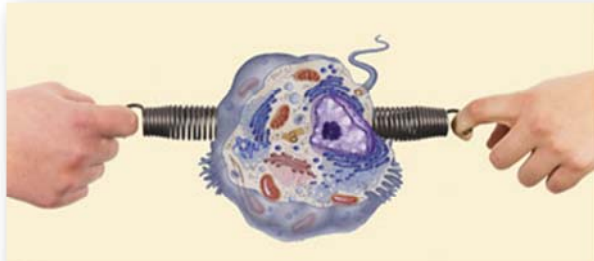


## A citoszkeletális rendszer. Motorfehérjék. A biológiai mozgás molekuláris mechanizmusai.



[http://www.rsc.org/images/b901714c-400-FOR-TRIDION\\_tcm18-152053.jpg](http://www.rsc.org/images/b901714c-400-FOR-TRIDION_tcm18-152053.jpg)



Kiss Balázs

MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport,  
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

2014. február 19.

## Előadásvázlat

TK. 345-353. oldal

- citoszkeleton
  - története
  - polimer mechanika
  - vizsgálómódszerek
  - polimerizáció
  - aktin
- 10 perc szünet
- mikrotubulusok
- intermedier filamentumok
- motorfehérjék
  - típusok
  - munkaciklus
  - animációs bemutató

## LEHETSÉGES

### releváns szigorlati tételek

A citoszkeletális rendszer.

Citoszkeletális filamentumok  
polimerizációja.

Az aktin filamentális rendszer. Aktin-  
függő mozgások.

A mikrotubuláris rendszer.

Mikrotubulus-függő mozgások.

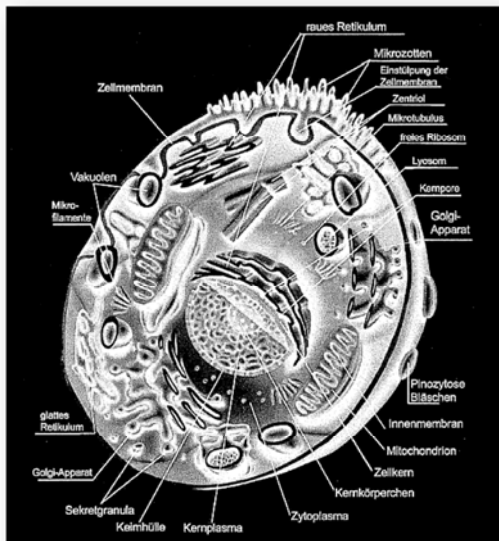
Az intermedier filamentális rendszer.

Motorfehérjék. Munkaciklus.

Processzivitás.

2

## Történeti áttekintés



### régi megközelítés:

- sejt: kolloidális rendszer
- membránhoz kapcsolt képletek, organellek
- citoszkeleton: 1-2% térfogatarány a sejten belül

### „nagy nevek”:

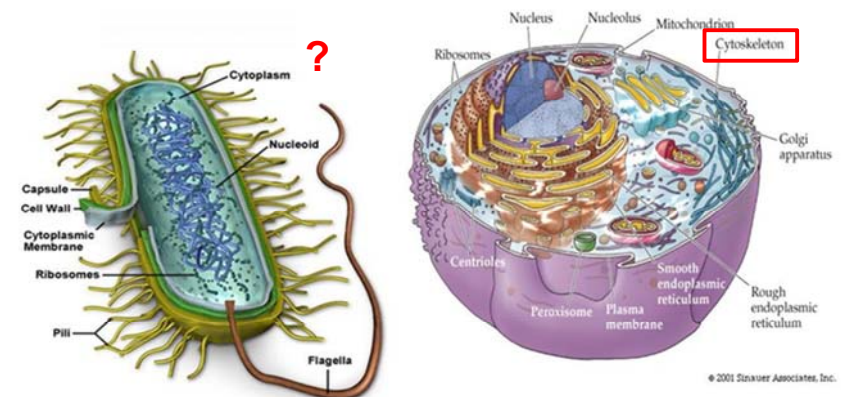
- Nyikolaj Koltszov (1903):  
tubuláris fehérjehálózat:  
sejt alakja
- Rudolph Peters (1929):  
fehérje-mozaik: biokémia
- Paul Wintrebert (1931):
- *cytosquelette*

3

## Prokarióta



## Eukarióta



prokarióta „citoszkeleton”: analóg az eukarióta citoszkeletonnal

4

## A citoszkeleton

- eukarióta sejtek dinamikus vázrendszere
- nagy vég-vég távolság (=„filamentum”):
- hálózatképzés már kis koncentrációban is

három fő filamentum-osztály:

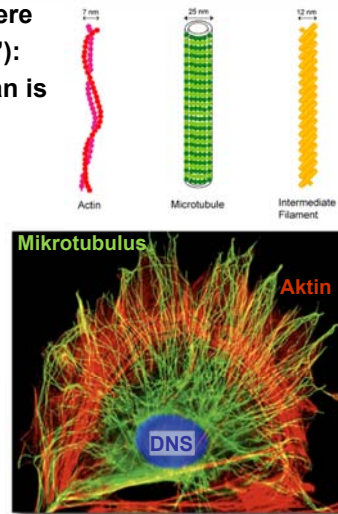
- vékony (aktin) ( $d \sim 7 \text{ nm}$ )
- intermedier ( $d \sim 10 \text{ nm}$ )
- mikrotubulus ( $d \sim 25 \text{ nm}$ )

+ asszociált fehérjék

polimerizáció: monomer alegységekből

szerep:

- mozgás, alakváltozás
- mechanikai stabilizálás
- sejtsztódás, transzport

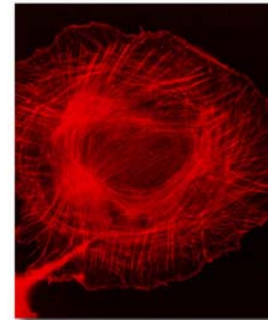


5

## A citoszkeleton filamentumai

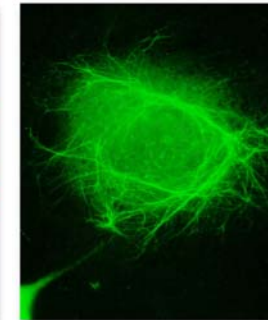
(fluoreszcencia-mikroszkópiával láthatóvá téve)

VÉKONY (aktin)



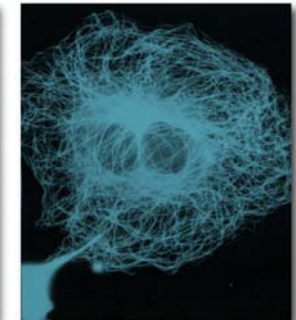
Aktin  
(rodamin-falloidin)

INTERMEDIER



Vimentin  
(anti-vimentin)

MIKROTUBULUS



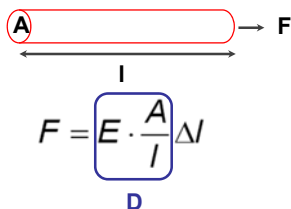
Mikrotubulusok  
(GFP-tubulin)

6

## Polimer mechanika: Hooke-rugalmasság

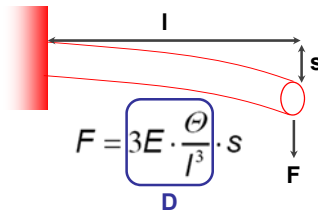
- a rugóállandó ( $D = F/\Delta l$ ) nem csak anyagfüggő
- a rugóállandó ( $D$ ) függ a test alakú paramétereitől, az erő irányától

Longitudinális merevség:



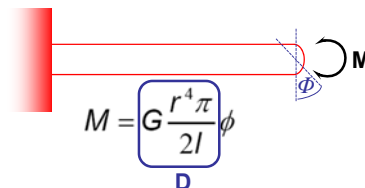
E: rugalmassági modulus (Young-modulus)

Hajlítómerevség:



$\theta$ : hajlítási tehetetlenségi nyomaték

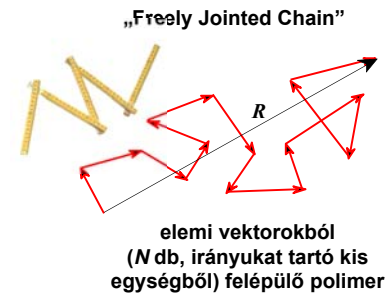
Torziós merevség:



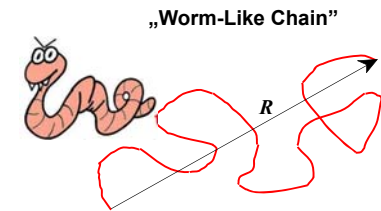
G: torziómodulus

7

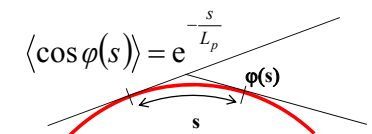
## Polimer mechanika: FJC, WLC



$l$  = korrelációs hossz  
(az elemi vektorok átlagos  
hossza)  
 $Nl = L$  = kontúrhossz  
 $R$  = vég-vég távolság



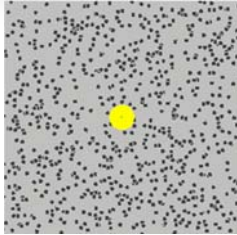
$L_p$  = perzisztenciahossz (milyen  
hosszú szakaszon belül tartja  
meg irányát a molekula)



- ha  $s \ll L_p$ :  $\cos(\varphi) \sim 1$ , és  $\varphi(s) \sim 0^\circ$
- ha  $s \gg L_p$ :  $\cos(\varphi) \sim 0$ , tehát  $\varphi(s)$   $0^\circ$  és  $360^\circ$  közötti

8

## Kitérő: Brown-mozgás



$$\frac{1}{2}mv^2 = \frac{3}{2}k_B T \quad (\text{ideális gázokra})$$

A különböző sebességgel mozgó kis részecskék (fekete molekulák) ütközése következtében a nagyobb, sárga részecske rendezetlen véletlenszerű mozgást végez.

## Kitérő: Entrópia

a rendezetlenséget / adott állapot termodinamikai valószínűségét jellemzi



„termikus” gerjesztés

munkavégzés



9

## Polimer mechanika: „termikus” rugalmasság

$$L_p = \frac{E\Theta}{k_B T}$$

$\Theta$  : hajlítási tehetetlenségi nyomaték (másodrendű nyomaték) - körkeresztmetszetű rúd esetén:  $\Theta = r^4 \pi / 4$

merev lánc

$$L_p \gg L$$



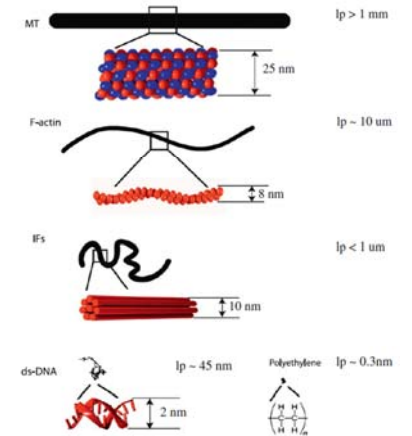
szemiflexibilis lánc

$$L_p \sim L$$



rugalmas lánc

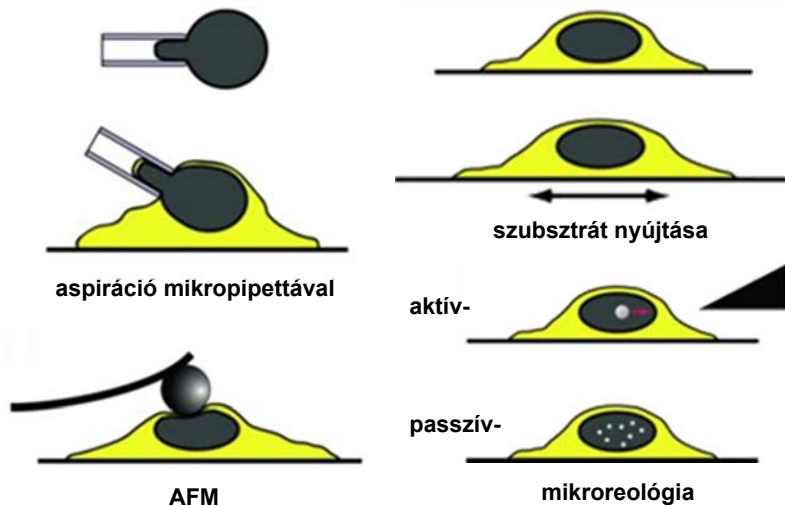
$$L_p \ll L$$



10

## Mechanikai vizsgálómódszerek

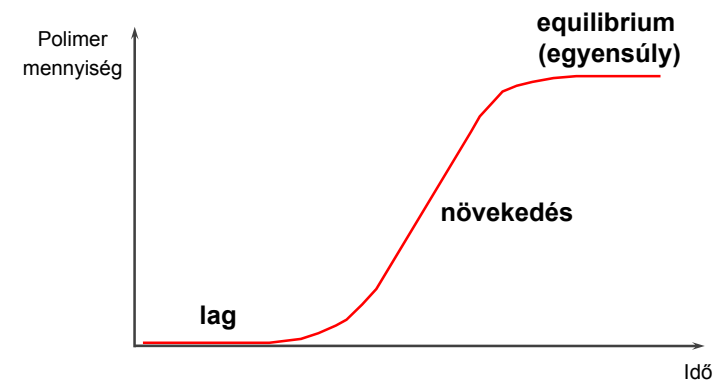
(sejtmagra, sejtre alkalmazhatók)



11

## A polimerizáció szakaszai

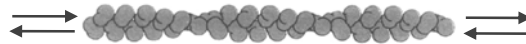
1. Lag fázis: nukleáció
2. Növekedés fázisa
3. Equilibrium (egyensúly) fázisa



12

## Polimerizációs egyensúlyok

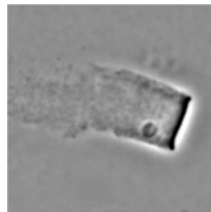
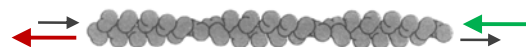
### 1. valódi equilibrium:



### 2. dinamikus instabilitás: folyamatos, lassú növekedést követő katasztrofális depolimerizáció



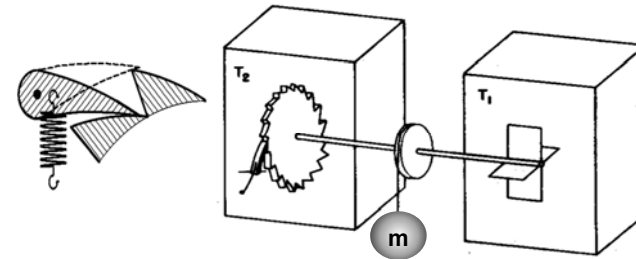
### 3. treadmilling: taposómalom



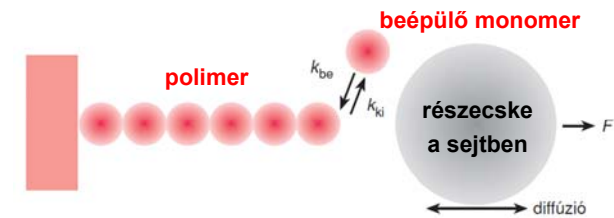
13

## Erőkifejtés a polimerizációval

(Brown-féle kilincskerék vagy racsnis kerék)



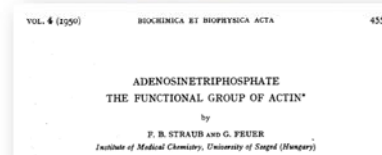
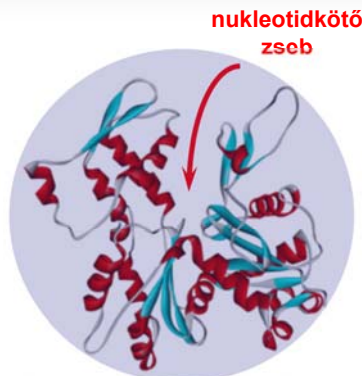
csak akkor működőképes, ha  $T_1 > T_2$



14

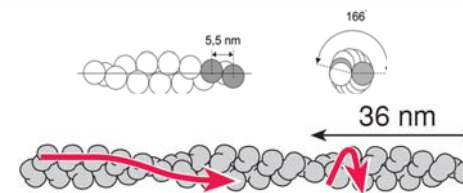
## Aktin monomer (G-aktin)

- aktin: összfehérje 5%-a (eukarióta sejtekben),
- alegység: globuláris (G) aktin,
- 43 kDa molekulasúly, 4 szubdomén (kovalens kötésekkel kapcsolódnak)
- Koncentrációja a sejtben: 2-8 mg/ml (50-200  $\mu$ M): 25 nm átlagos molekulák közötti távolság, ha oldatban lennének...
- 1 molekula kötött adenosin nukleotid (ATP vagy ADP).



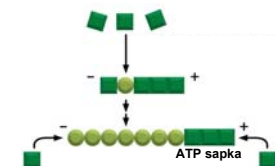
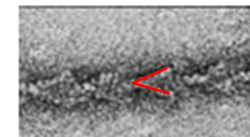
15

## Aktin filamentum (F-aktin)



### szerkezete, tulajdonságai:

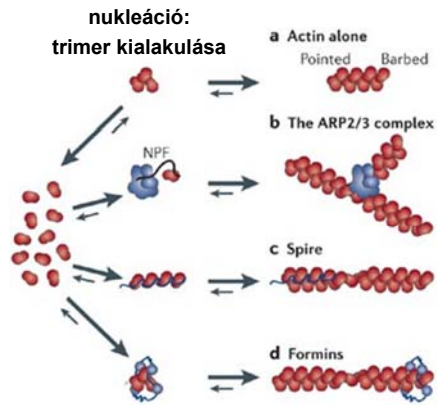
- ~7 nm vastag, hossza *in vitro* több 10  $\mu$ m, *in vivo* 1-2  $\mu$ m; jobbmenetes dupla hélix; balmenetes alacsony emelkedésű hélix,
- szemiflexibilis polimerlánc ( $L_p$ : ~10  $\mu$ m),
- szerkezeti polarizáció:
  - szögcs vég: +,
  - hegyes vég: -
- aszimmetrikus polimerizáció: ATP sapka (a + végen).



16



## Aktin nukleációját szabályozó fehérjék



spontán nukleáció valószínűtlen  
(az aktin dimer instabil)

**Arp2/3:** egy dimert/trimert utánoz,  
elágazások létrejöttéért felelős

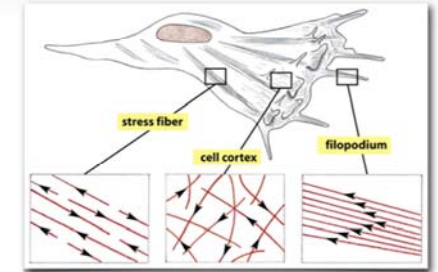
**Spire:** 4 alegységet stabilizál  
hosszanti irányban

**Formin:** dimerizálva aktin dimert  
vagy trimert stabilizál,  
+ végen marad („formin sapka”)

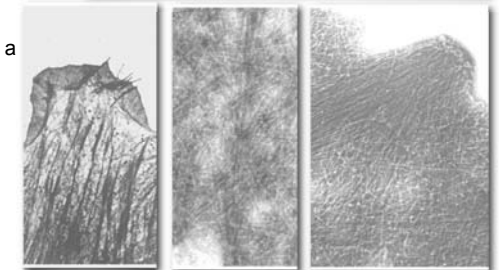
17

## Aktin filamentum előfordulása

- **cortex** (a sejt pereme),
- **stresszrostok:** keresztkötött aktinháló motorfehérjékkel (korábbi elképzelés: feszülés hatására jelenik meg); mechanikai erő az adhéziohoz

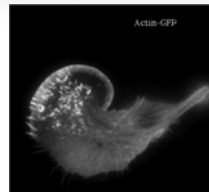
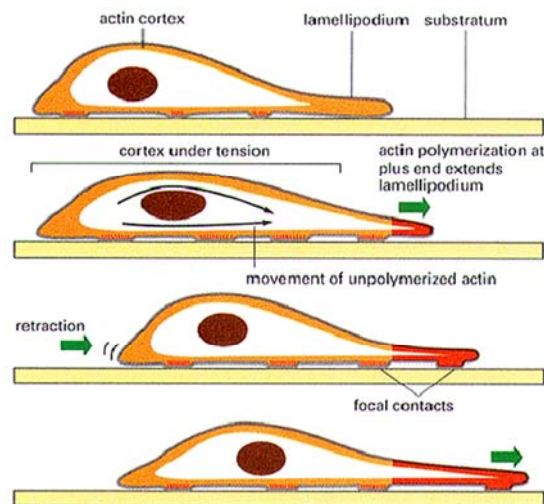


- **sejtnyúlványok:**
  - **lamellipodium:** „álláb”: 2D aktinháló a sejt mobilis oldalán, a sejtet hajtja előre,
  - **filopodium:** fokális adhéziót alakít ki a felülettel,
  - **mikrovillus:** a sejt fajlagos felületét növeli; adszorpció; jelátvitel



18

## Aktin-vezérelt sejtmozgás



1. „protrusio” (sic):  
aktin polimerizáció és  
álláb kitüremkedés

2. letapadás:  
fokális kontaktusok  
(integrinek és aktinkötegek)

3. „tractio” + „retractio”

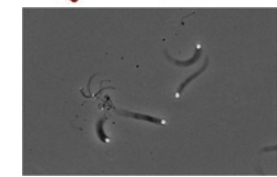
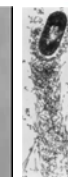
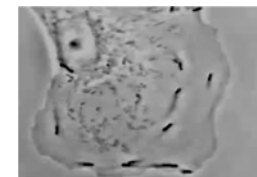
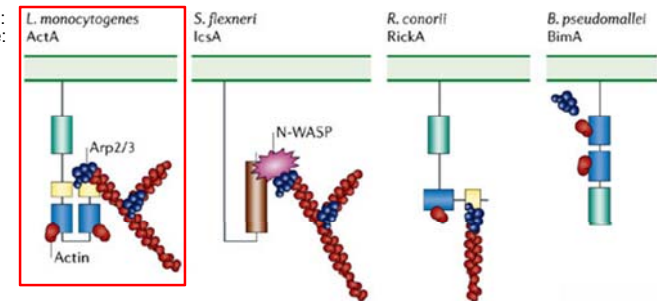
4. az álláb további  
növekedése

19

## Baktériumok intracelluláris mozgása

(az aktinhálózatot használják a „közlekedésre”)

baktérium:  
kötőfehérje:

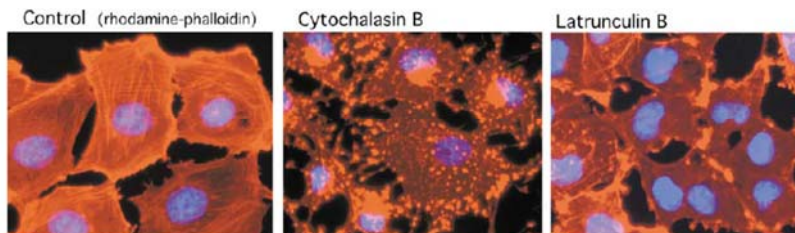


20

## Aktin, mint orvosi célpont

(hatásmechanizmus: aktin dinamika gátlása)

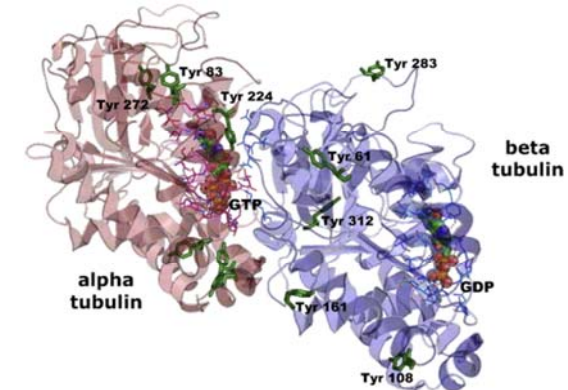
vegyület	célpont	kórkép / alkalmazás
falloidin (gyilkos galóca)	F-aktint köt, depolymerizációt gátol	gombamérgezés
cytochalasin (chalis: relaxáció)	monomer beépülést gátol	kísérleti daganatterápia
latrunculin	aktin monomer (nukleotidkötő-zseb)	kísérleti daganatterápia



21

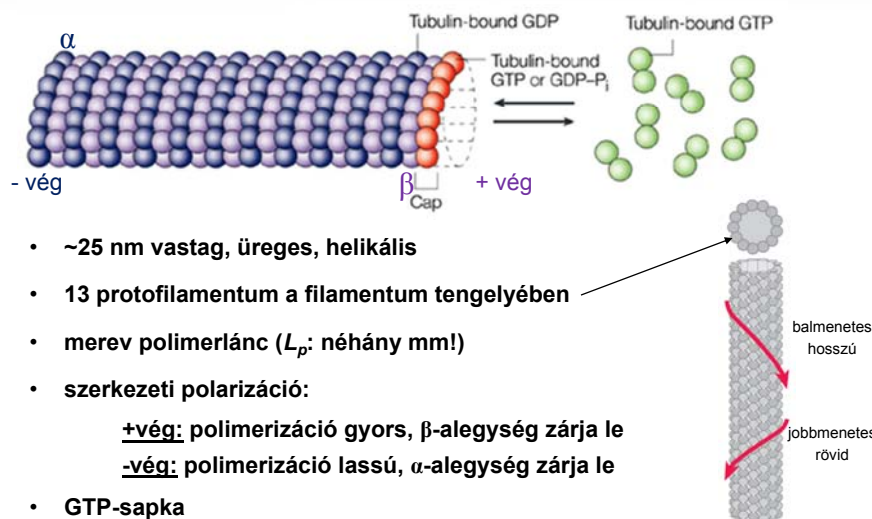
## A mikrotubuláris rendszer

- alegység: tubulin ( $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin), ~ 50 kDa
- idegszövetben az összfehérje 10-20%-a
- 1 kötött guanozin nukleotid (GTP vagy GDP) / alegység
- a nukleotid lehet kicserélhető ( $\beta$ ), illetve nem kicserélhető ( $\alpha$ )



22

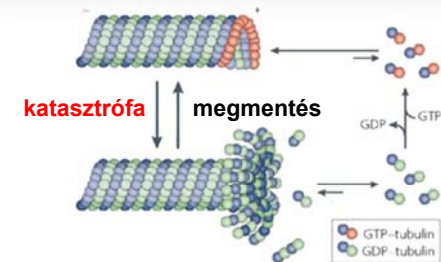
## A mikrotubulus



- ~25 nm vastag, üreges, helikális
- 13 protofilamentum a filamentum tengelyében
- merev polimerlánc ( $L_p$ : néhány mm!)
- szerkezeti polarizáció:
  - +vég: polimerizáció gyors,  $\beta$ -alegység zárja le
  - vég: polimerizáció lassú,  $\alpha$ -alegység zárja le
- GTP-sapka

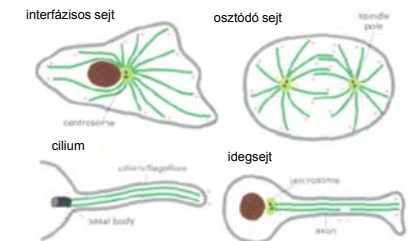
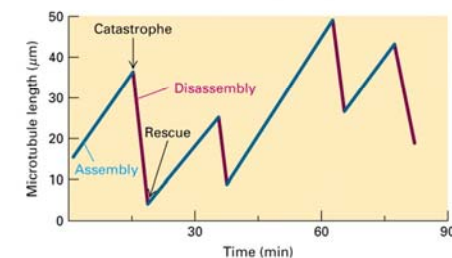
23

## A mikrotubulusok dinamikája, előfordulása



Hol található az eukarióta sejtben?

- interfázisos sejt citoplazmája,
- axon,
- cilium, flagellum,
- osztódó sejt húzóorsója.

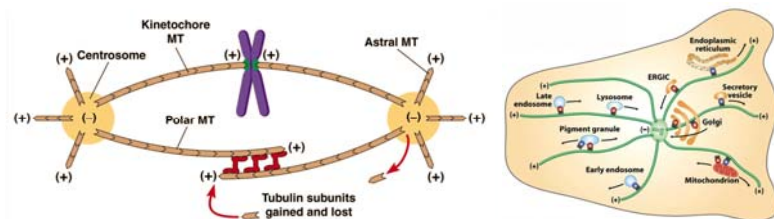


24

## A mikrotubulusok elhelyezkedése, funkciója

### Polaritás a sejtben belül:

- centroszómában -vég, a periférián +vég,
- centroszóma: 2 centriólum, centroszóma mátrix, benne  $\gamma$ -tubulin,
- sejt polaritás fenntartása asszociált fehérjék segítségével.



### Funkciók:

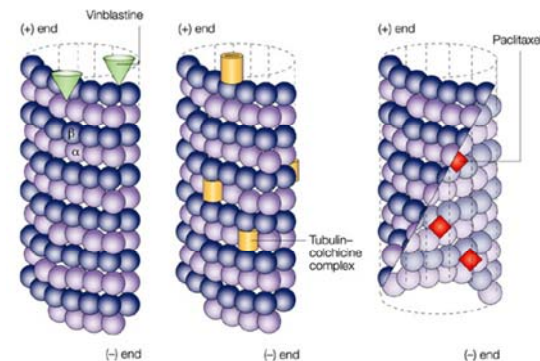
1. autópályák motorfehérjék számára,
2. érzékeli, monitorozza és megtalálja a sejt geometriai középpontját,
3. motilitási funkciók (sejtosztódás).

25

## Mikrotubulus, mint terápiás célpont

(hatásmechanizmus: MT dinamika gátlása)

vegyület	célpont	kórkép / alkalmazás
vinblasztin	mikrotubulus + vége	daganatok
kolhicin	tubulin dimer	köszvény
paclitaxel	mikrotubulus belseje	daganatok



26

## Intermedier filamentumok

- 8-10 nm átmérő
- kémiai ellenálló
- fibrózus monomer, polimerizáció ATP/GTP nélkül
- a szövetspecifikus monomerek egymástól a végeik szerkezetében különböznek:

hám	keratinok
izom	dezmin
kötőszövet	vimentin
glia	gliális fibrilláris savanyú fehérje
ideg	neurofilamentum

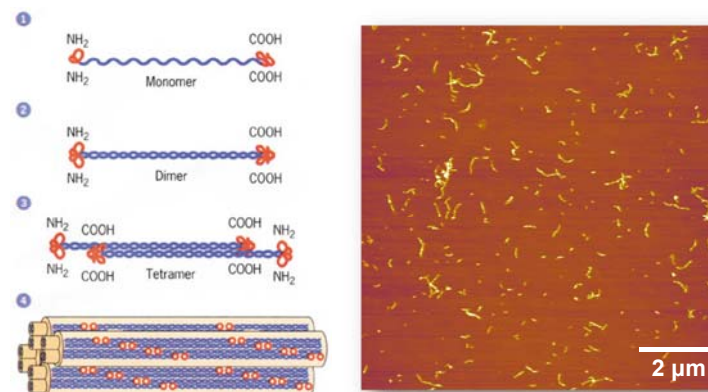
### Intermedier filamentum dimer:



27

## Intermedier filamentumok polimerizációja

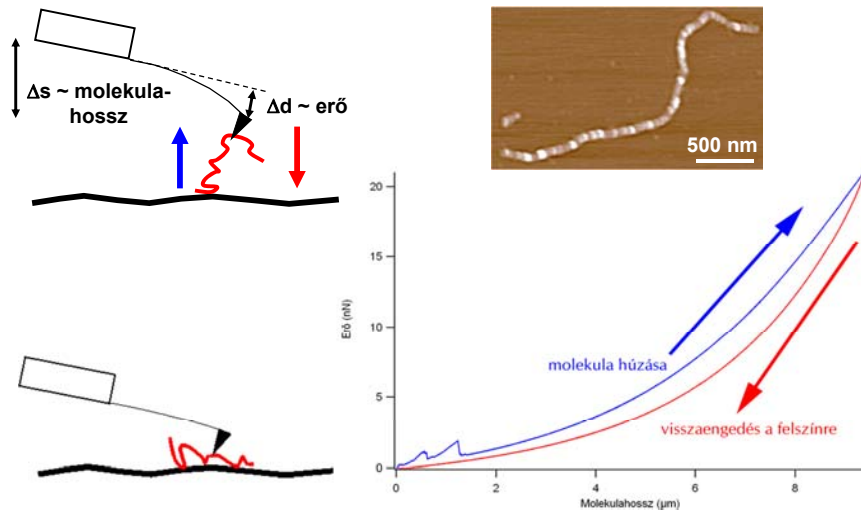
- a sejtben többnyire teljesen polimerizált állapotban vannak,
- nem mutatnak polimerizációs-depolimerizációs dinamizmust,
- foszforiláció hatására depolimerizálódhatnak.



28



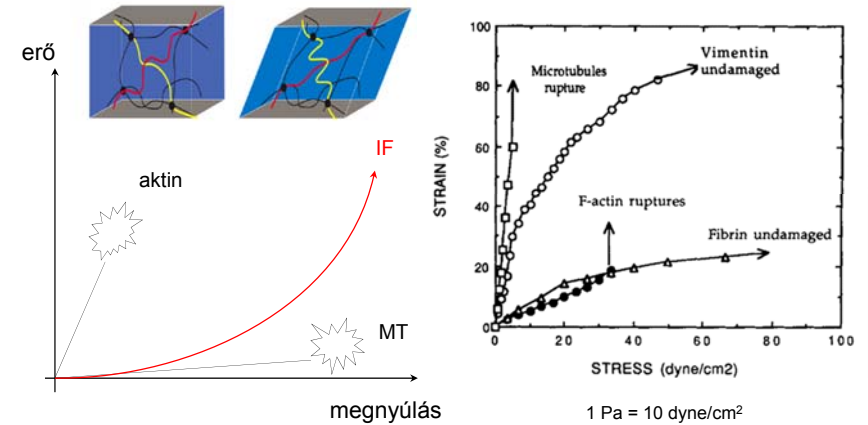
## Intermedier filamentum nyújtása (dezmin)



29

## Az intermedier filamentumok feltételezett szerepe: mechanikai stabilizálás

- nemlineáris rugalmasság: nagy erők esetén „felkeményedés”
- polimer hálózat: terhelésre merőlegesen összehúzódás

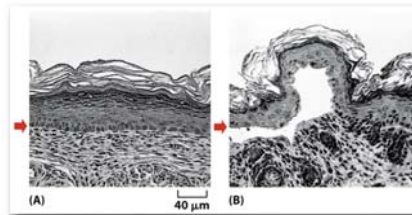


30

## Intermedier filamentumok szöveti funkciói

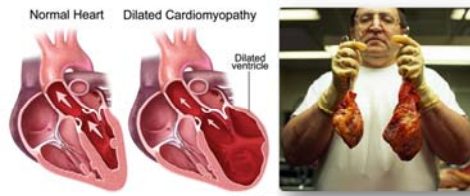
### epiteliális (hám-) sejtekben:

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



### szívizomban:

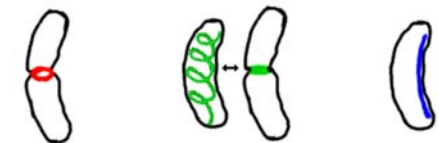
- kórkép: *cardiomyopathia* (szívizom-elfajulás)
- oka: mutáció a dezmin génben



31

## Érdekesség: prokarióta citoszkeleton

	sejtosztódás	sejt polaritása	alak
eukarióta	tubulin	aktin	intermedier filamentum
prokarióta	FtsZ	MreB	CreS



32



## Motor

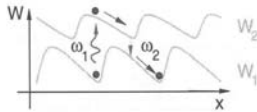
## Motorfehérjék

elmozdulást előállító, ciklikusan működő erőgép

$$E_x \rightarrow W$$

$E_x$  :

- mechanikai energia
- **kémiai energia**
- villamos energia
- hőenergia



- **nemegyensúlyi rendszerek** (kémiai reakcióhoz csatolt elmozdulás irányított)
- **sebesség:** 0.01-100  $\mu\text{m/s}$
- **lépésmagasság:** 0.3-40 nm
- **erő:** 1-60 pN
- „üzemanyag”: ATP vagy egyéb makroerg vegyület hidrolízise, (polimerizációhoz kapcsoltn is): 54 kJ/mol energia =  $22 k_b T$
- **hatásfok:** 50-100% (!!!)

33

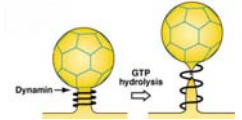
## A motorfehérjék típusai

### 1. Aktin alapú:

- **miozinok:** konvencionális (miozin II) és nem-konvencionális;
- miozin szupercsalád (I-XXIV osztályok), plusz vég irányába mozognak.

### 2. Mikrotubulus alapú:

- **dineinek:** ciliáris (flagelláris) és citoplazmatikus típusok;
  - -vég irányába mozognak.
- **kinezinok:** kinezin szupercsalád: konvencionális és nem konvencionális;
  - +vég irányába mozognak.
- **dinaminok:** MT-függő GTP-áz aktivitás;
  - biológiai szerep: vakuoláris fehérjeválogatás



### 3. DNS alapú mechanoenzimek:

- DNS és RNS **polimerázok**, vírus kapszid **csomagoló motor**;
- a DNS fonál mentén haladnak és fejtenek ki erőt.

### 4. Rotációs motorok:

- F1F0-ATP szintetáz,
- bakteriális flagelláris motor.

### 5. Mechanoenzim komplexek

- riboszóma

34

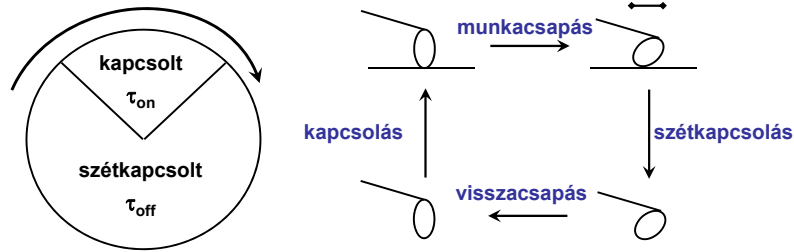
## A motorfehérjék munkaciklusa 1.



**C-terminális:** működést biztosító kötőhely

**N-terminális:** globuláris fej: motordomén (nukleotidot köt és hasít), citoskeletális polimer kötőhelye

ATP hidrolízis ciklus **szoros csatolás: 1 ciklusban 1 ATP hidrolizálódik**



konformációváltozás ideje:  $\sim \mu\text{s}$

35

## A motorfehérjék munkaciklusa 2.

**munkaciklus-arány (r):** 
$$r = \frac{\tau_{\text{on}}}{\tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}}} = \frac{\tau_{\text{on}}}{\tau_{\text{total}}}$$

**csúszási sebesség:** 
$$v = \frac{\delta}{\tau_{\text{on}}} \xrightarrow{\text{kapcsolt idő:}} \tau_{\text{on}} = \frac{\delta}{v}$$

**ciklusidő:** 
$$\tau_{\text{total}} = \frac{1}{V}$$

$$r = \frac{\delta V}{v}$$

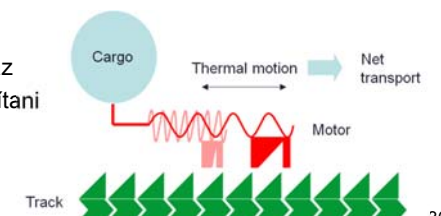
$\delta$ =munka- vagy lépéstávolság;  $V$ =ATP-áz sebesség;  $v$ =motilitási sebesség

### Processzív motor: $r \sim 1$

- pl. kinezin, DNS, RNS-polimeráz
- egymaga képes a terhet továbbítani

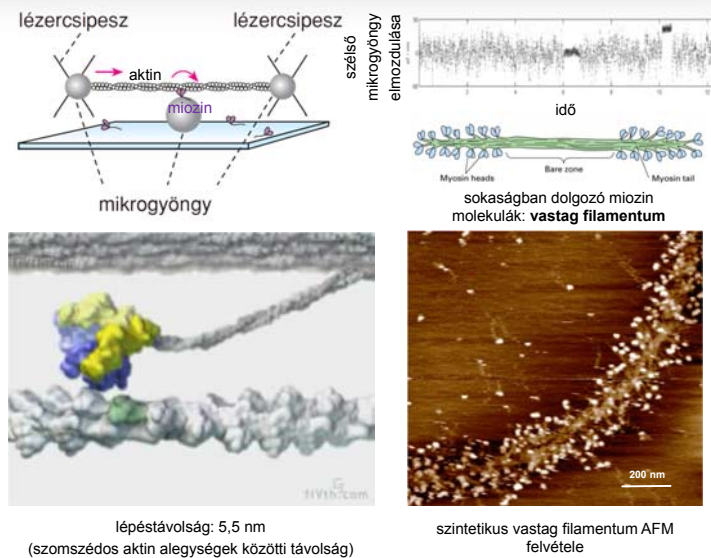
### Nem processzív motor: $r \sim 0$

- pl. miozin
- sokaság működik együtt



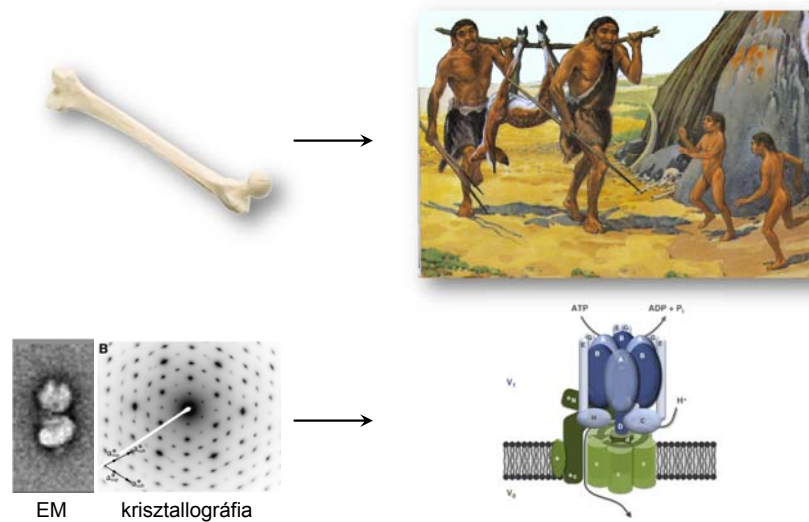
36

## Nem-processzív motorok: miozin-II



37

## Pihenő: mi alapján készülnek az animációk?



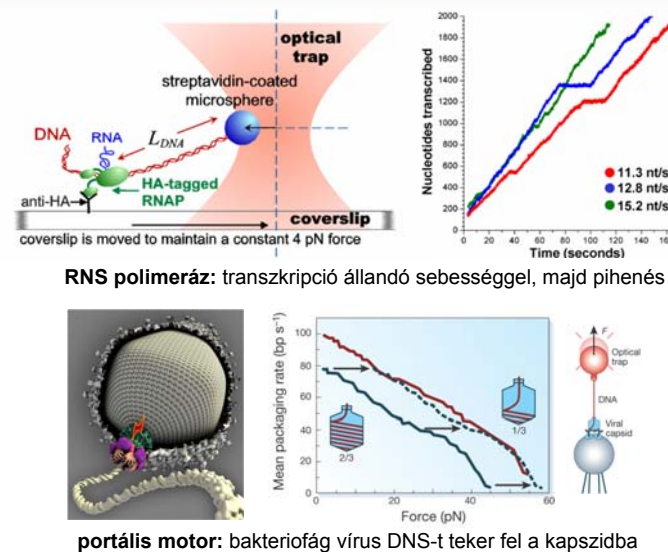
38

## Processzív motorok



39

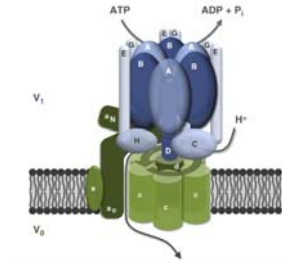
## Nukleinsav-alapú motorok



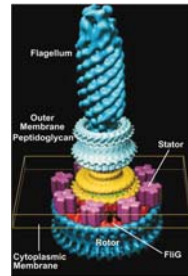
40

## Rotációs motorok

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP szintetáz



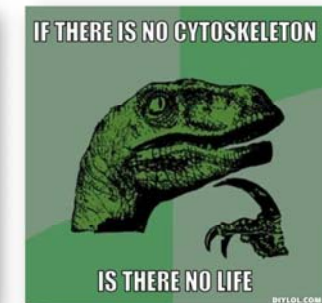
bakteriális flagellum motor



- fordulatszám: > 20000 rpm
- teljesítmény:  $10^{-16}$  W
- hatásfok: > 80%
- energiaforrás: protonok

41

Köszönöm a figyelmet!



42