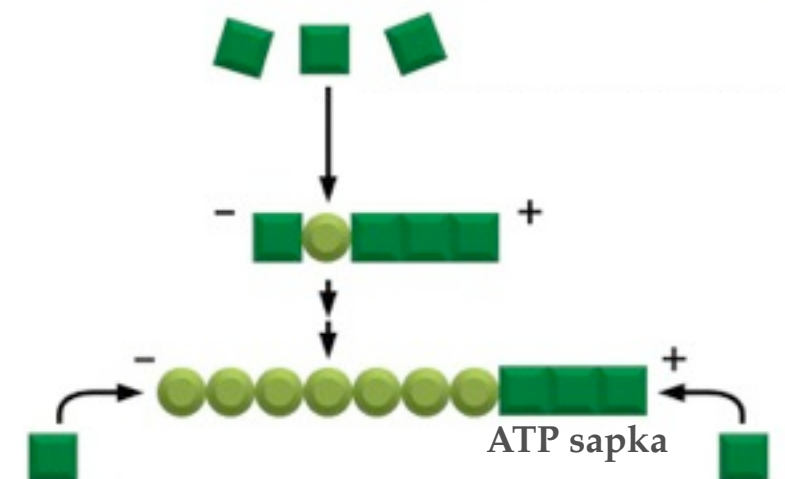
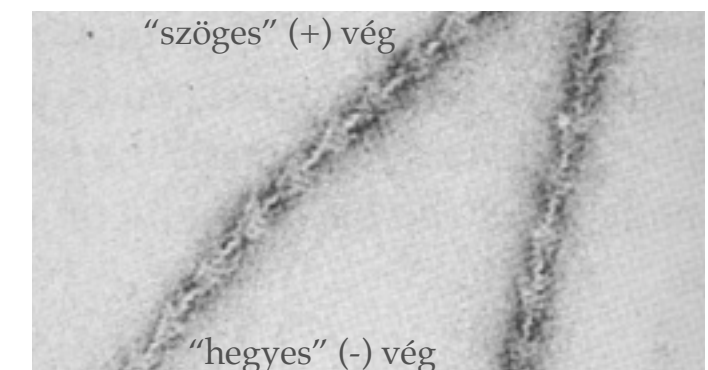
~7 nm vastag, hossza *in vitro* több 10 μm , *in vivo* 1-2 μm

Jobbmenetes dupla helix. Szerkezetileg polarizált

Szemiflexibilis polimerlánc (perzisztenciahossz: ~10 μm)

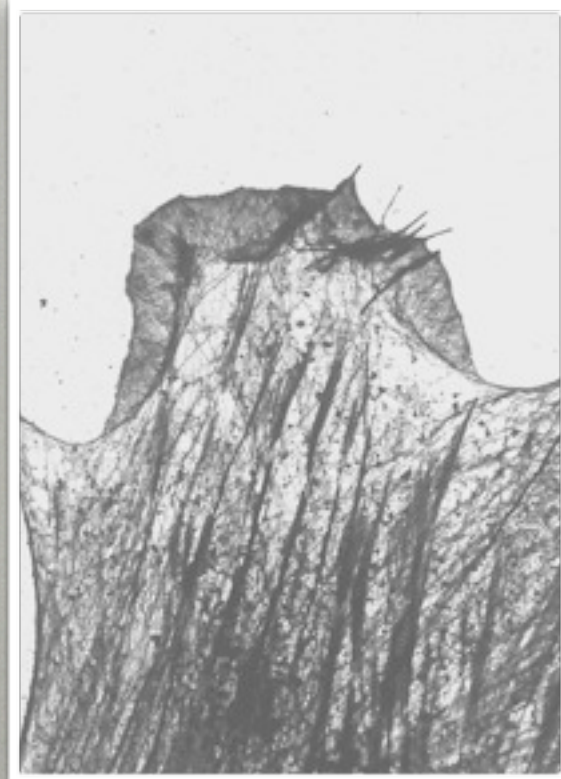
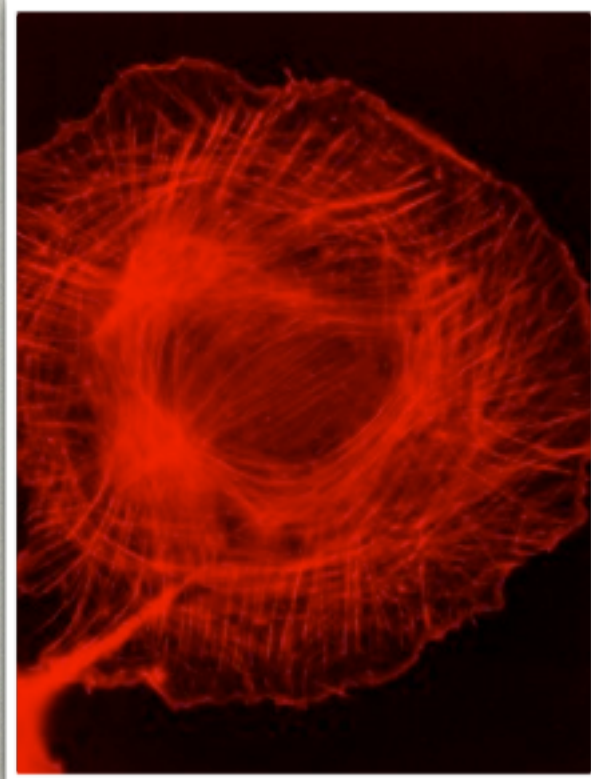
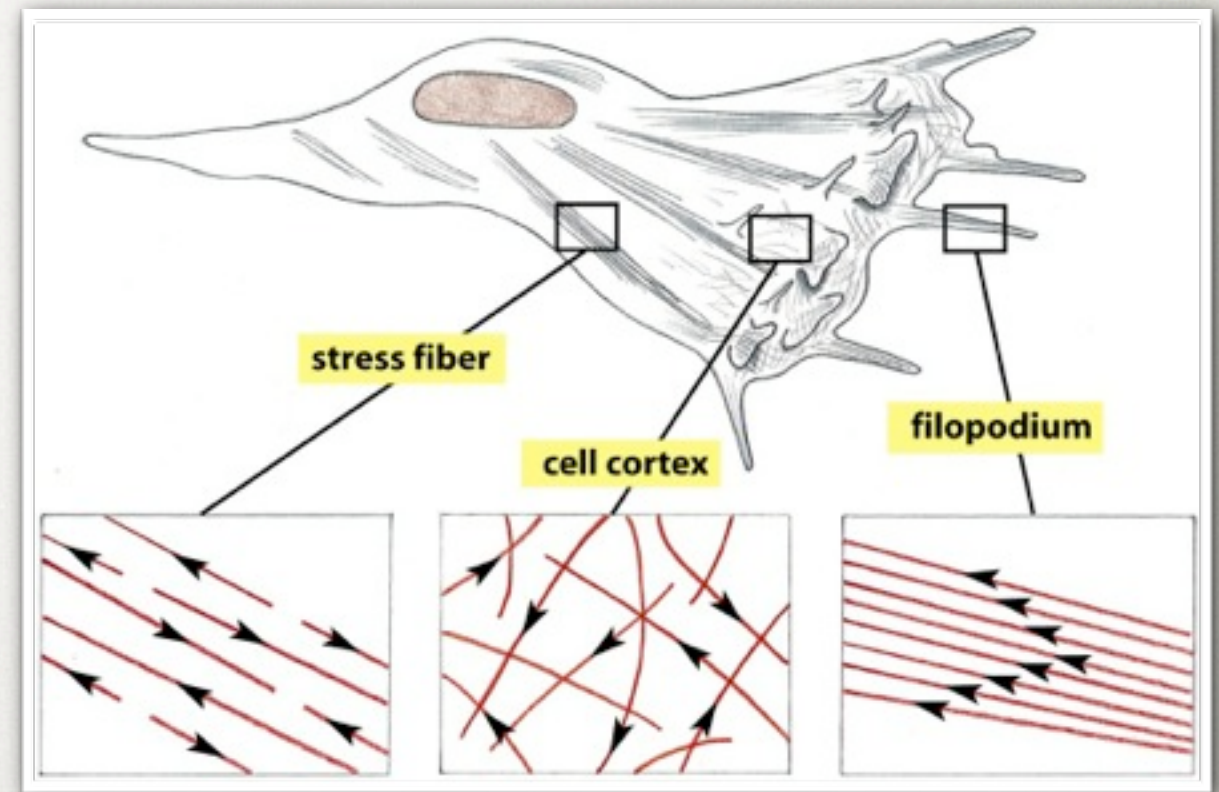
Szerkezeti polarizáció ("szöges", "hegyes" vég)

Aszimmetriás polimerizáció: ATP sapka

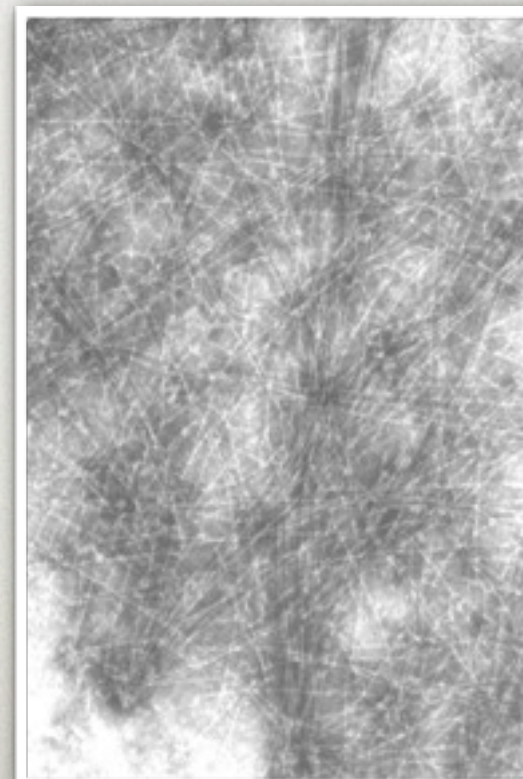


Aktin a sejtben

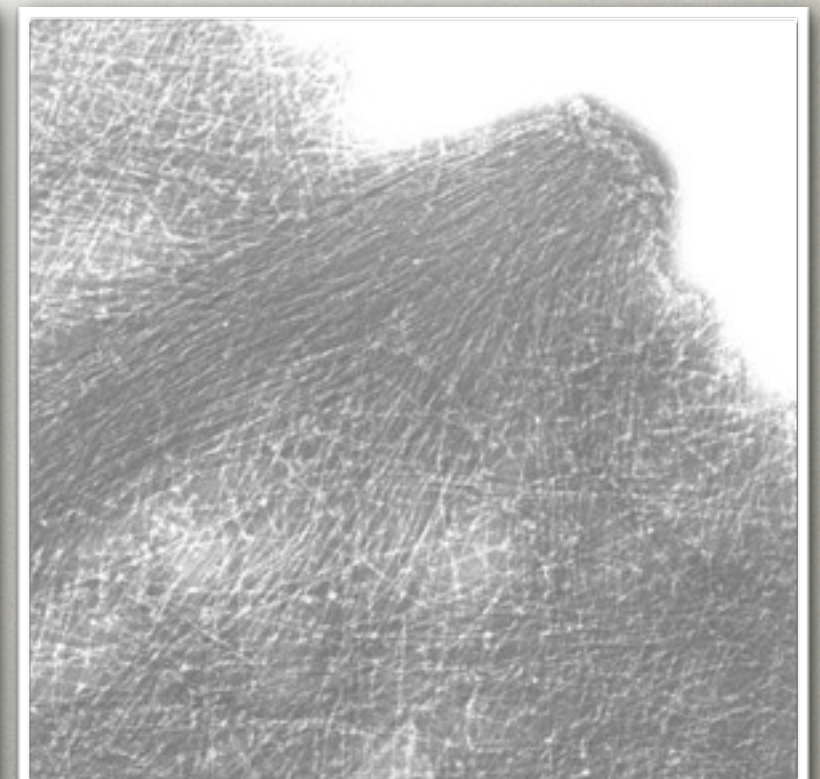
cortex (a sejt pereme)
"stress" rostok,
sejtnyúlványok (lamellipodia, filopodia,
microspikes, focal contacts, invagináció)
mikrovillus



Stress rostok

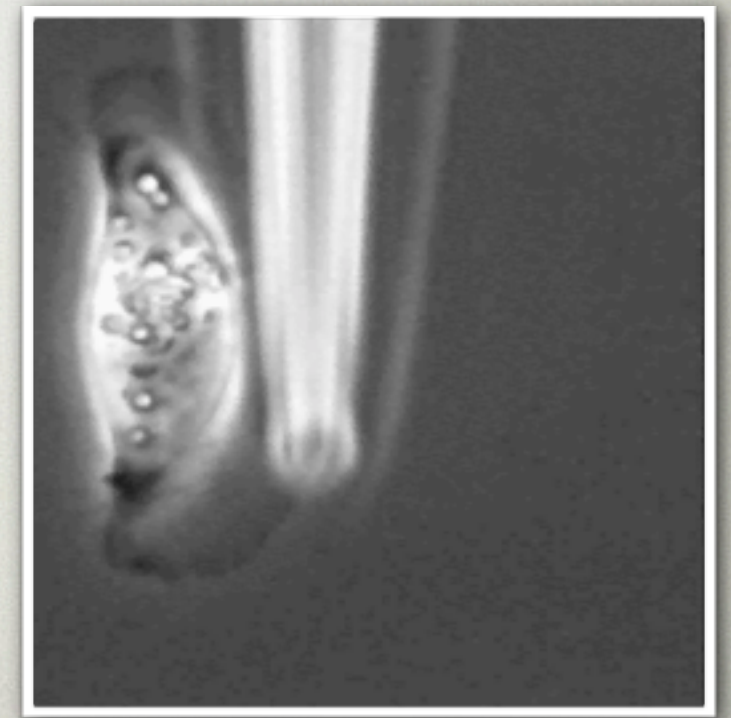
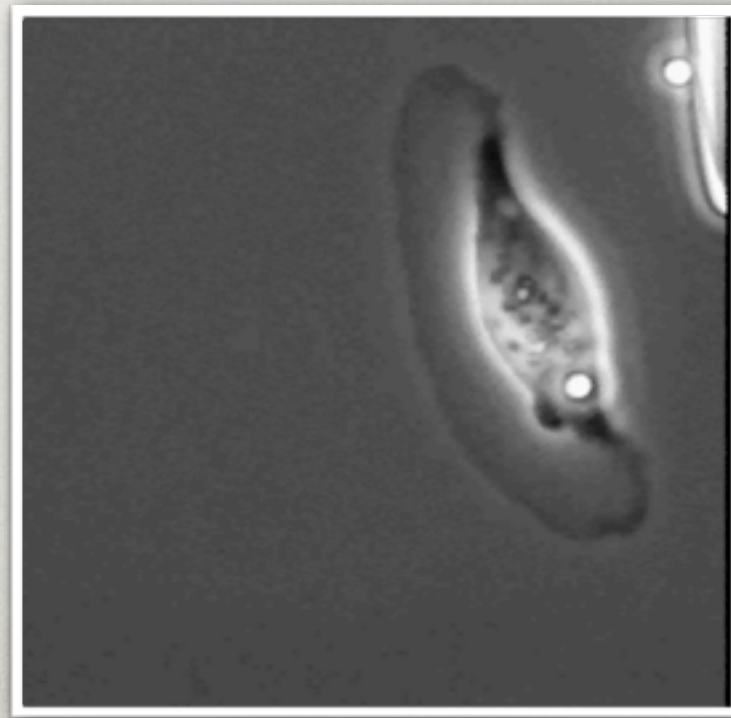
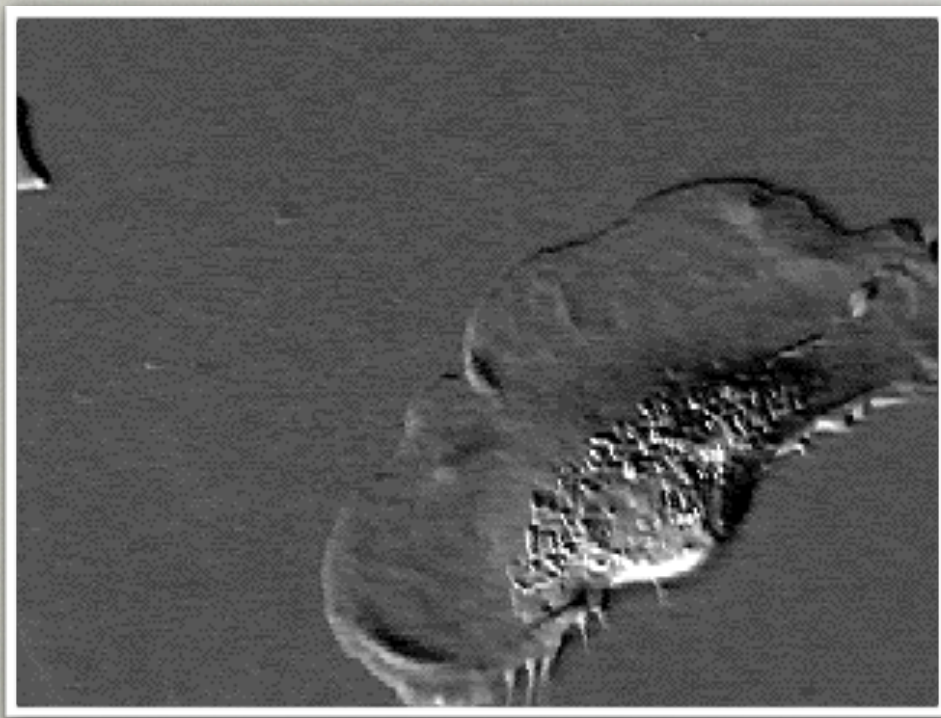
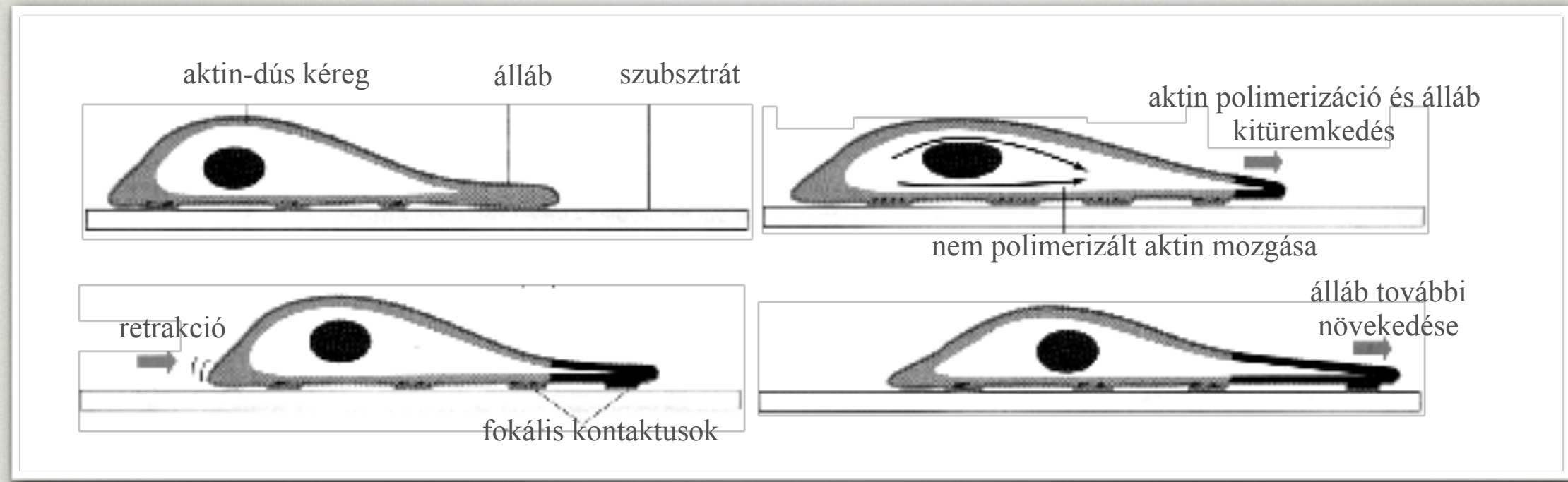


cortex

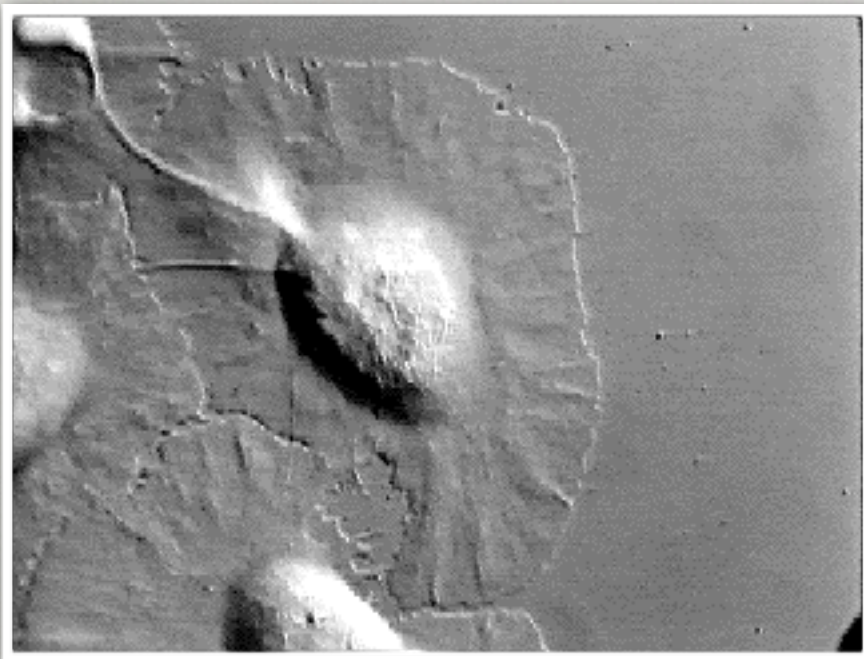


filopodium

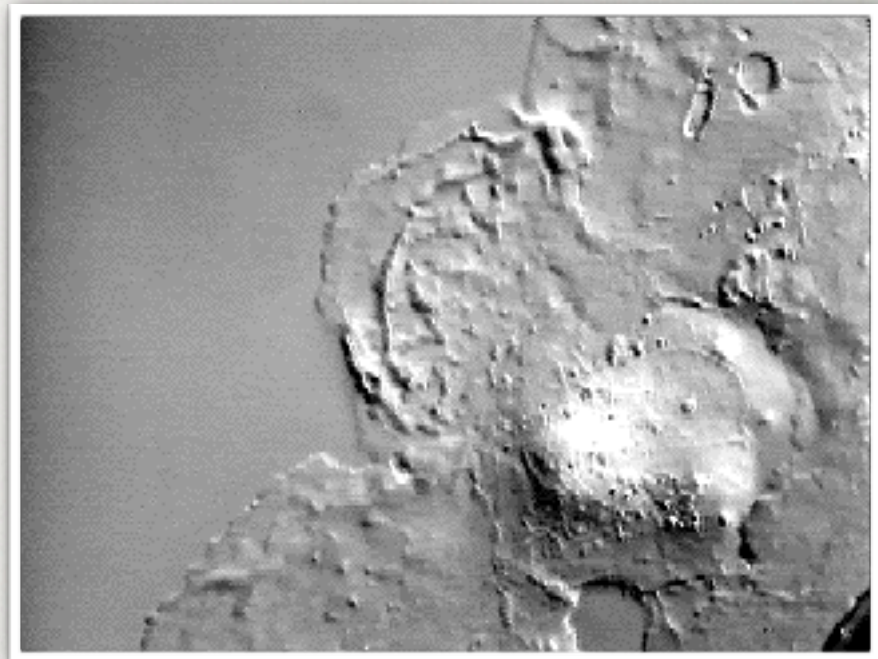
Aktin-függő sejtmozgás



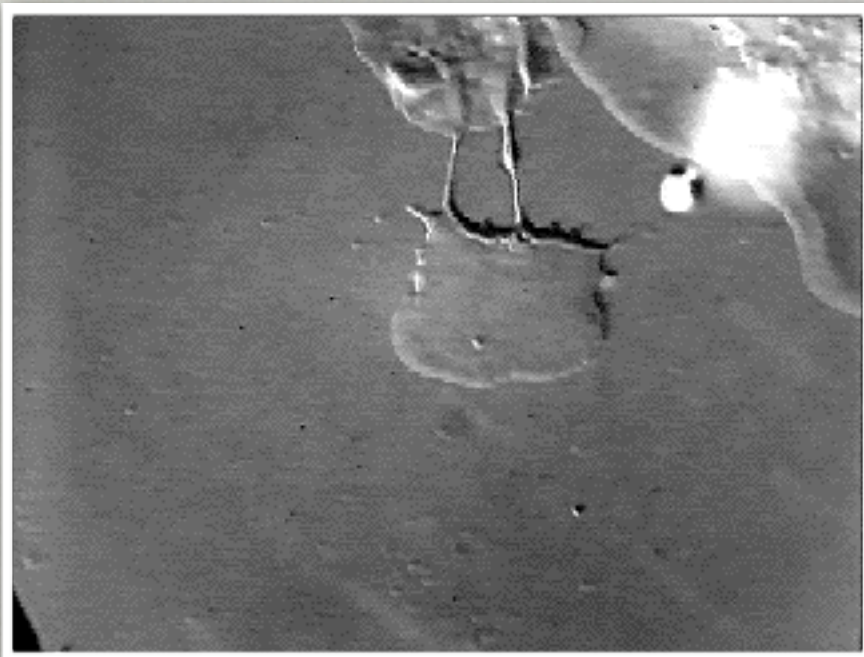
Aktin-függő sejtmozgás megnyilvánulásai



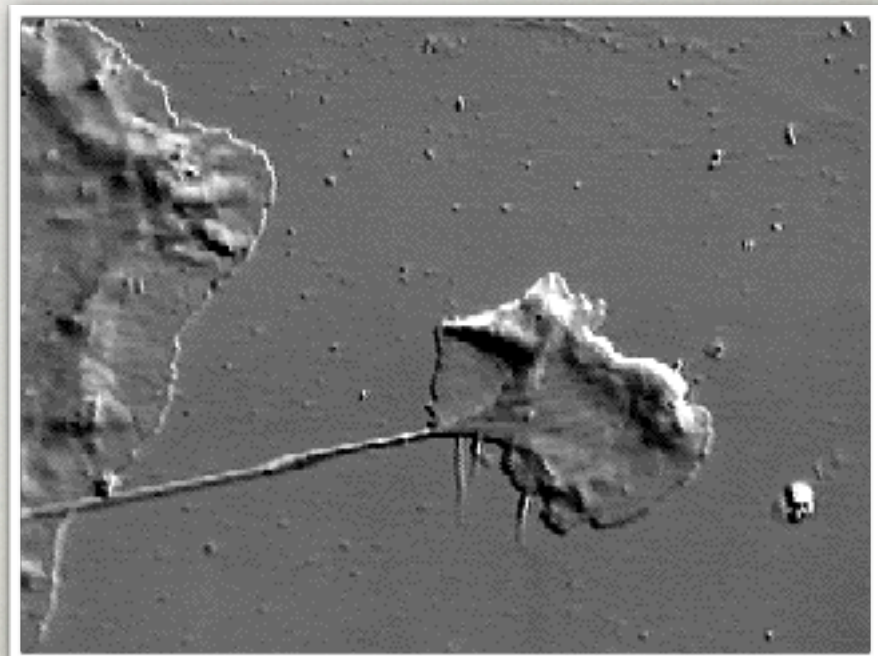
Retrográd áramlás



Filopodium képződési dinamika

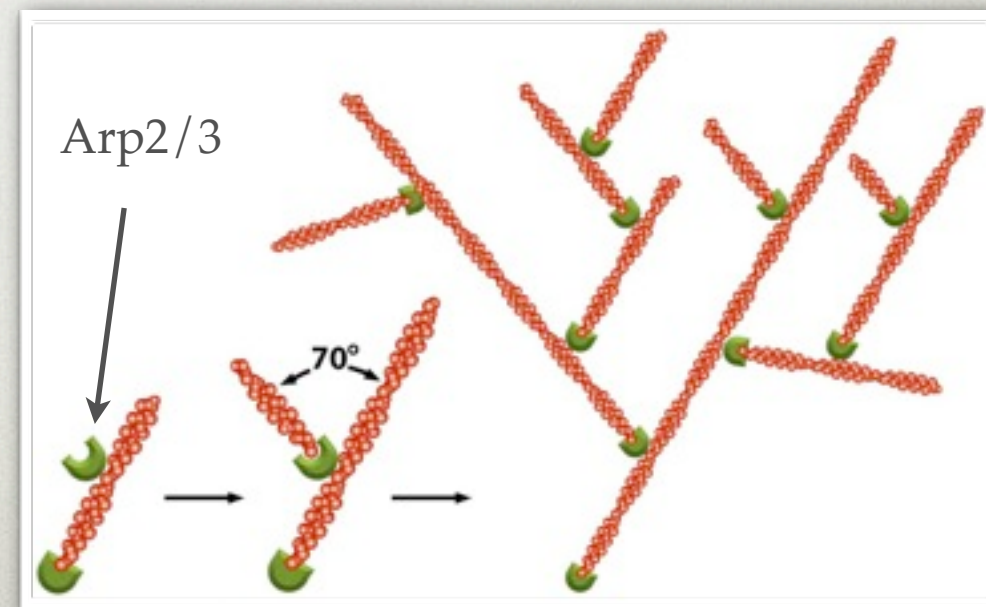
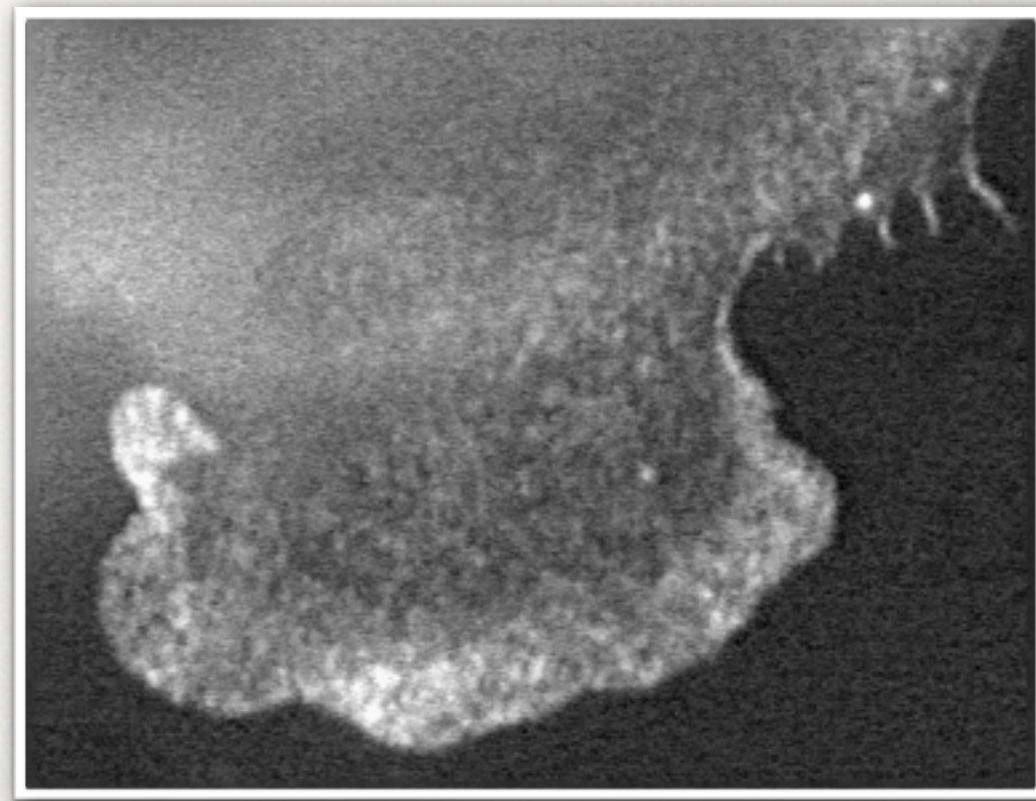
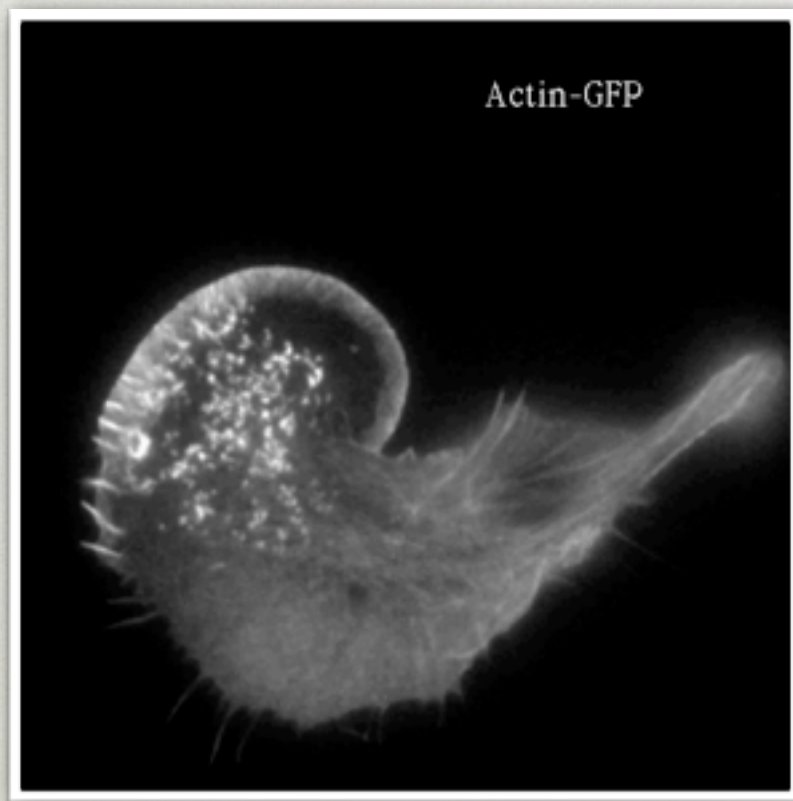


Citoplaszt (anukleáris sejtfragmentum)
autonóm mozgása)

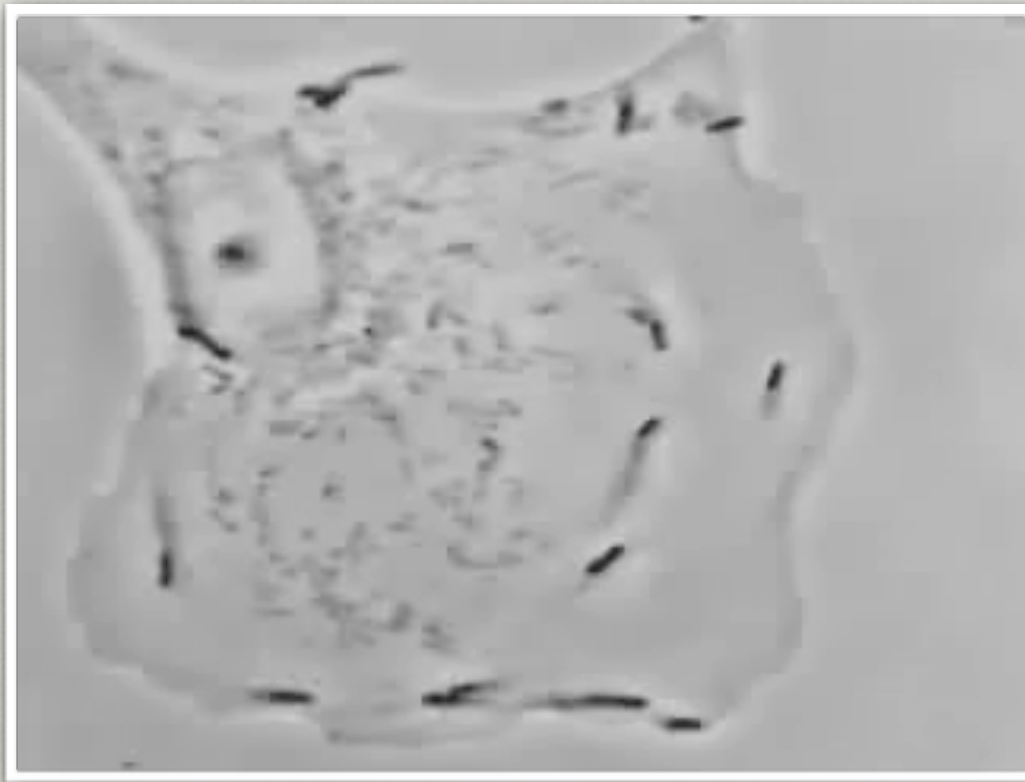


Membrán fodrozódás

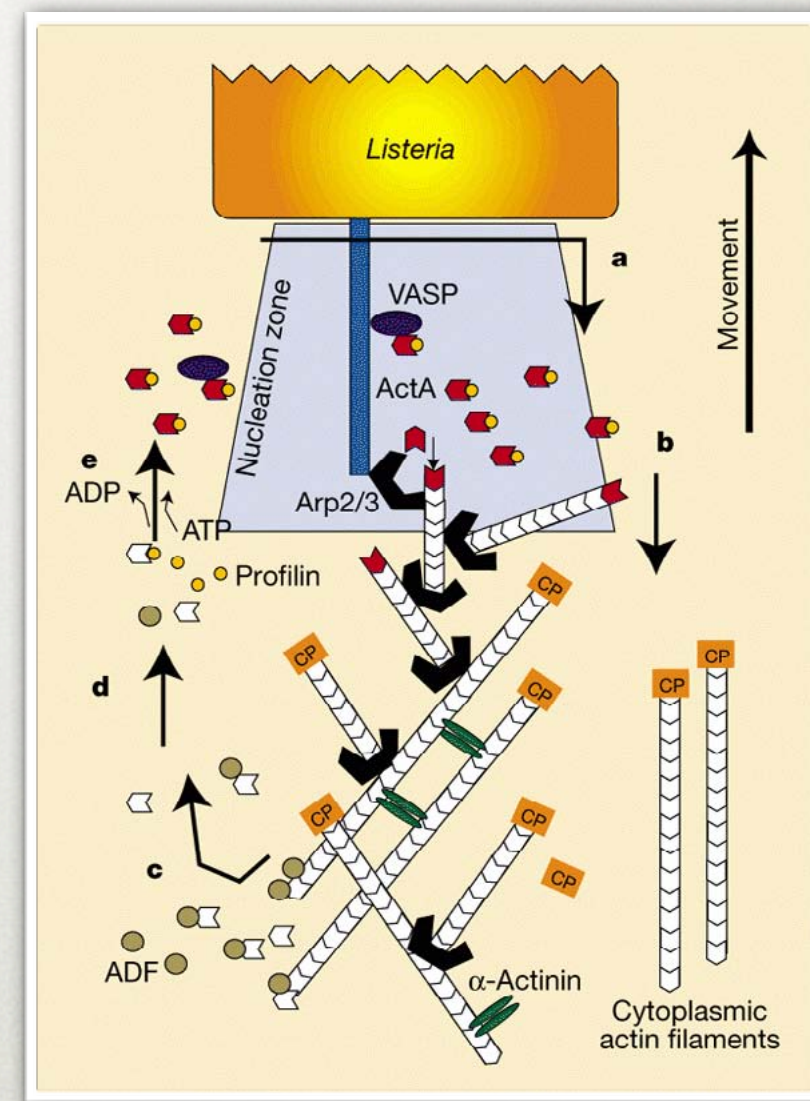
Aktin dinamika a lamellipodiumban



Intracelluláris patogének is kihasználják az aktin rendszert

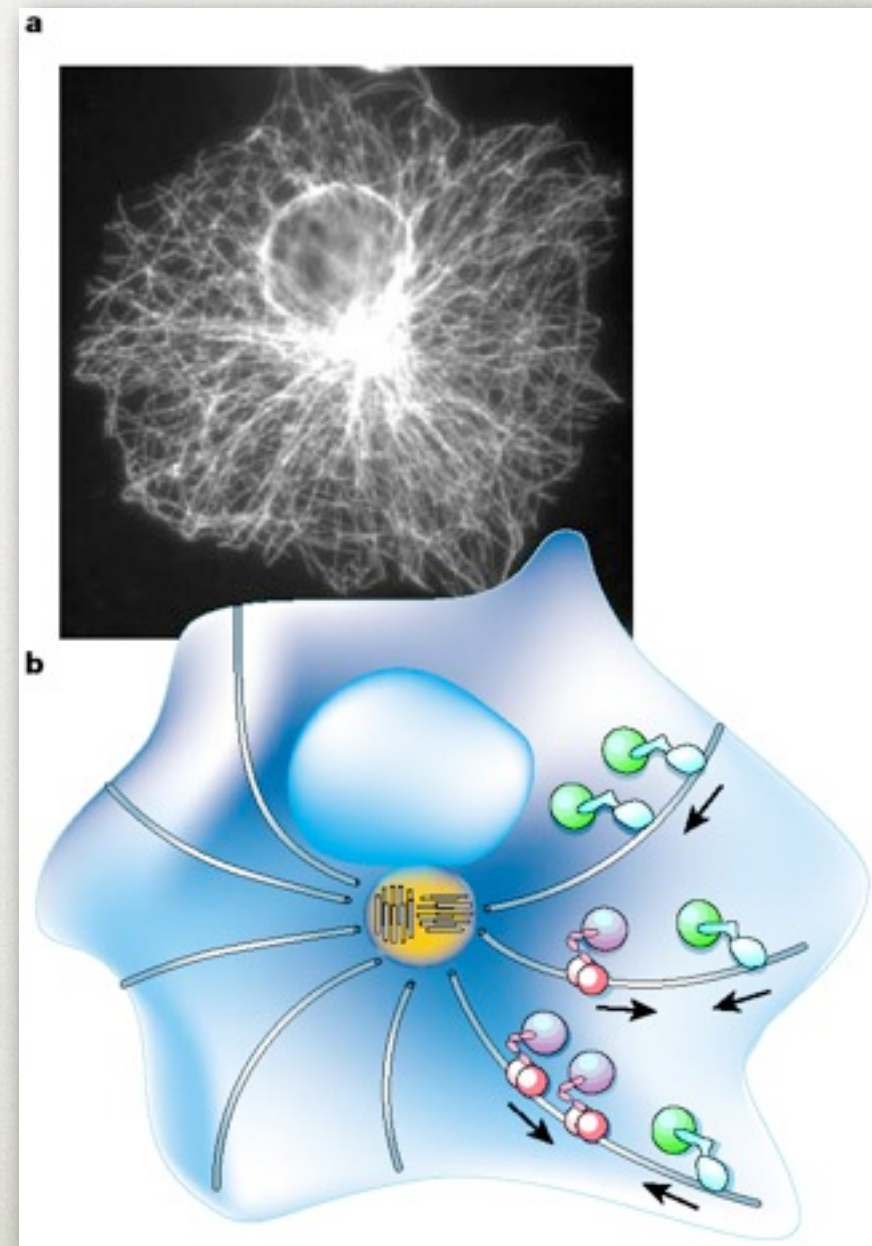
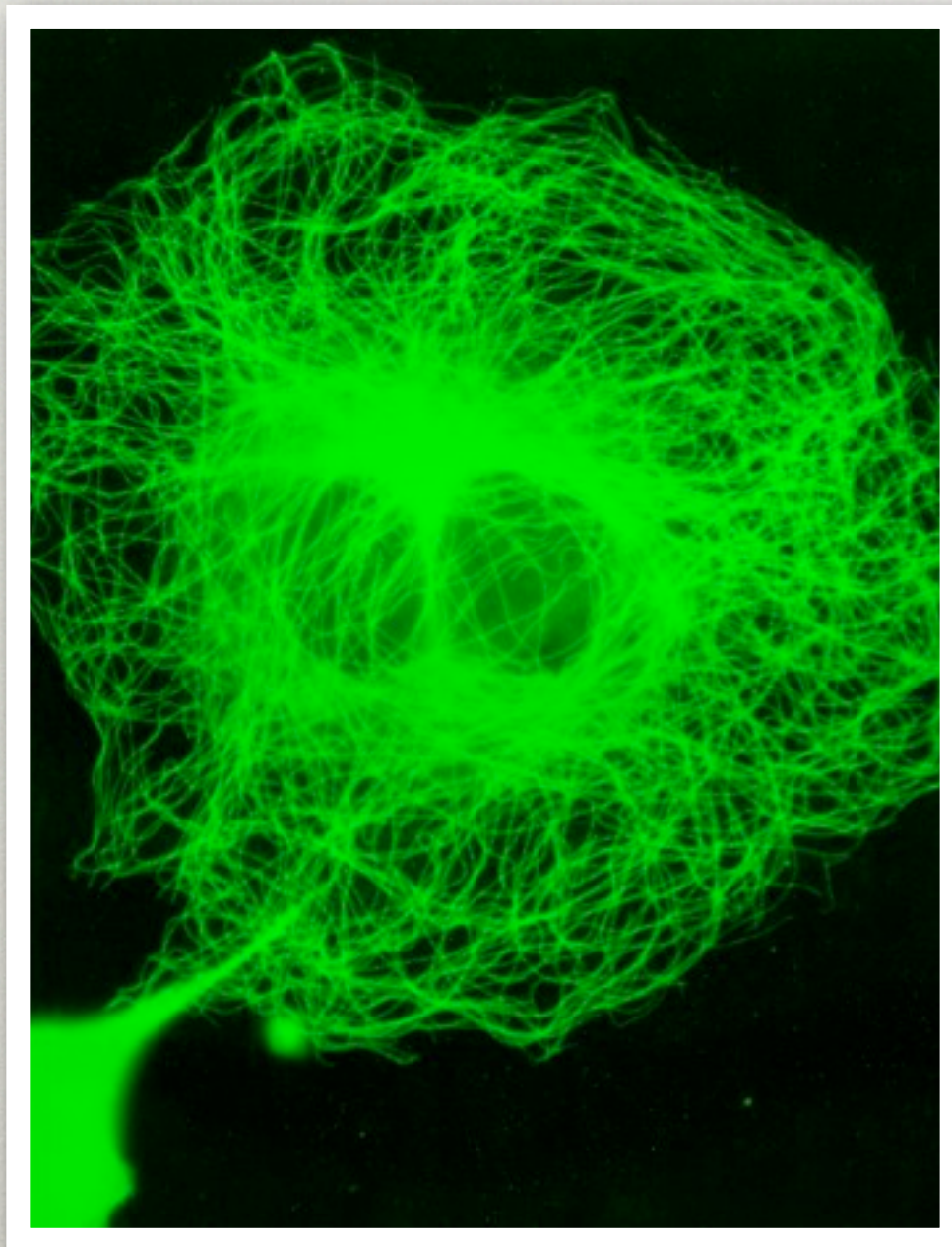


Listeria monocytogenes intracelluláris motilitása



Mikrotubuláris rendszer

Eukarióta sejtek tubulinból
és kapcsolódó fehérjékből álló rendszere.



A mikrotubulusok építőköve: tubulin

Alegység: tubulin

Idegszövetben az összfehérje 10-20%-a

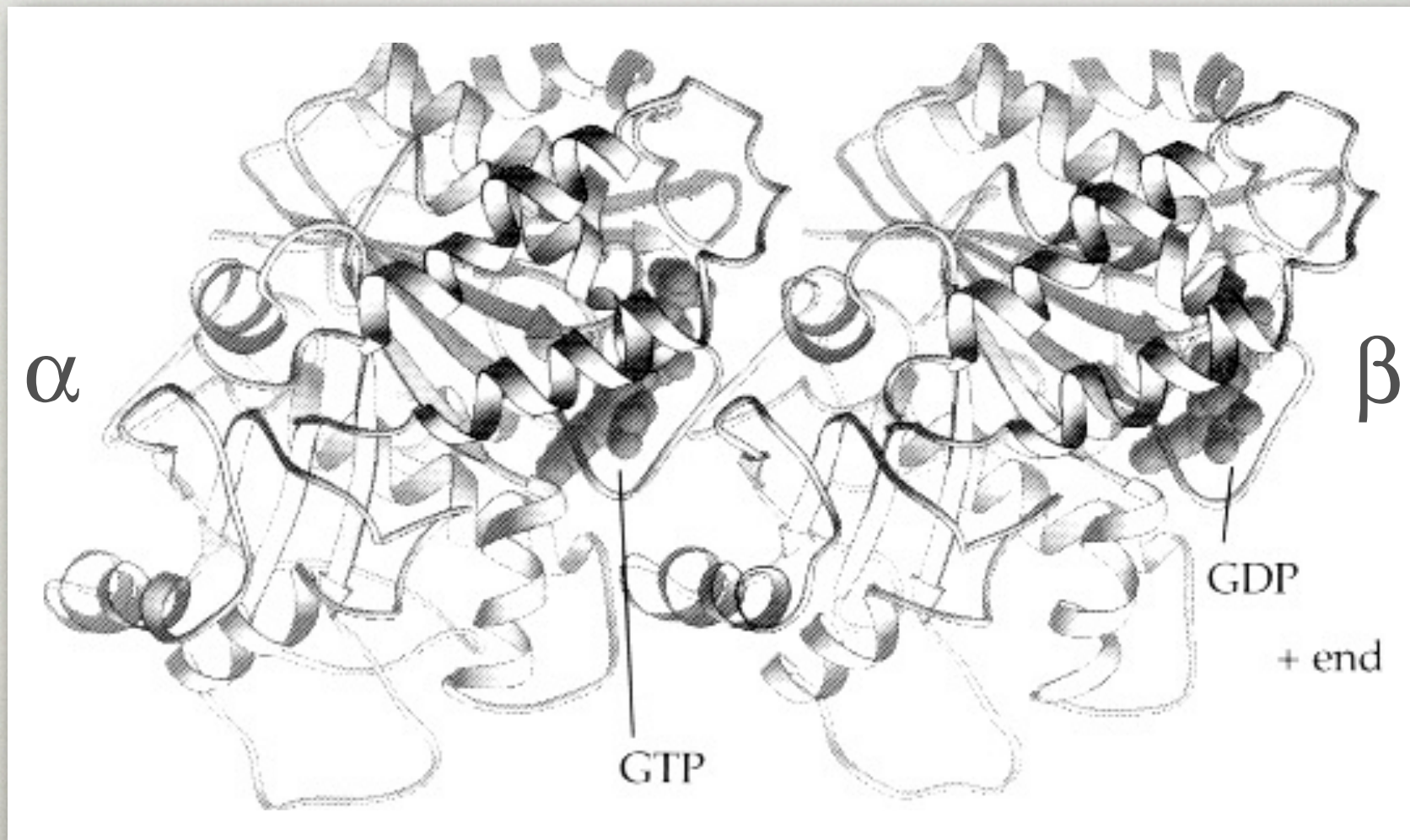
MW: ~50 kD: α - és β -tubulin \rightarrow heterodimér

1 molekula kötött guanozin nukleotid (GTP vagy GDP);

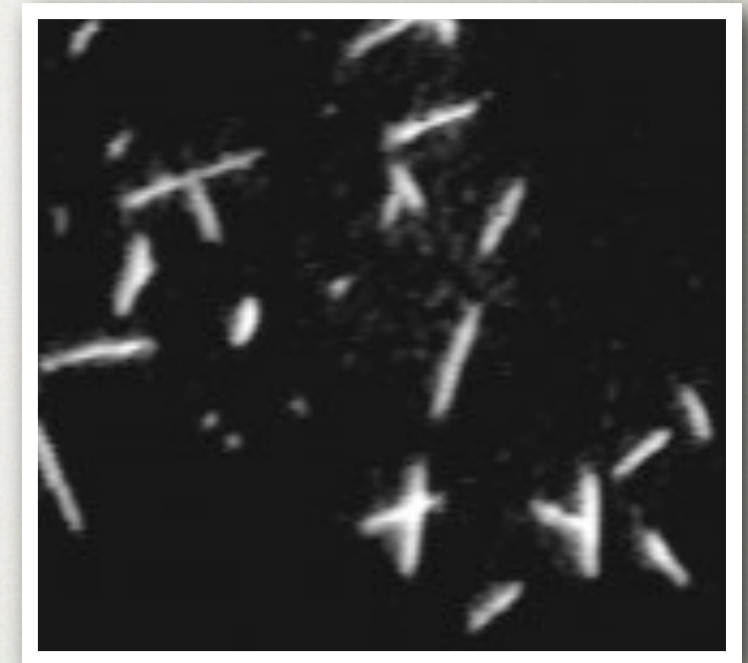
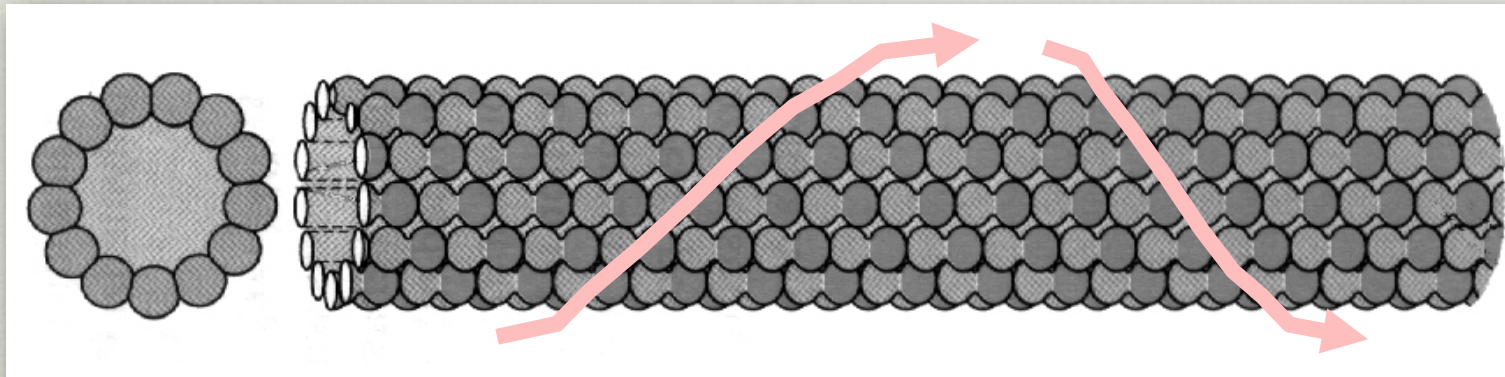
kicserélhető (β), illetve nem kicserélhető (α)

Szerkezeti polaritás

Genetikai variabilitás: legalább 6 különböző α illetve β tubulin



A mikrotubulus



~25 nm vastag, üreges

13 protofilamentum

jobbmenetes rövidmenetű helix

balmenetes hosszúmenetű helix

Merev polimerlánc (perzisztenciahossz: néhány mm!)

Szerkezeti polarizáció:

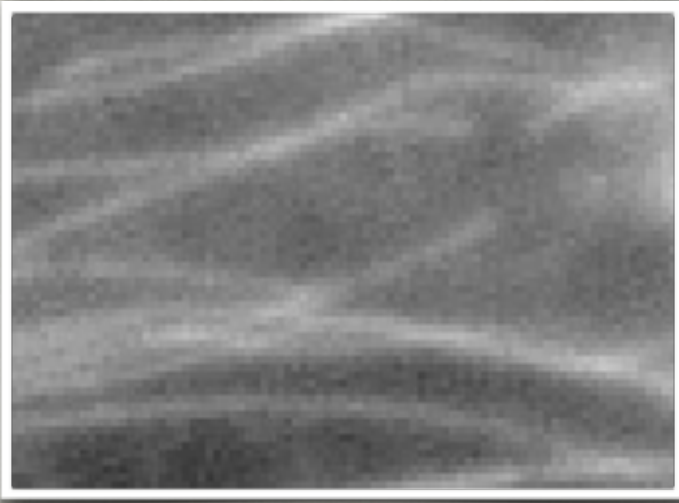
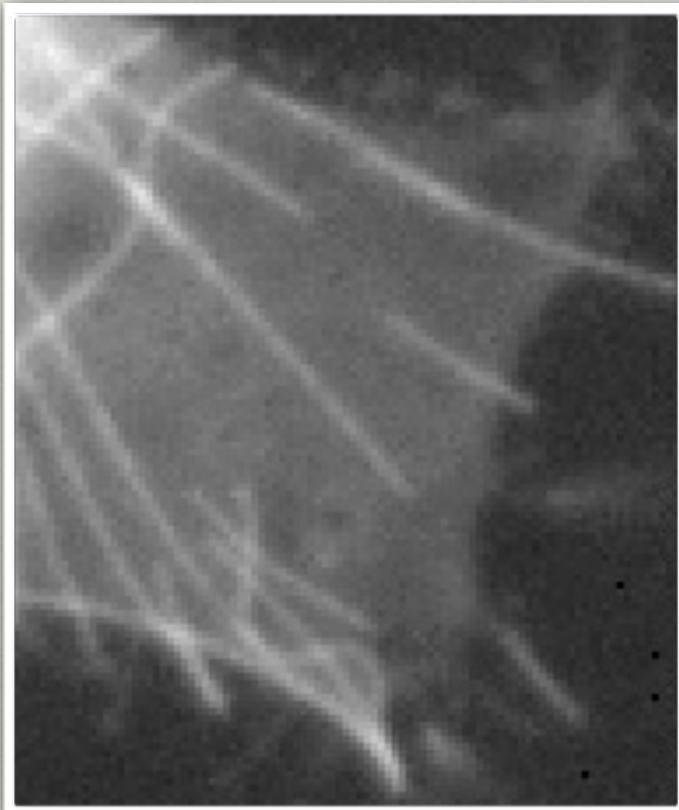
+vég: polimerizáció gyors, β -alegység által terminált

-vég: polimerizáció lassú, α -alegység által terminált

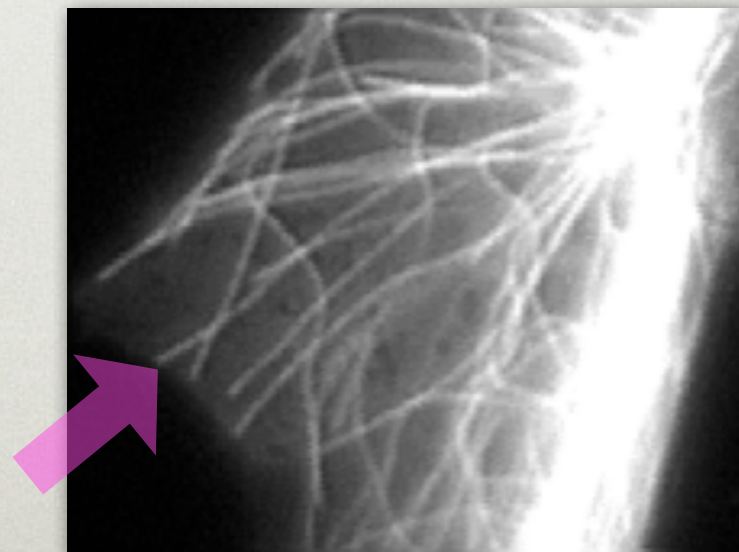
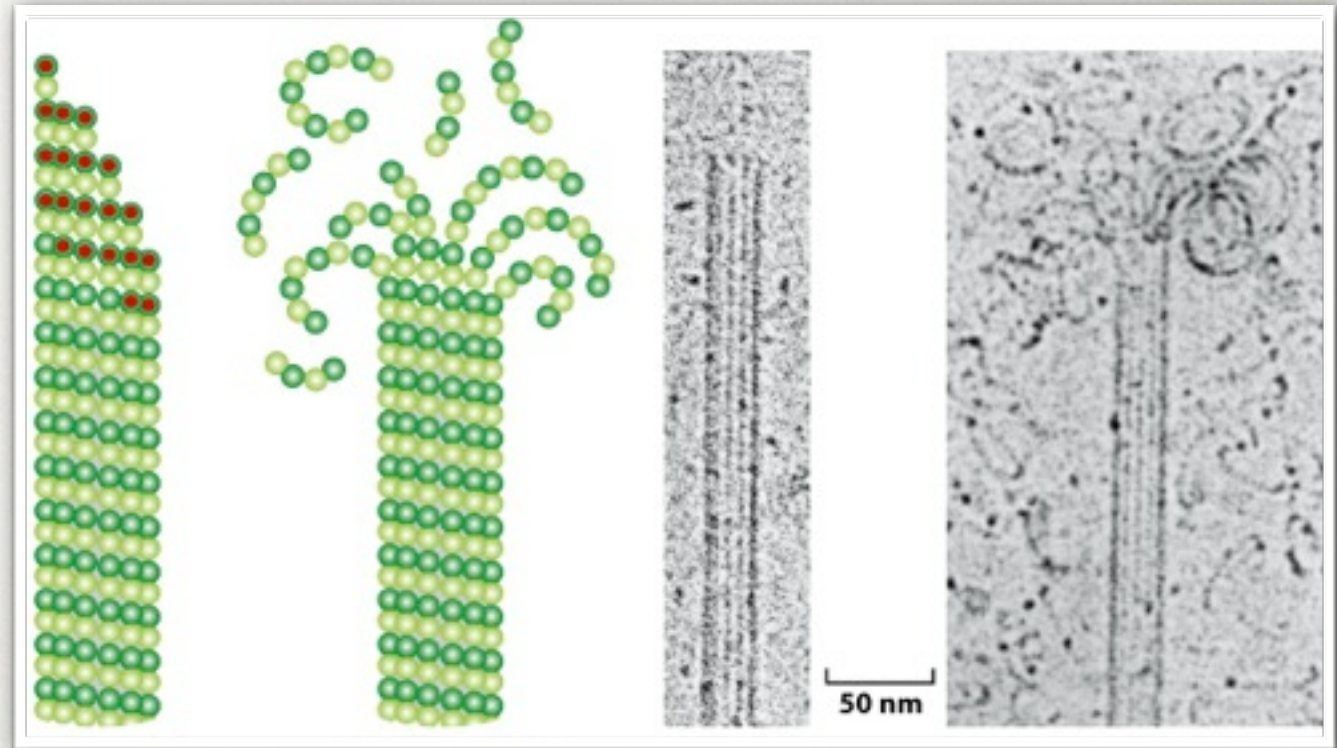
GTP-sapka

Polimerizációs egyensúlyok mikrotubulusokban

Treadmilling



Dinamikus instabilitás



Mikrotubuláris rendszer az eukarióta sejtben

Hol található az eukarióta sejtben?

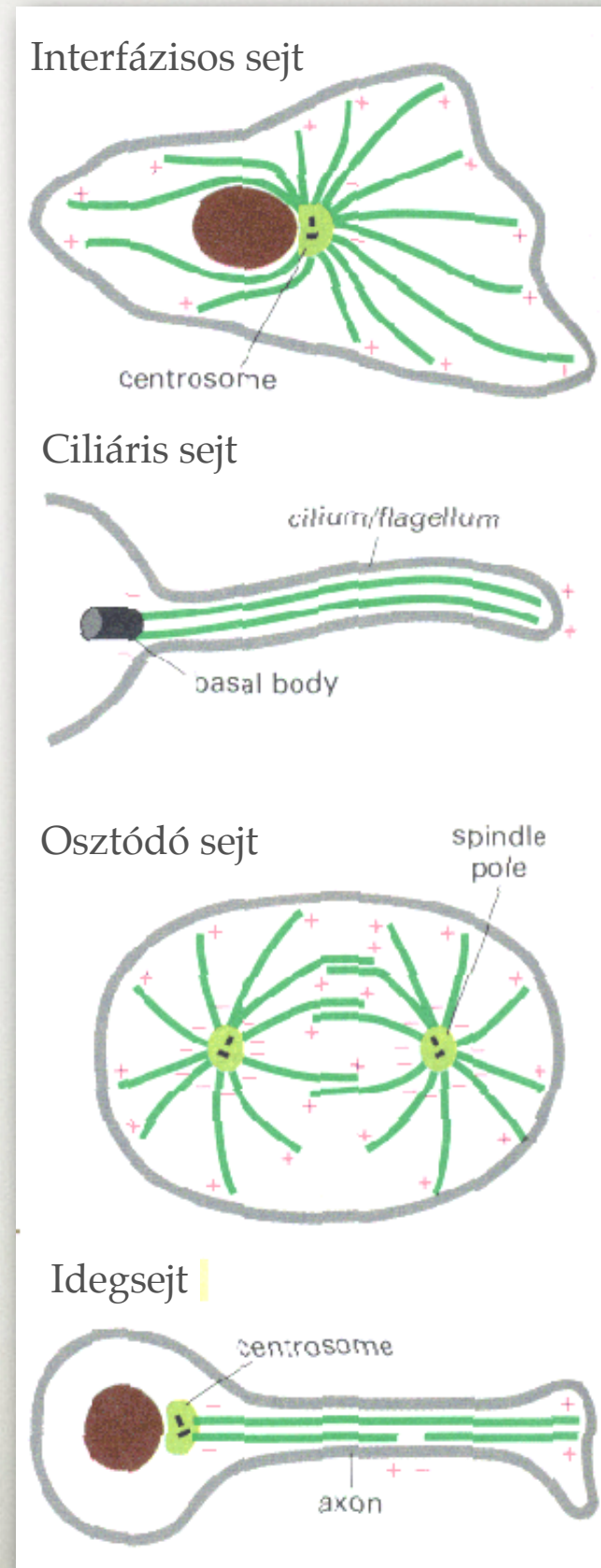
interfázisos sejt cytoplasmája, axon, cilium, flagellum, osztódó sejt húzóorsója.

Polaritás a sejtben belül

centrosomában -vég, a periférián +vég.

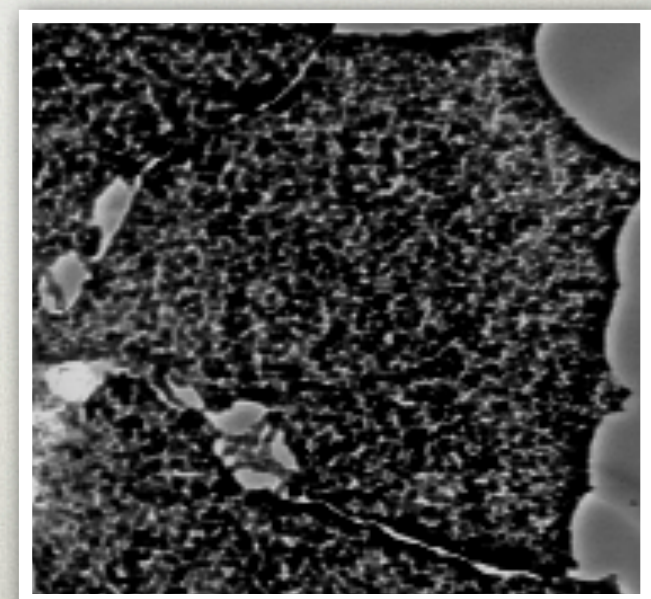
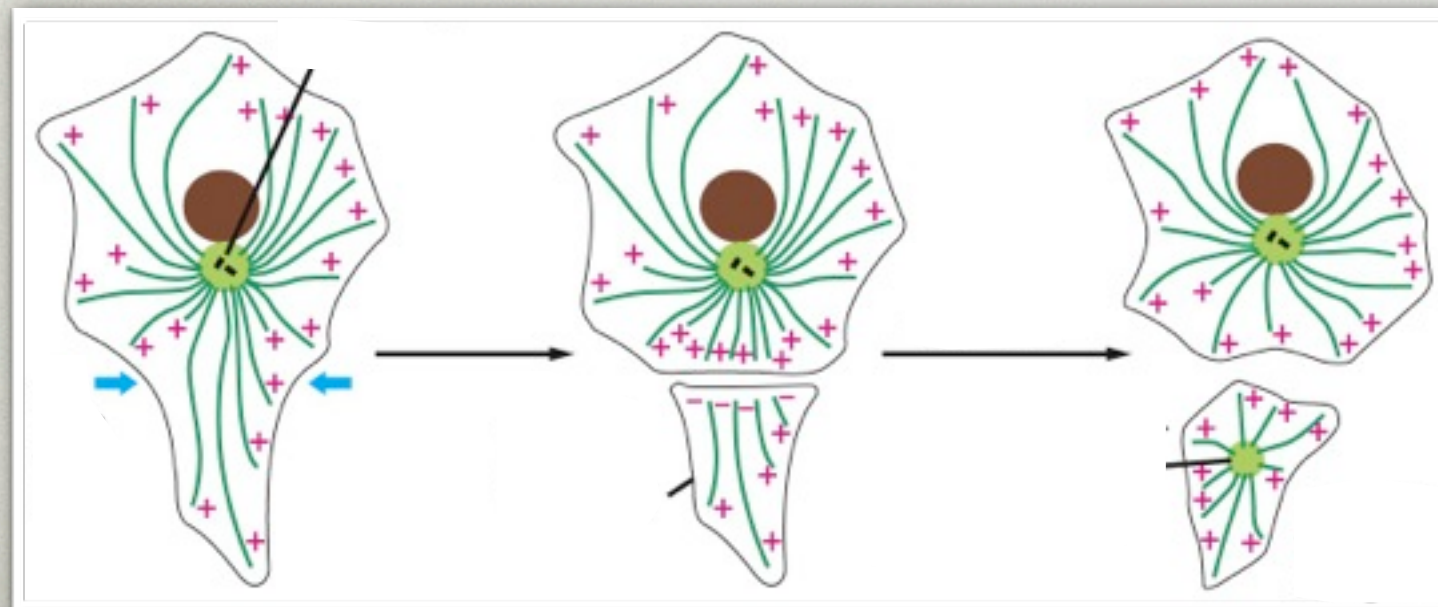
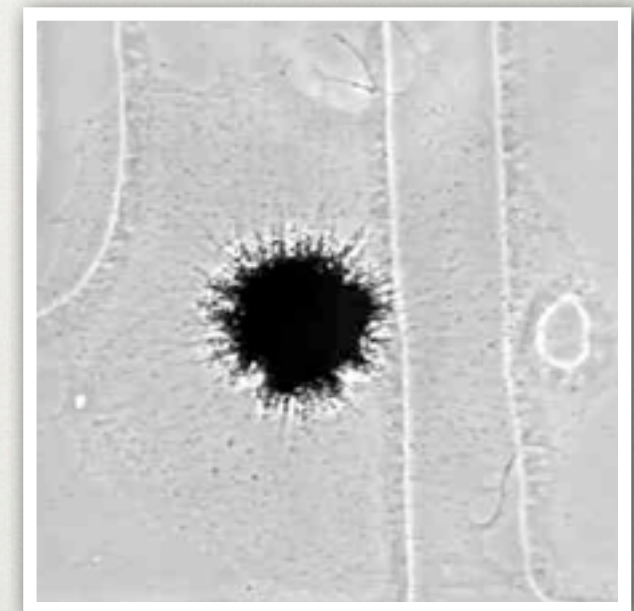
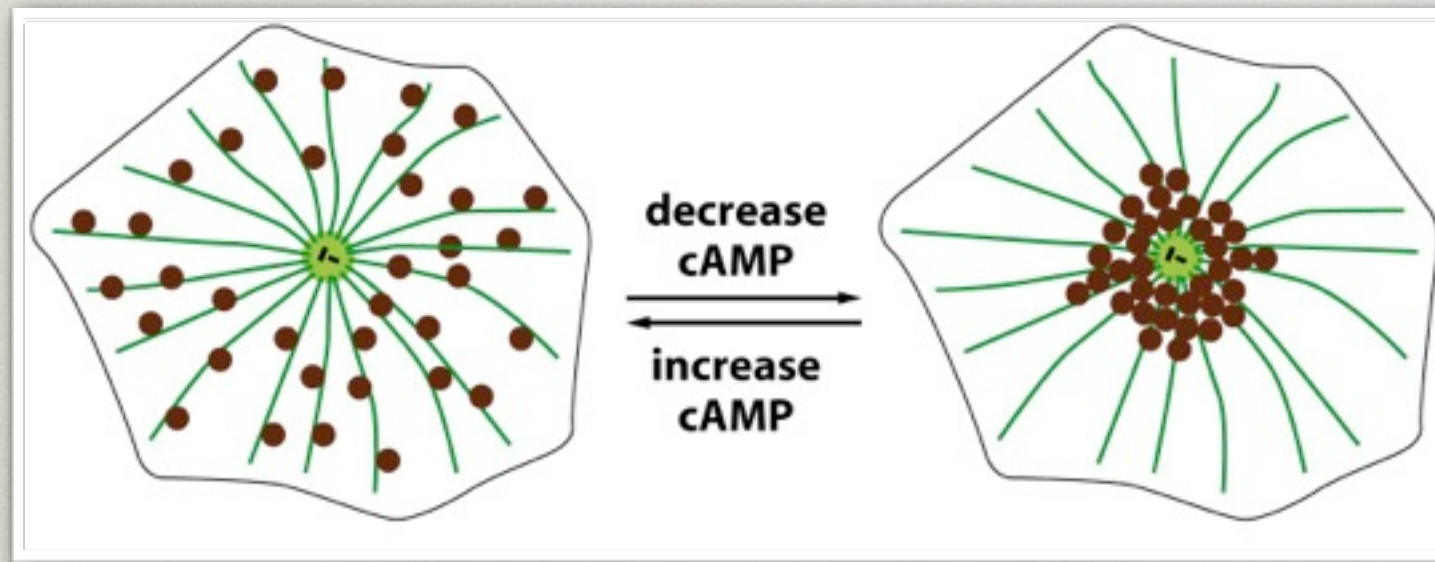
Centrosoma: 2 centriolum, centrosoma matrix, benne γ -tubulin

Sejt polaritás "fixálása" MT asszociált fehérjék (capping protein) segítségével.



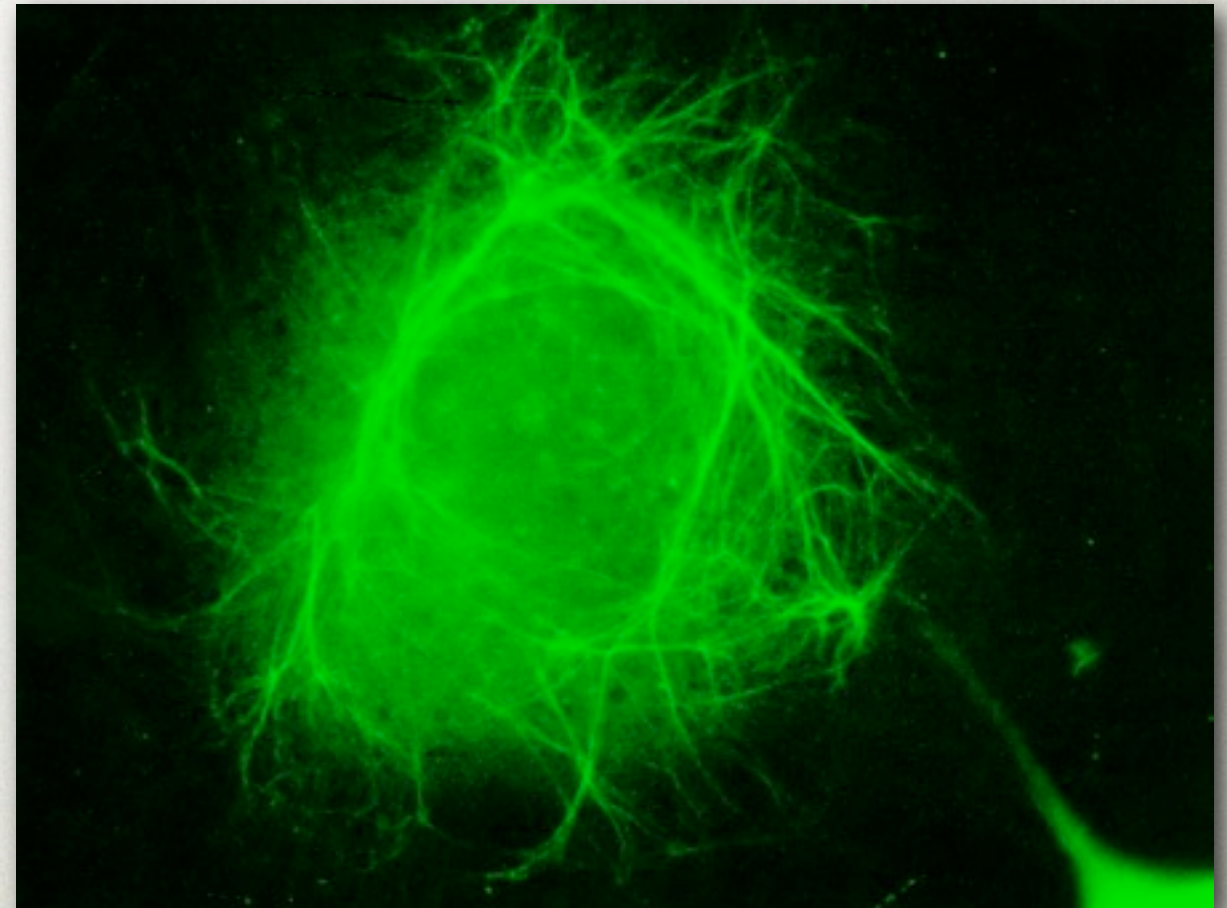
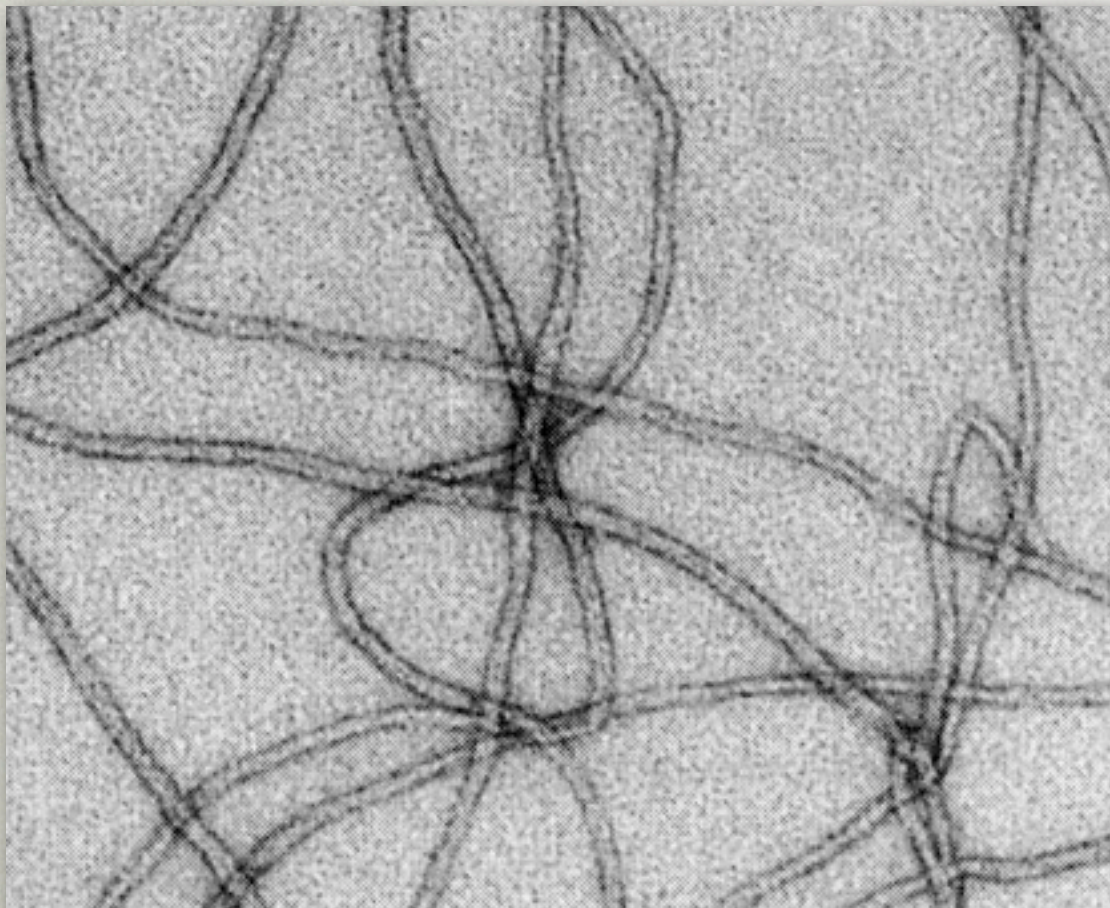
Mikrotubuláris rendszer funkciói

1. Autópályák motorfehérjék számára
2. Érzékeli, monitorozza és megtalálja a sejt geometriai középpontját
3. Motilitási funkciók (sejtosztódás)



Intermedier filamentális rendszer

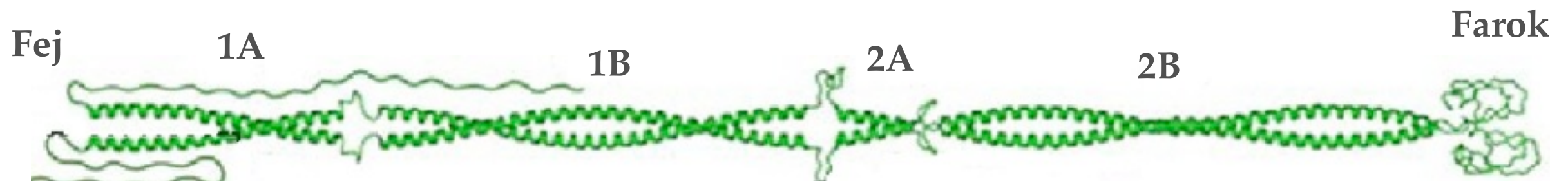
8-10 nm átmérőjű szövetspecifikus, filamentális fehérjerendszer, mely a legtöbb (de nem minden) állati sejtben megtalálható. Alapvető szerep: mechanikai ellenállás biztosítása



Vimentin, Vic Small

Intermedier filamentum építőkövek

Intermedier filamentum dimer:



Tulajdonságok:

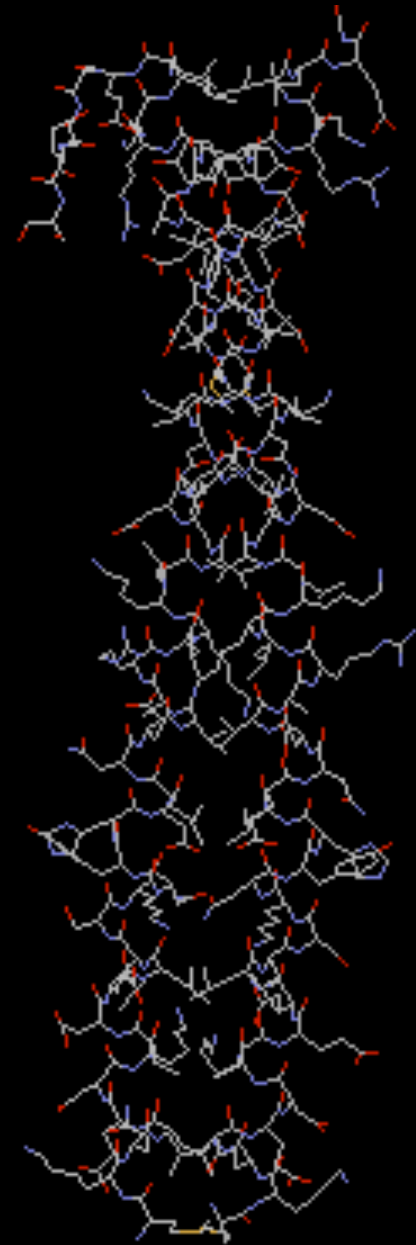
- Kémiaailag ellenálló (detergensek, magas ionerősség)
- Denaturáló szerekkel (pl. urea) extrahálható
- Fibrózus monomer (nem globuláris, mint az aktin vagy tubulin)
 - amino-terminális fej
 - centrális rúd (α -hélix, heptád ismétlődés)
 - carboxy-terminális farok
 - a szövetspecifikus monomerek egymástól a végeik szerkezetében különböznek

Az intermediér filamentum alegysége: „coiled-coil” dimer

Heptád ismétlődés szerkezet, hidrofób aminosavak



Vimentin dimer szalagdiagramja



Vimentin dimer drótháló diagramja

Intermedier filamentumok csoportosítása

Szövetspecifitás alapján (Klasszikus csoportosítás)

Szövet típus	Intermedier filamentum
Epithelium	Keratinok
Izom	Dezmin
Mesenchyma	Vimentin
Glia	Glialis fibrillaris savanyú fehérje (GFAP)
Ideg	Neurofilamentum (NF-L, NF-M, NF-H)

Intermedier filamentumok polimerizációja

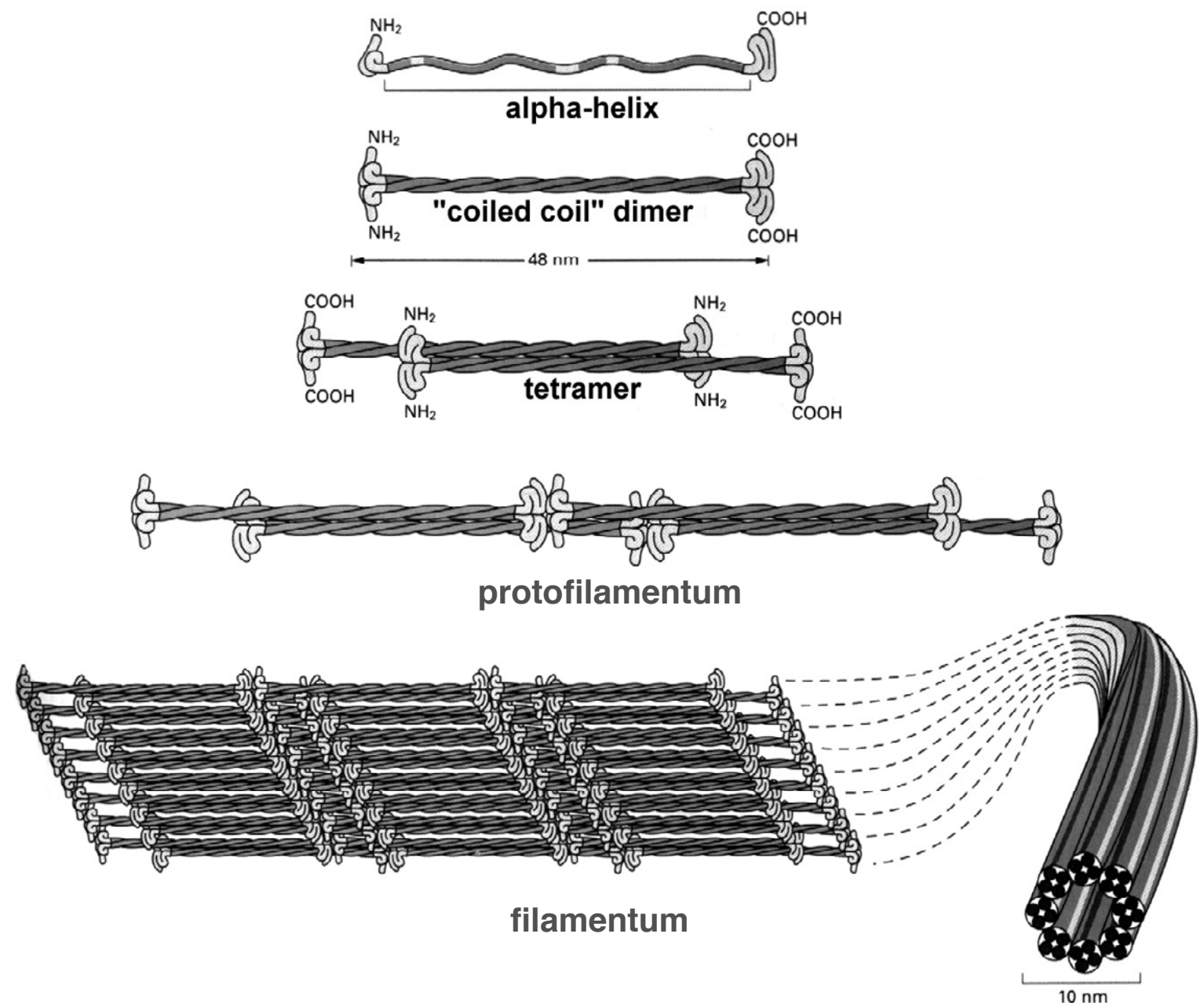
A sejtben teljesen polimerizált állapotban
(nem dinamikus egyensúly)

Centrális rudak (α -hélix)
hidrofób-hidrofób kölcsönhatása
-> coiled-coil dimer

2 dimer -> tetramer
(antiparallel elrendeződés,
szerkezeti apolaritás)

Tetramerek longitudinális sorozata
-> protofilamentum

8 protofilamentum -> filamentum

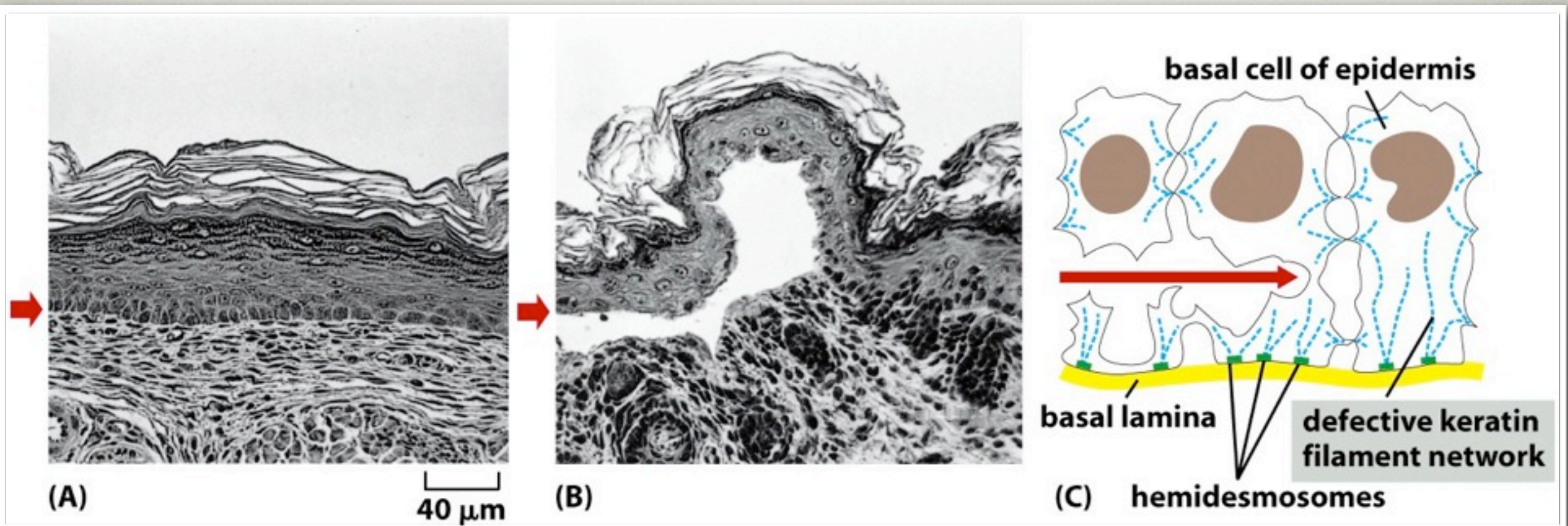


Intemedier filamentumok szöveti funkciói

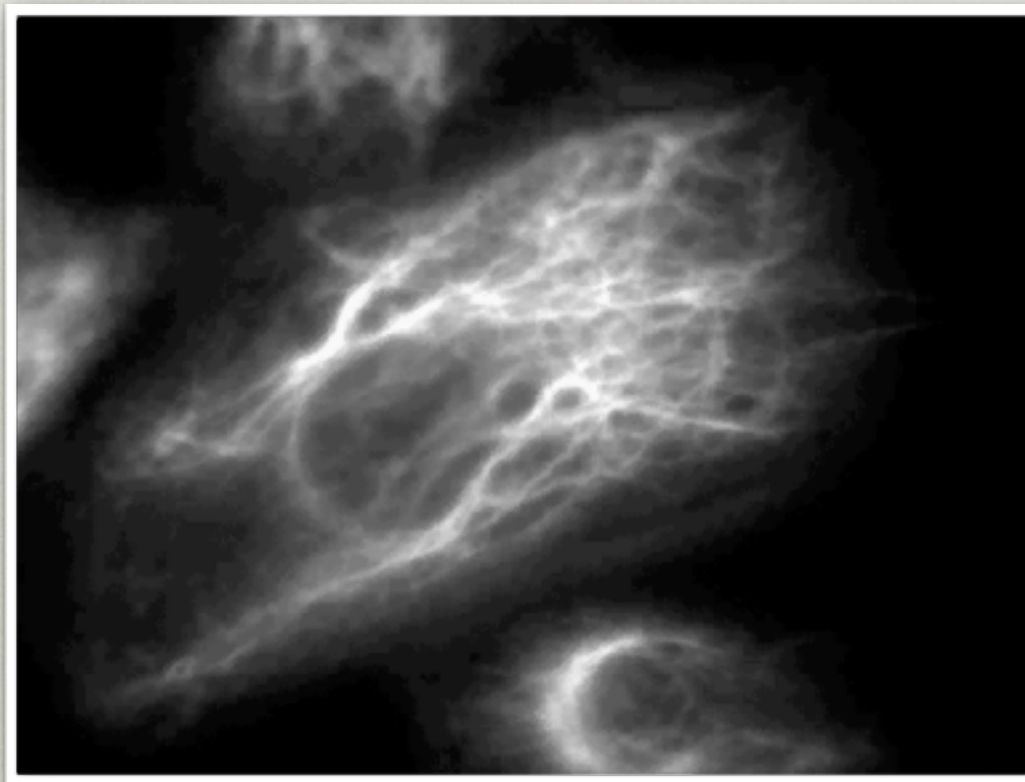
Szöveti mechanikai stabilitás biztosítása

Epiteliális (hám-) sejtekben:

- Pathologia: *epidermolysis bullosa simplex*. Mutáció a keratin génben.
- Enyhe mechanikai hatásra (pl. dörzsölés) fellépő hólyagos hámszétesés.



Dinamikus vimentin átrendeződés az élő sejtben



GFP-konjugált
vimentin 3T3 sejtben



Egyedi filamentum
turnover

MOTORFEHÉRJÉK

1. Specifikus filamentumhoz kapcsolódnak.
2. Elmozdulást és erőt generálnak.
3. Kémiai energiát használnak fel.

A motorfehérjék típusai

1. Aktin alapú

Miozinok: Konvencionális (miozin II) és nem-konvencionális Miozin szupercsalád (I-XXIV osztályok). Plusz vég irányába mozognak.

2. Mikrotubulus alapú

a. Dineinek: Ciliáris (flagelláris) és citoplazmáris dineinek.

A mikrotubulus mentén a minusz vég irányába mozognak.

b. Kinezinek: Kinezin szupercsalád: konvencionális és nem-konvencionális.

A mikrotubulus mentén a plusz vég irányába mozognak.

c. Dinaminok: MT-függő GTPáz aktivitás

Biológiai szerep: vakuoláris fehérjeválogatás (pinchase enzimek)?

3. DNS alapú mechanoenzimek

DNS és RNS polimerázok, vírus kapszid csomagoló motor, kondenzinek

A DNS fonal mentén haladnak és fejtenek ki erőt

4. Rotációs motorok

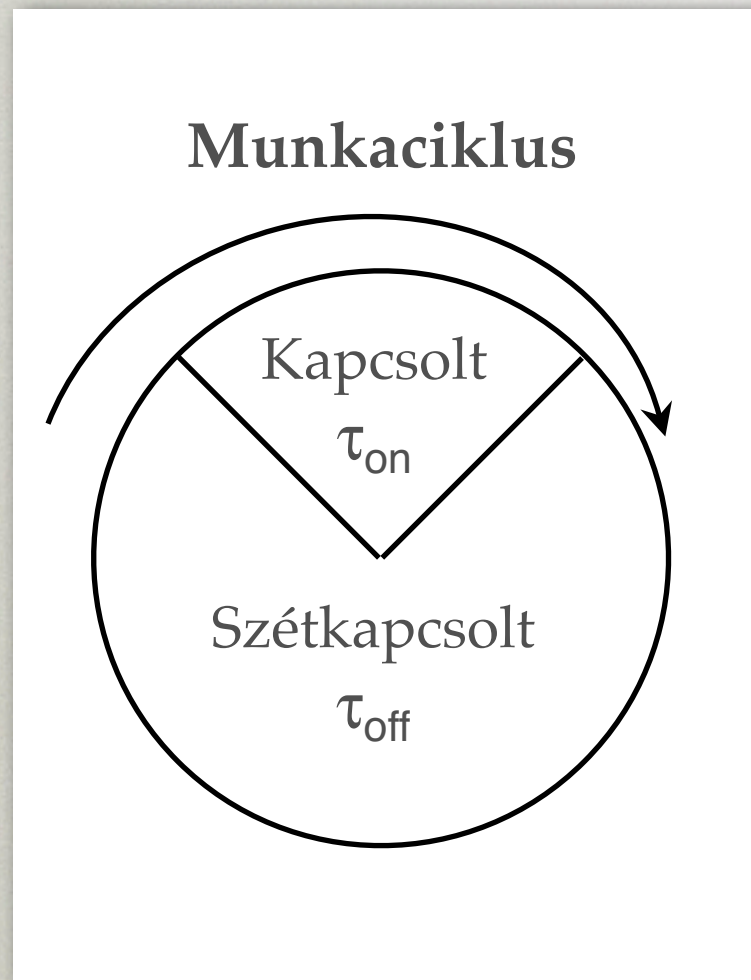
F₁F₀-ATP szintetáz

Bakteriális flagelláris motor

5. Mechanoenzim komplexek

Riboszóma

Motorfehérjék munkaciklusa



“Duty ratio”: $r = \frac{\delta V}{v}$

δ =munka- vagy lépéstávolság
 V =ATPáz sebesség
 v =motilitási sebesség

Processzív motor: $r > 1$

Pl. kinezin, DNS-, RNS-polimeráz.

Munkaciklus nagy részében kapcsolt állapotban.

Egymaga képes a terhet továbbítani.

Nonprocesszív motor: $r < 1$

Pl. miozin.

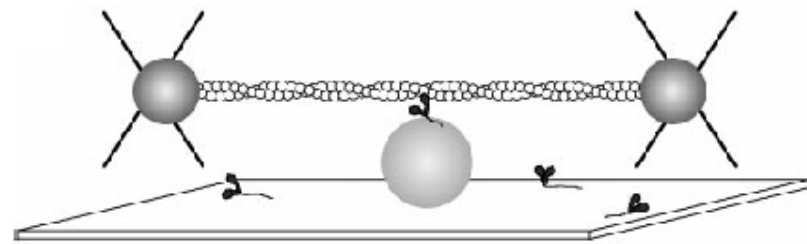
Munkaciklus nagy részében szétkapcsolt állapotban

Sokaság működik együtt.

Egyetlen motorfehérje által kifejtett **erő**: néhány pN.

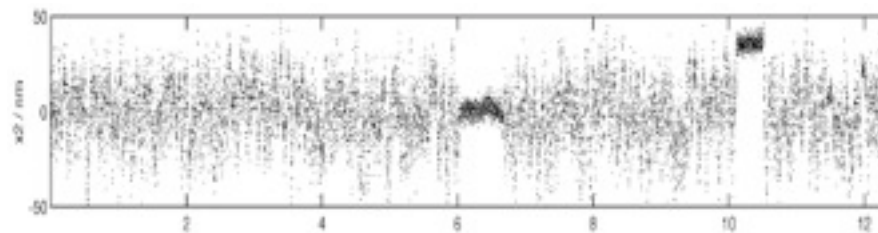
NEM-PROCESSZÍV MOTORFEHÉRJÉK

Miozin



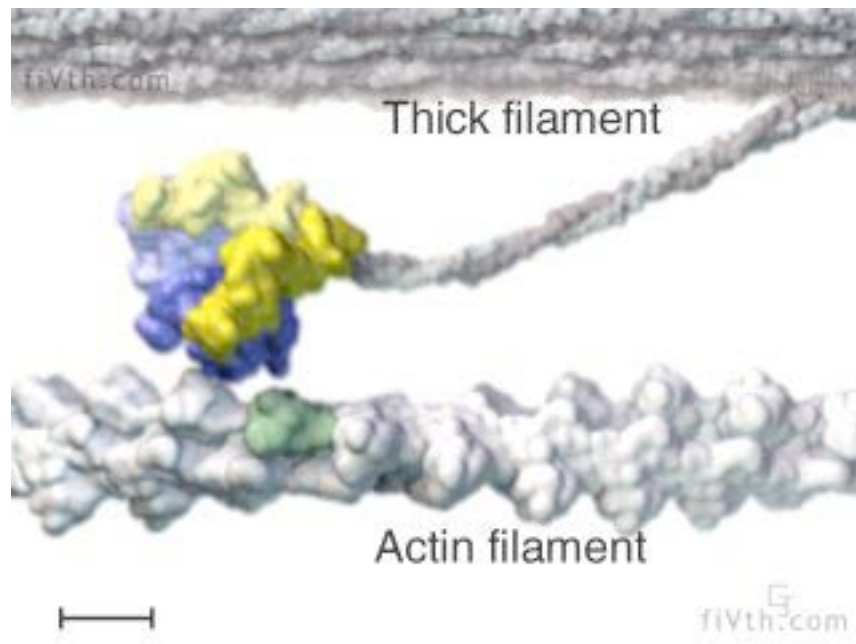
Három-gyöngy próba

Mikrogyöngy
elmozdulás



Idő

Knight et al, 2001.



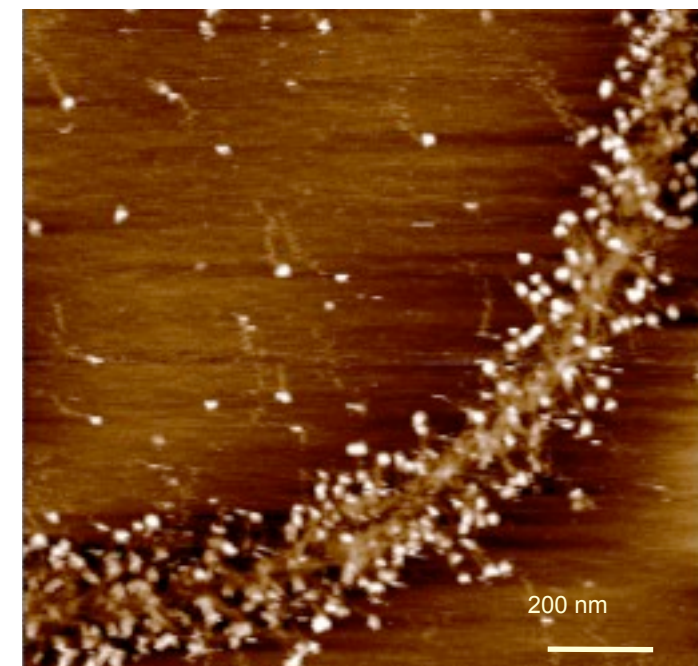
Thick filament

Actin filament

Lépéstávolság: 5,5 nm

(szomszédos aktin alegységek közötti távolság)

A nem-processzív motorok sokaságban dolgoznak.

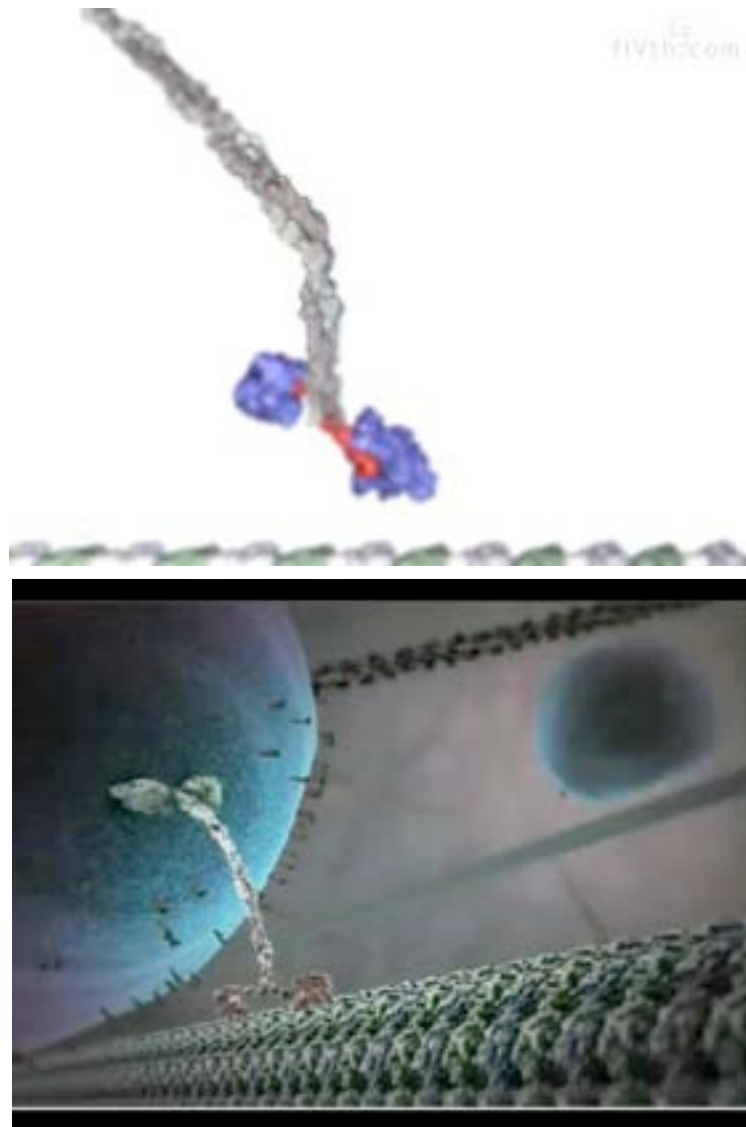


Szintetikus vastag filamentum
AFM felvétel

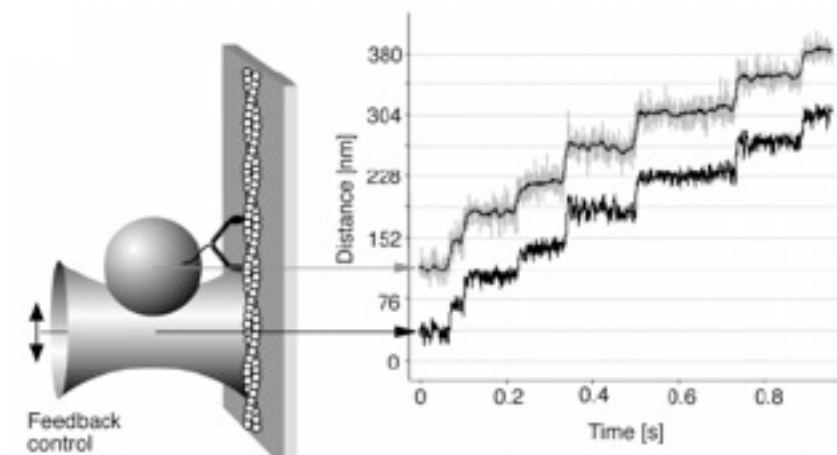
PROCESSZÍV MOTORFEHÉRJÉK

Kinezin

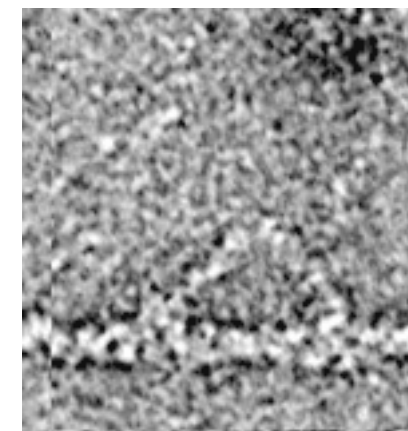
Lépéstávolság: 8 nm (minden második tubulin alegység közötti távolság)



Miozin V



Lépéstávolság: ~36 nm (aktin filament hélix félmenet emelkedés)

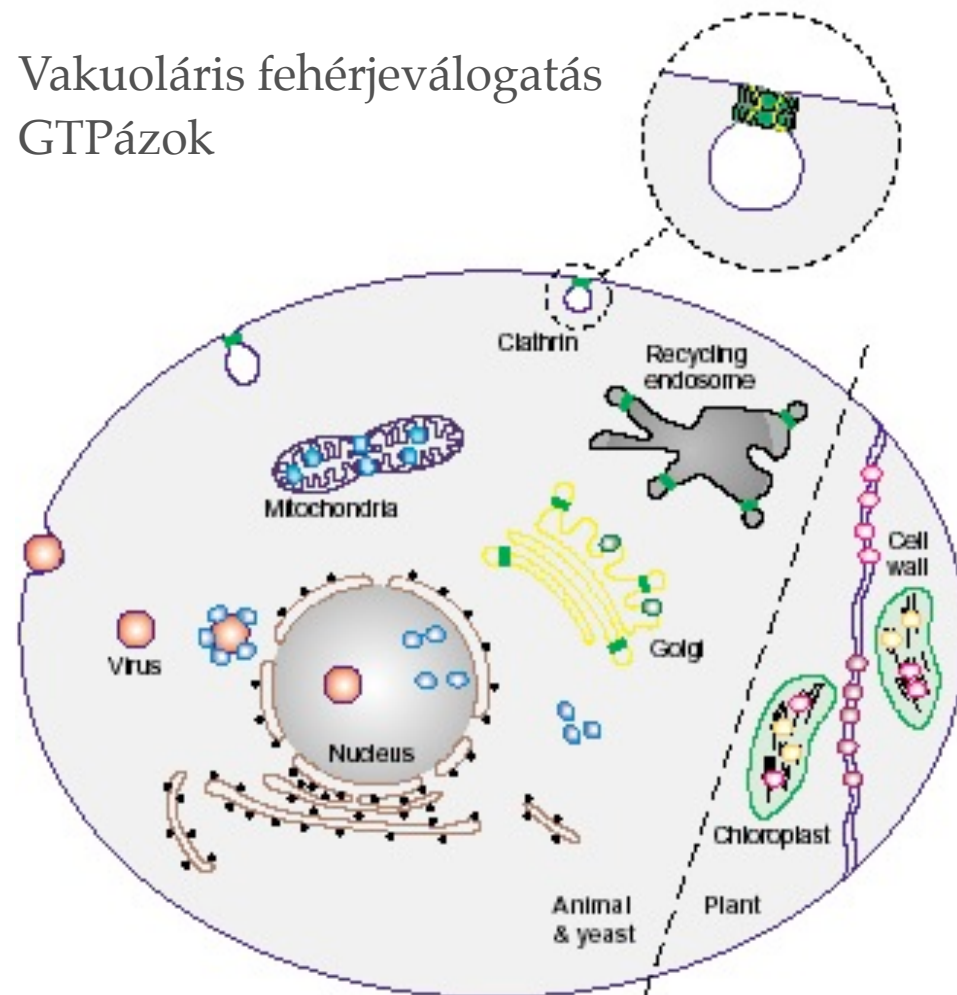


The Muscle Group, Leeds 2000

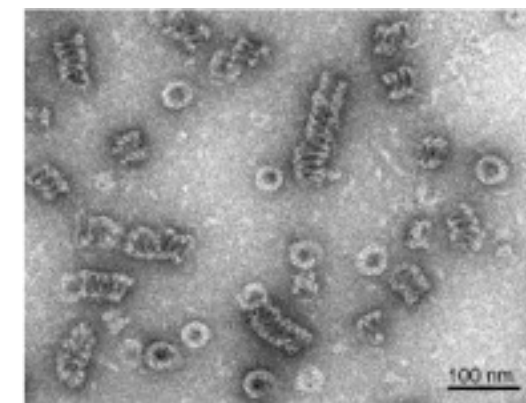
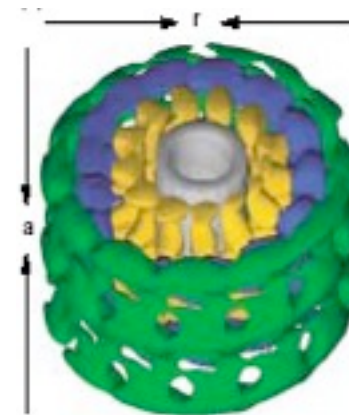
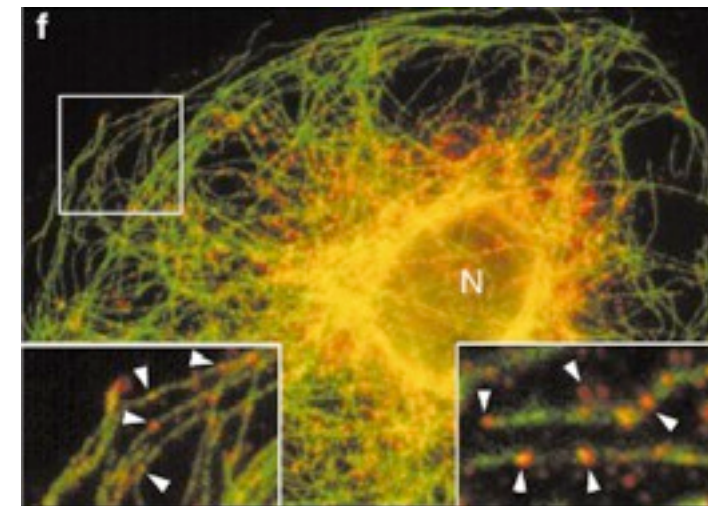
A processzív motorok egyedül dolgoznak.

Dinaminok

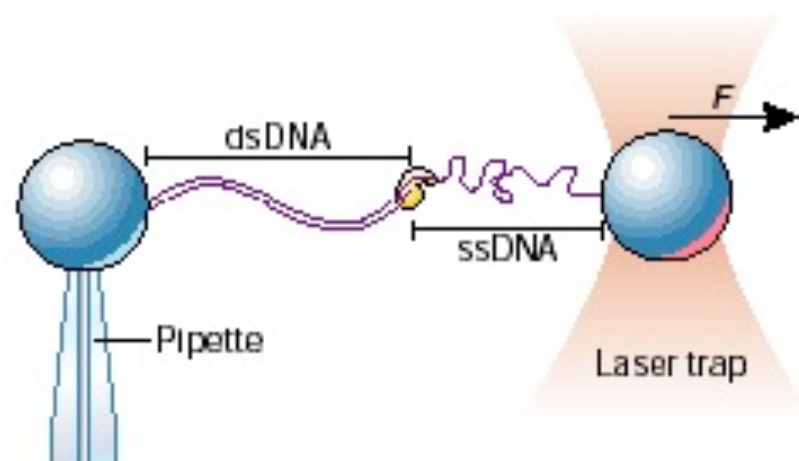
Vakuoláris fehérjeválogatás
GTPázok



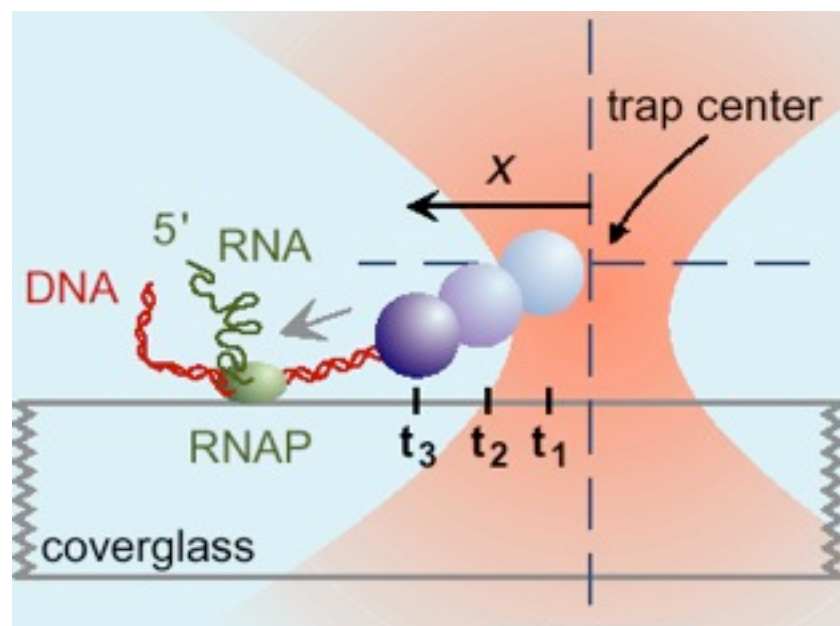
Protein	Localization	Function	Self-assembly
Dynamin	Plasma membrane (clathrin coated, caveolae), Golgi, endosomes	Vesicle formation, fission	+
Vps1	Golgi	Vesicle formation and transport	Unknown
Dnm1/Drp1/DRP-1	Mitochondria outer membrane	Mitochondrial fission & morphology	+
Mgm1/Msp1/OPA1	Mitochondria inner or outer membrane, or matrix	Mitochondrial morphology	Unknown
Phragmoplastin	Cell wall	Membrane morphology	+
ADL1	Cell wall, chloroplast	Membrane biogenesis	+
AOL2	Chloroplast	Unknown	Unknown
hGBP1	Cytoplasm	Anti-viral activity	+
Mx	Cytoplasm, nucleus	Anti-viral activity	+



DNS Motorok

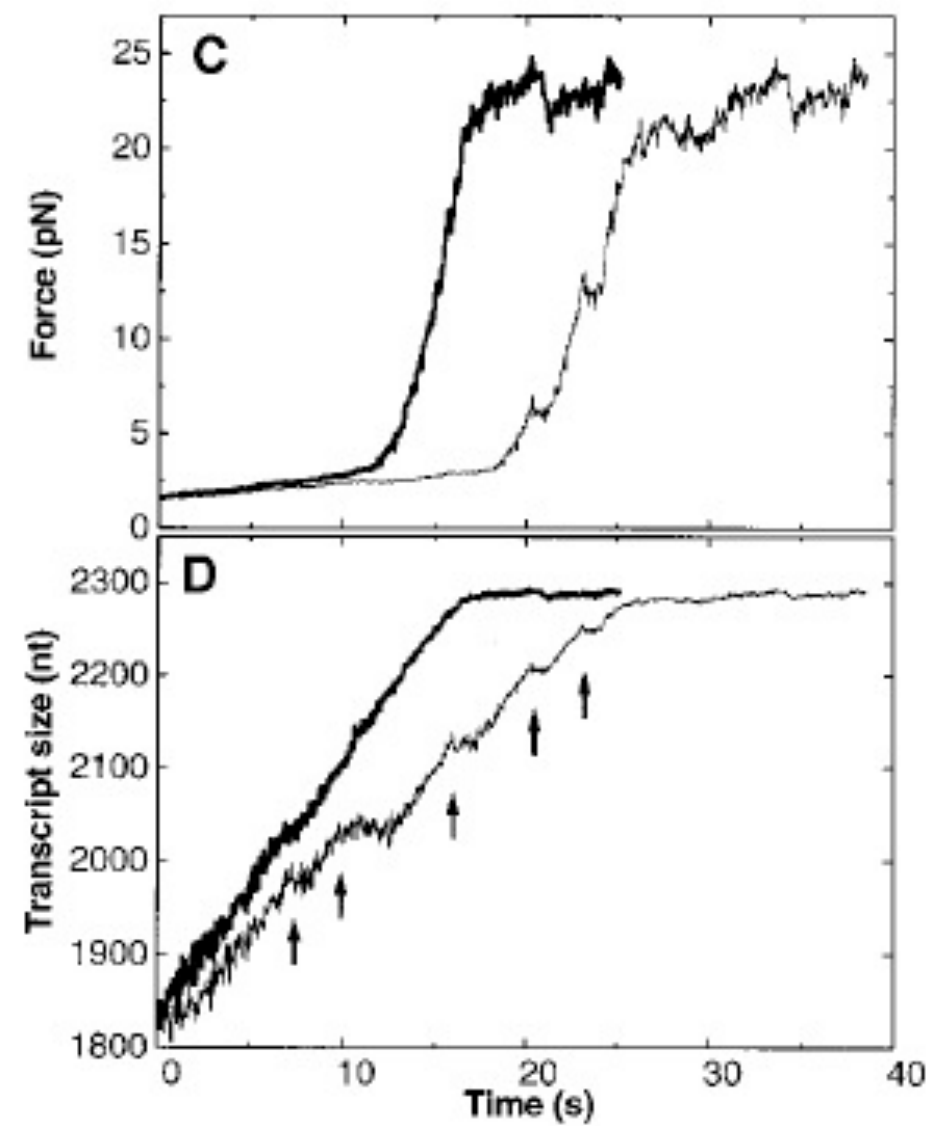


T7 DNS Polimeráz



RNS Polimeráz

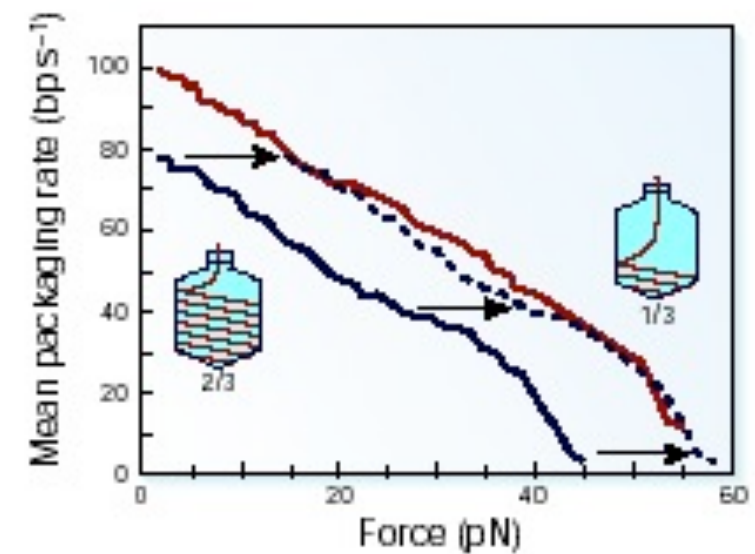
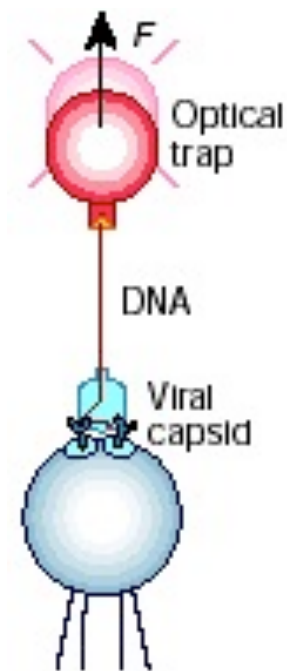
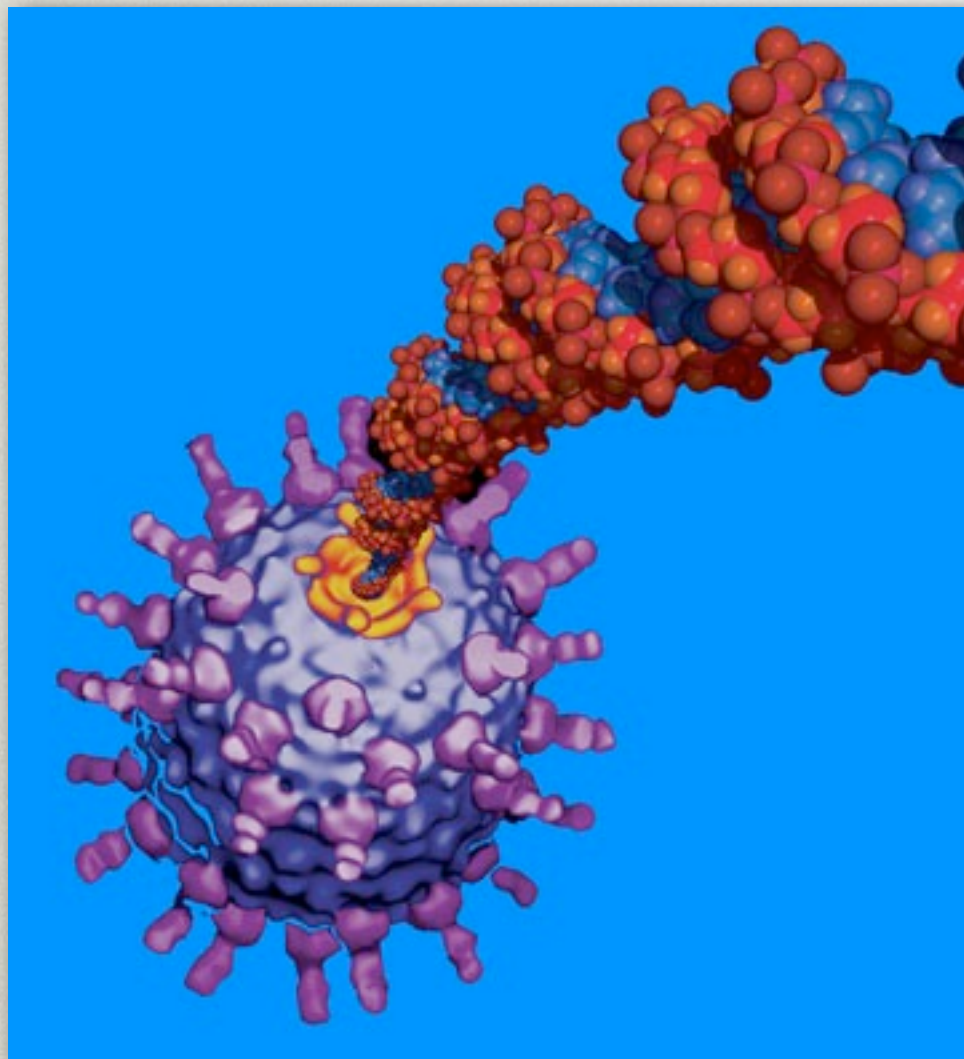
Processzív motorok



RNS Polimeráz , Wang et al. 1998.

Vírus portális motor

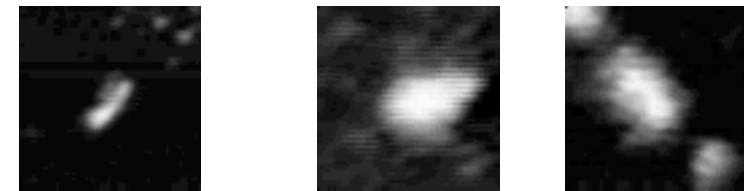
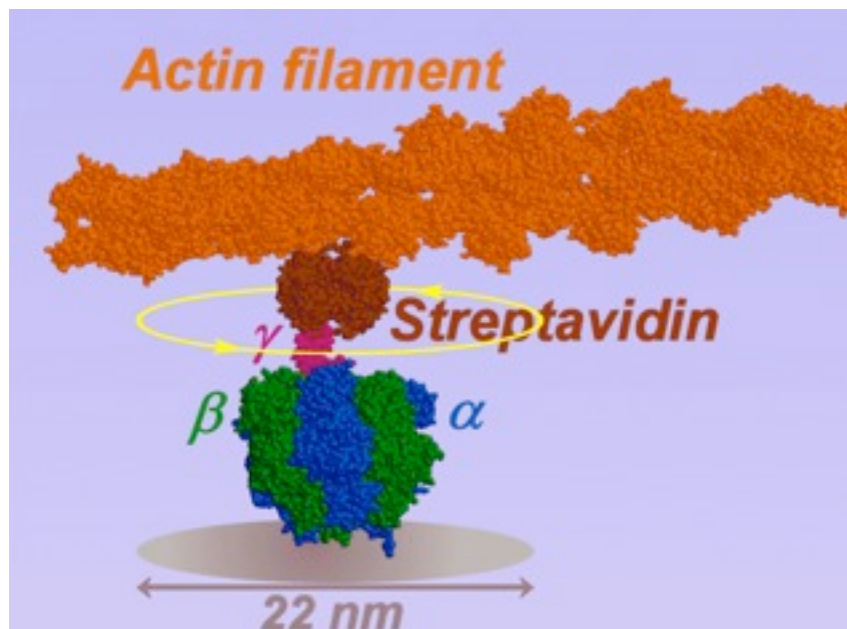
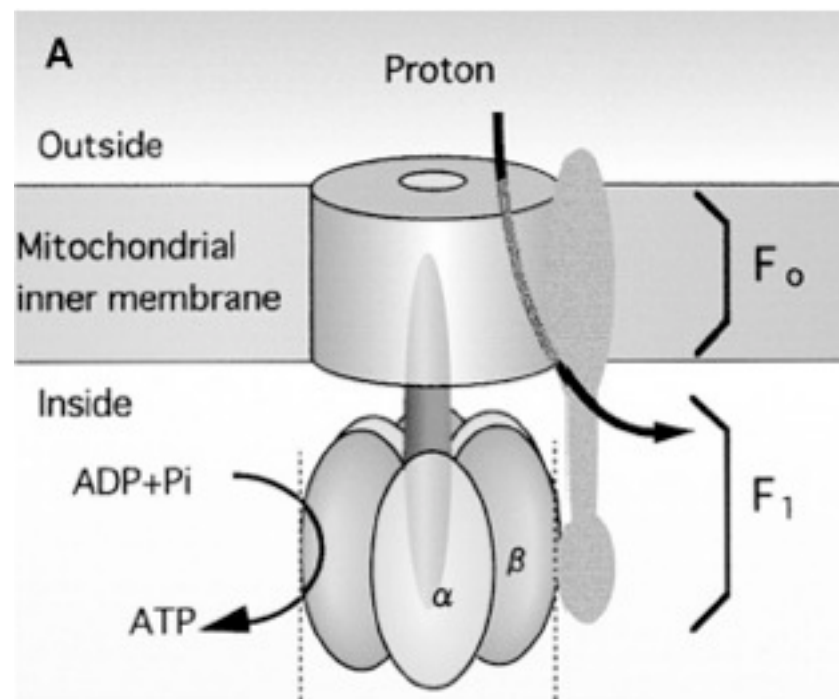
Különleges DNS motor



$\phi 29$ bakteriofág portális motor

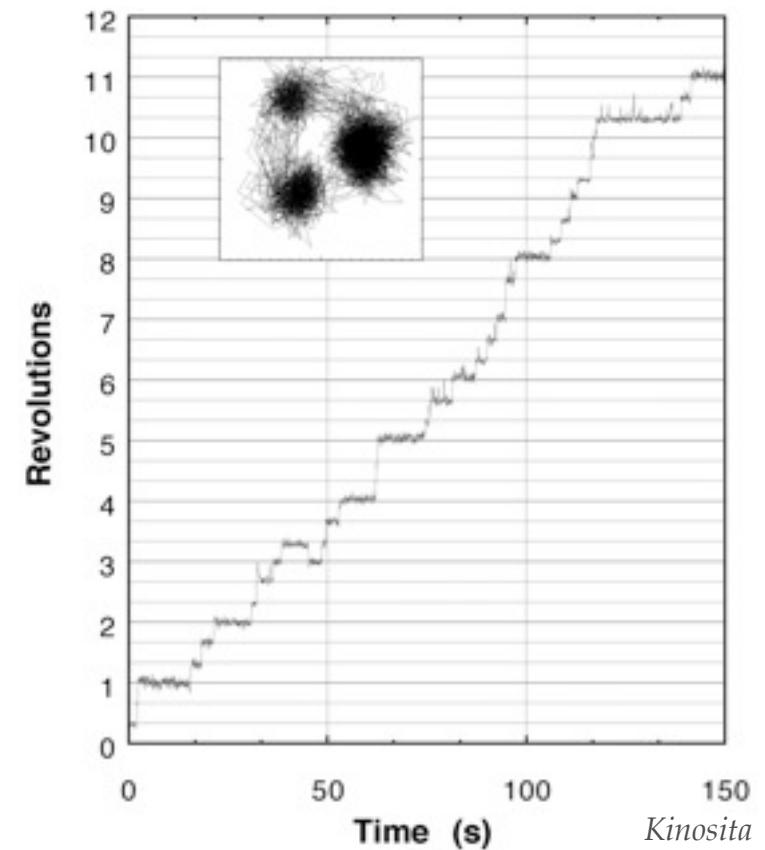
ROTÁCIÓS MOTOROK I:

F₁F₀-ATP SZINTETÁZ



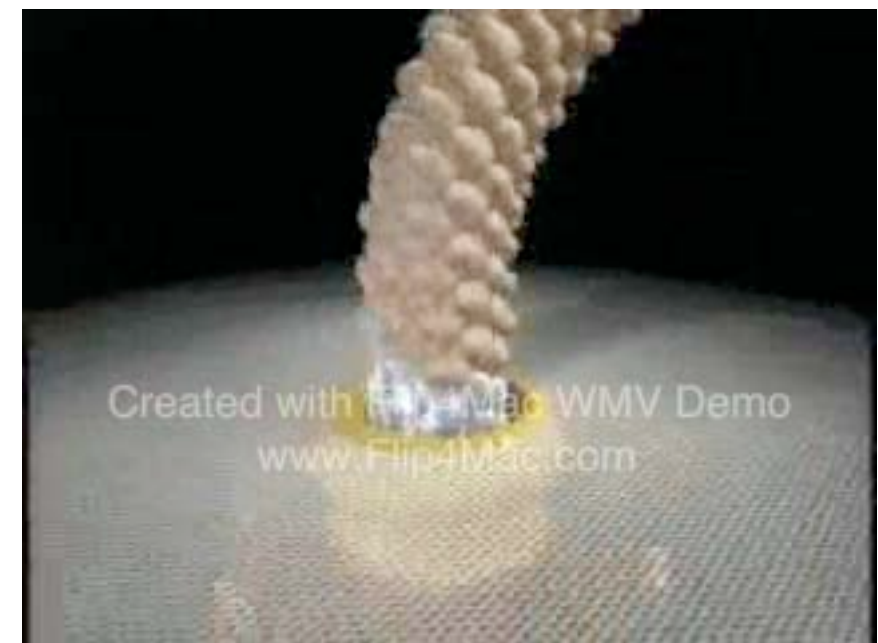
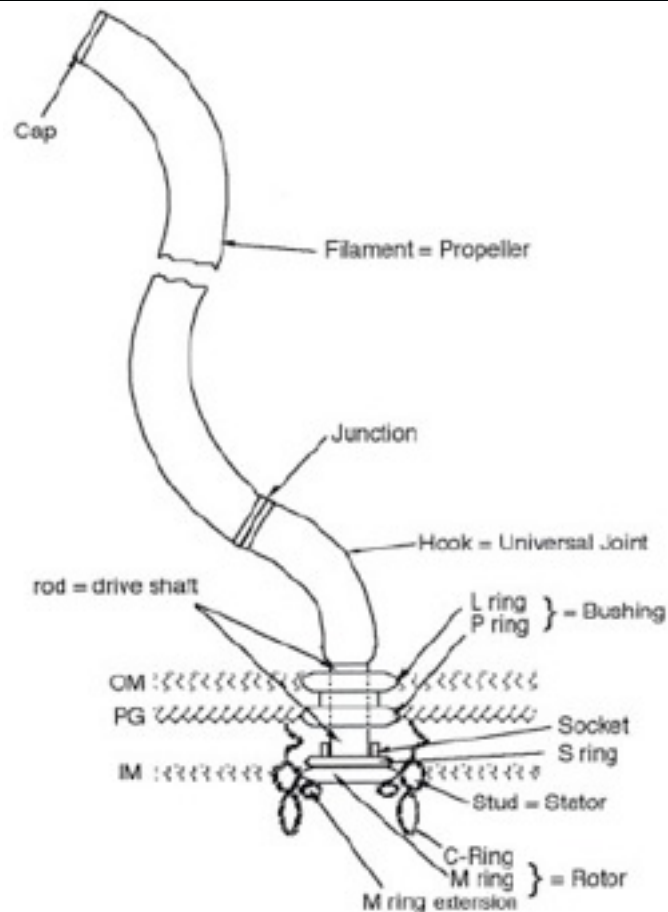
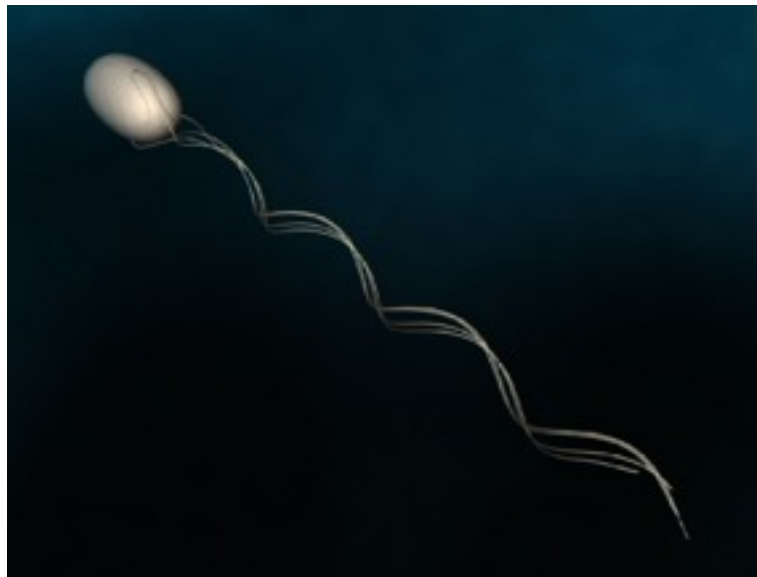
20 nM ATP 200 nM ATP

Diszkrét 120° rotációs lépések



ROTÁCIÓS MOTOROK II:

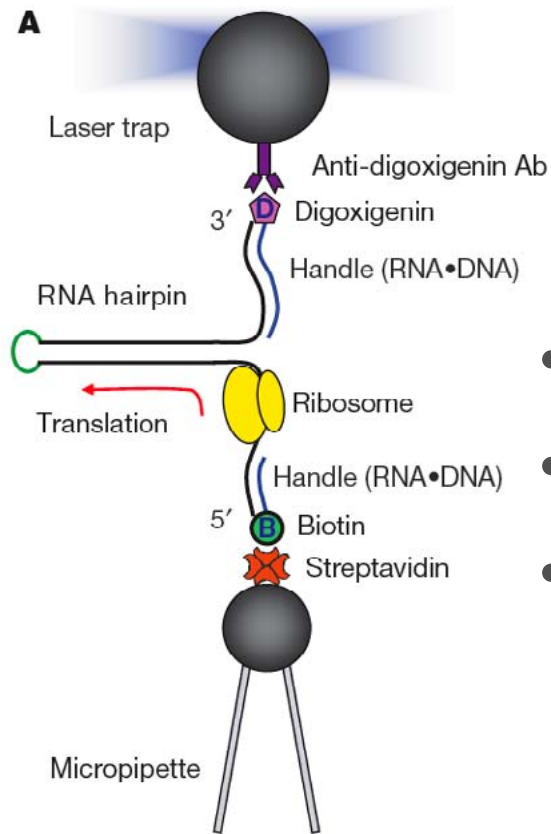
Bakteriális flagellum motor



Fordulatszám: > 20000 rpm
 Fogyasztás: 10^{-16} W
 Hatásfok: > 80%
 Energiaforrás: protonok

Mechanoenzim komplex

Riboszóma



- 2.7 nm-es lépések (egy triplett)
- 0.078 s transzlokációs idő
- Transzlokációval csatolt helikáz aktivitás

