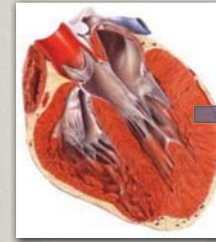


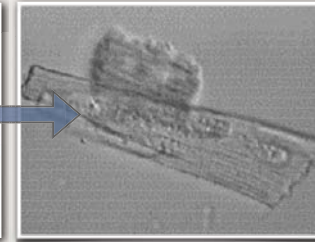
DINAMIKUS FEHÉRJERENDSZEREK A SEJT BEN

KELLERMAYER MIKLÓS

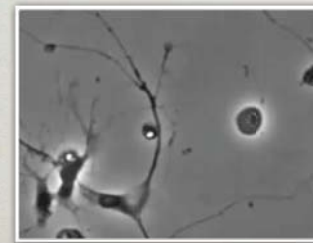
BIOLÓGIAI MOZGÁSOK



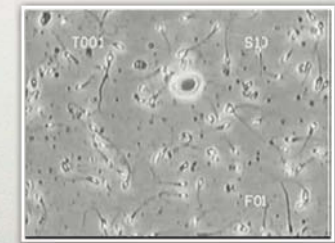
Ritmusosan összehúzódó szívizomsejt



Osztódó sejt

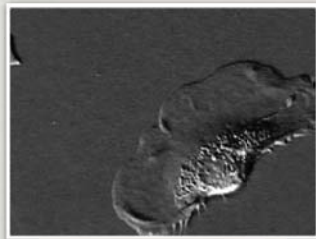


Axon (neurit) növekedés



Mozgó spermatoцитák

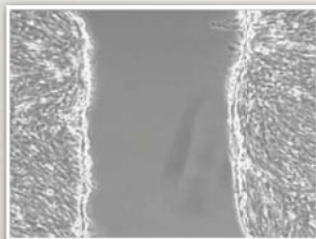
BIOLÓGIAI MOZGÁSOK



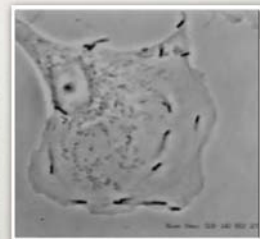
Tovakúszó keratinocita



Kemotaxis



Sebgyógyulás modell - fibroblasztok kollektív mozgása



Listeria baktériumok intracelluláris mozgása

A citoszkeletális rendszer

Intracelluláris dinamikus fehérje vázrendszer

Három fő filamentum-osztály:

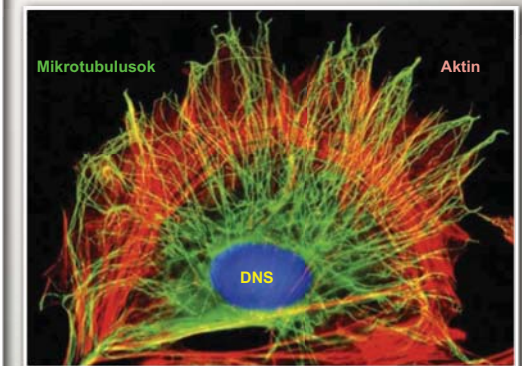
- A. Vékony (aktin)
- B. Intermedier
- C. Mikrotubulus

Filamentumok mechanikája fontos

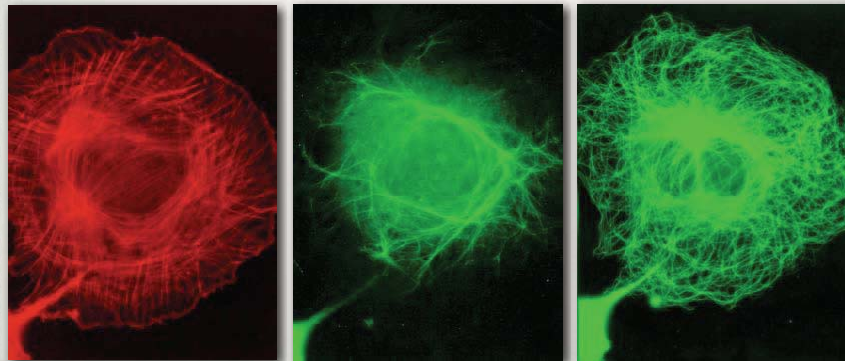
Polimerizáció: "okos téglák" alegységekből

Szerep:

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



A citoszkeletális rendszer



Aktin
(rodamin-phalloidin)

Vimentin
(anti-vimentin)

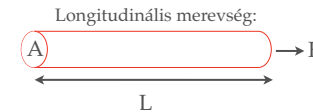
Mikrotubulusok
(GFP-tubulin)

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.



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



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

"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 $I = \pi r^4 / 4$)
 k_B = Boltzmann állandó
 T = abszolút hőmérséklet.

Merev lánc
 $l \gg L$

Szemiflexibilis lánc
 $l \sim L$

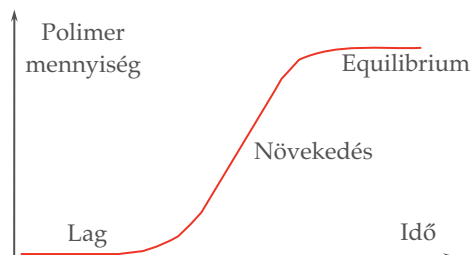
Flexibilis lánc
 $l \ll L$

Polimerizáció

Alegységek összeállásának folyamata

A polimerizáció fázisai:

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



Polimerizációs egyensúlyok

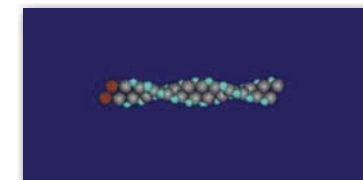
1. valódi equilibrium



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

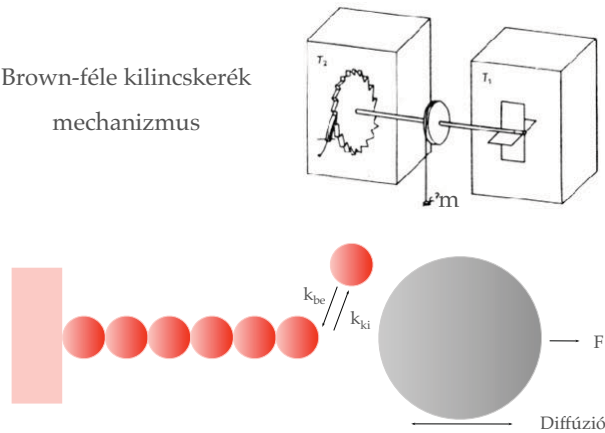


3. Treadmilling: taposómalom



Erőkifejtés citoszelektális filamentum polimerizációjával

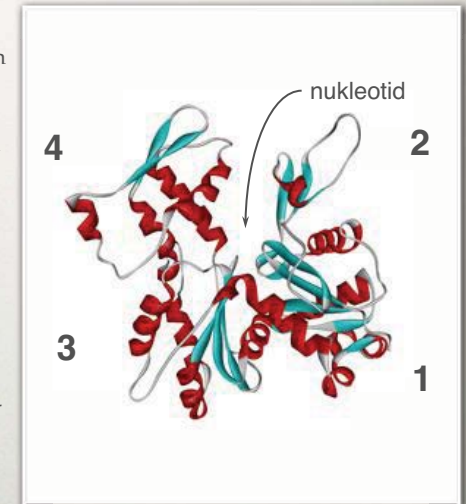
Brown-féle kilincskerék
mechanizmus



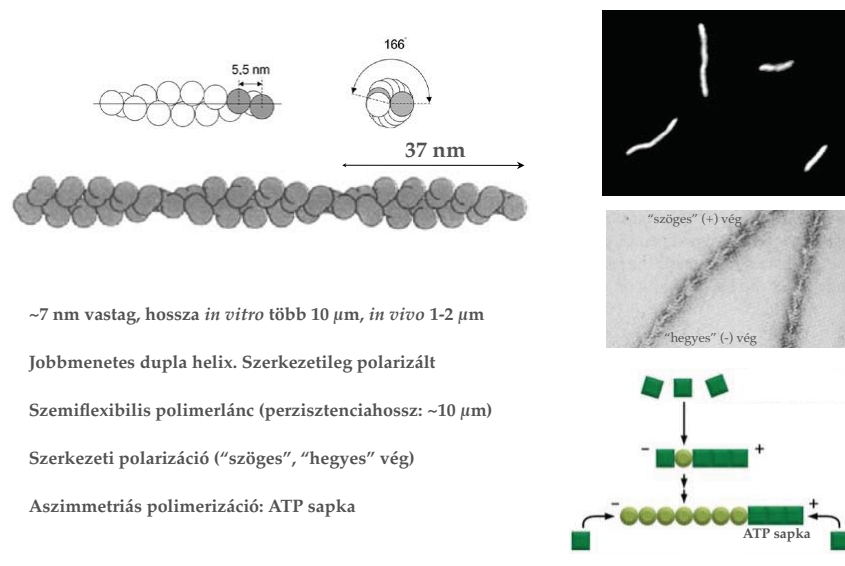
Az aktin monomer (G-aktin)

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 adenosin nukleotid (ATP vagy ADP)
Szubdomének (4)
Genetikai variabilitás: emlősökben 6 különböző aktin, három családban (α izomeredetű, β , γ nem-izomeredetű)

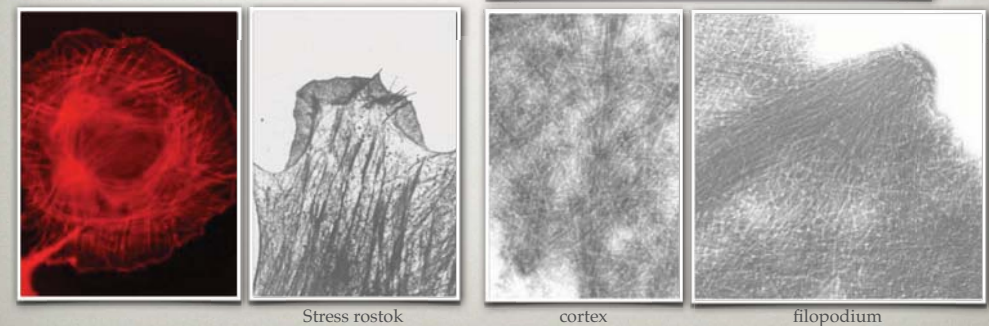
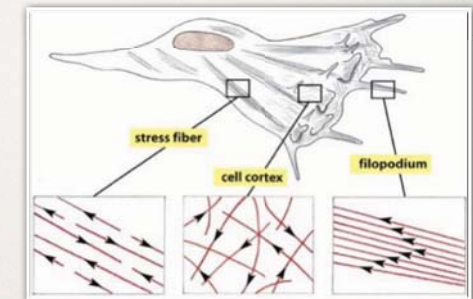


Az aktin filamentum (F-aktin)

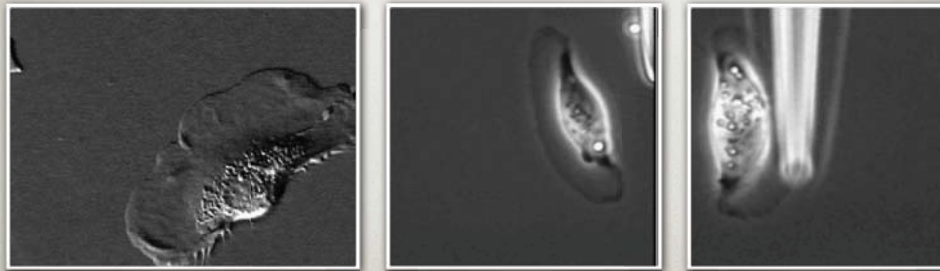
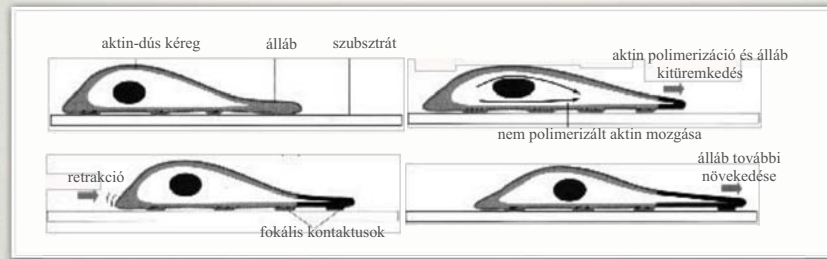


Aktin a sejtben

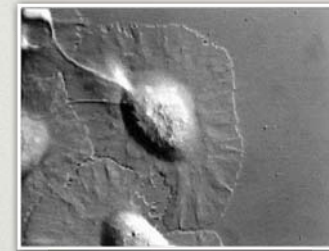
cortex (a sejt pereme)
"stress" rostok,
sejtnyúlványok (lamellipodia, filopodia,
microspikes, focal contacts, invagináció)
mikrovillus



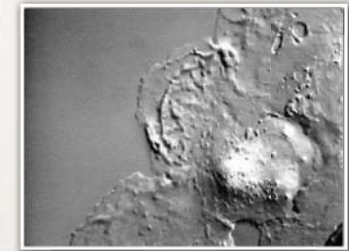
Aktin-függő sejtmozgás



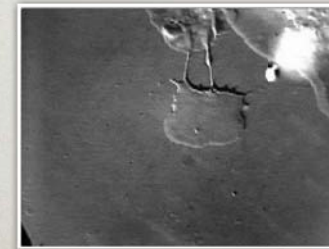
Aktin-függő sejtmozgás megnyilvánulásai



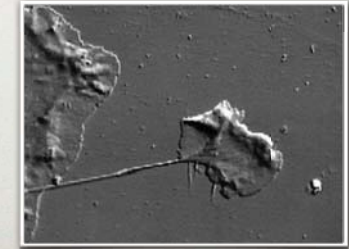
Retrográd áramlás



Filopodium képződési dinamika

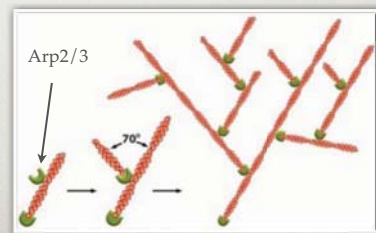
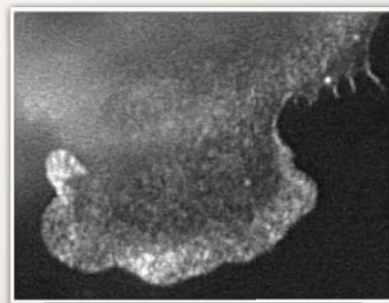
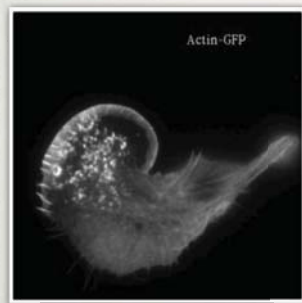


Citoplaszt (anukleáris sejtfagmentum) autonóm mozgása

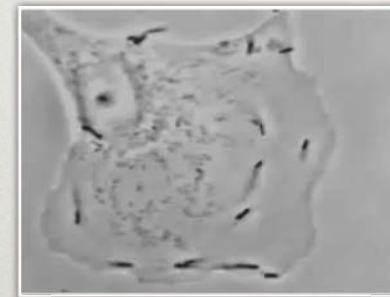


Membrán fodrozódás

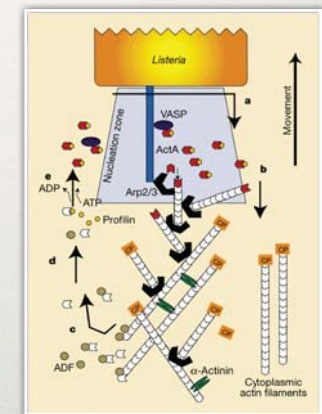
Aktin dinamika a lamellipodiumban



Intracelluláris patogének is kihasználják az aktin rendszert

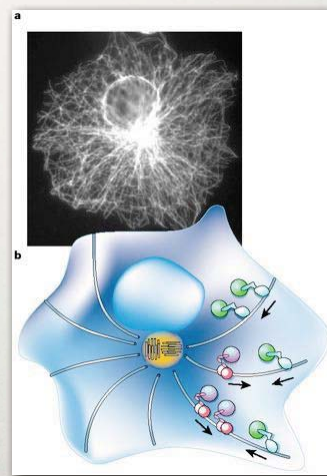
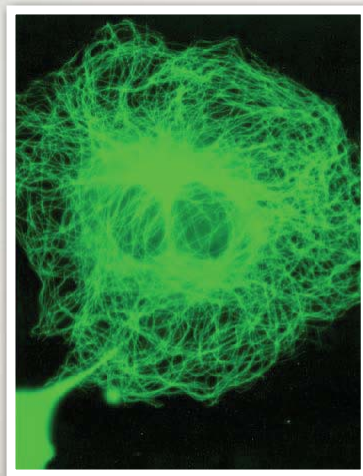


Listeria monocytogenes intracelluláris motilitása



Mikrotubuláris rendszer

Eukarióta sejtek tubulinból
és kapcsolódó fehérjékből álló rendszere.



A mikrotubulusok építőköve: tubulin

Alegység: tubulin

Idegszövetben az összfehérje 10-20%-a

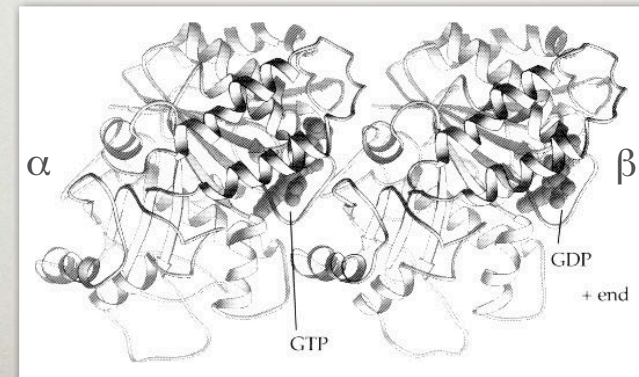
MW: ~50 kD: α - és β -tubulin \rightarrow heterodimér

1 molekula kötött guanozin nukleotid (GTP vagy GDP);

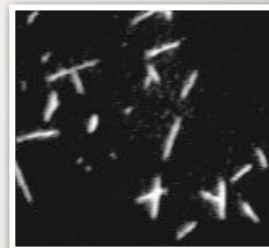
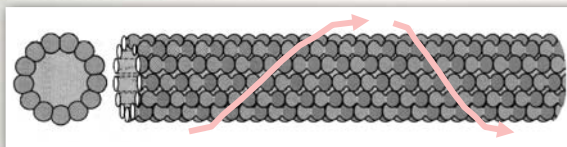
kicserélhető (β), illetve nem kicserélhető (α)

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:

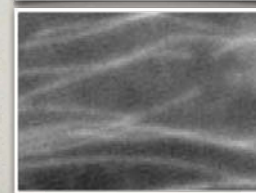
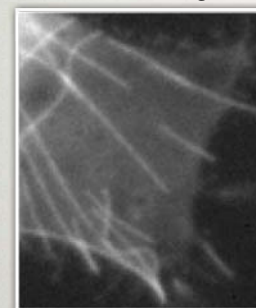
+vég: polimerizáció gyors, β -alegység által terminált

-vég: polimerizáció lassú, α -alegység által terminált

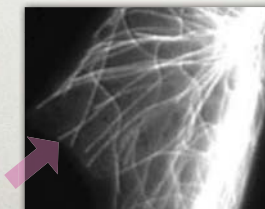
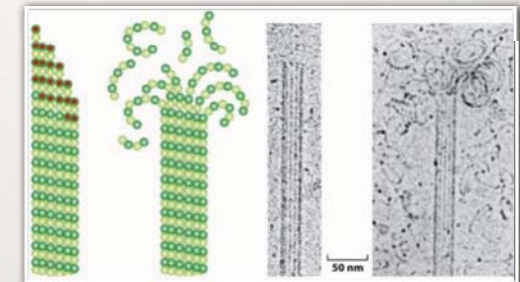
GTP-sapka

Polimerizációs egyensúlyok mikrotubulusokban

Treadmilling



Dinamikus instabilitás



Mikrotubuláris rendszer az eukarióta sejtben

Hol található az eukarióta sejtben?

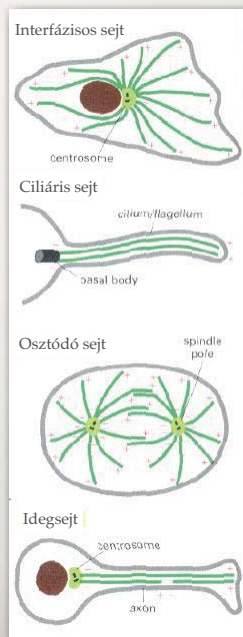
interfázisos sejt cytoplasmája, axon, cilium, flagellum, osztódó sejt húzóorsója.

Polaritás a sejtben belül

centrosomában -vég, a periférián +vég.

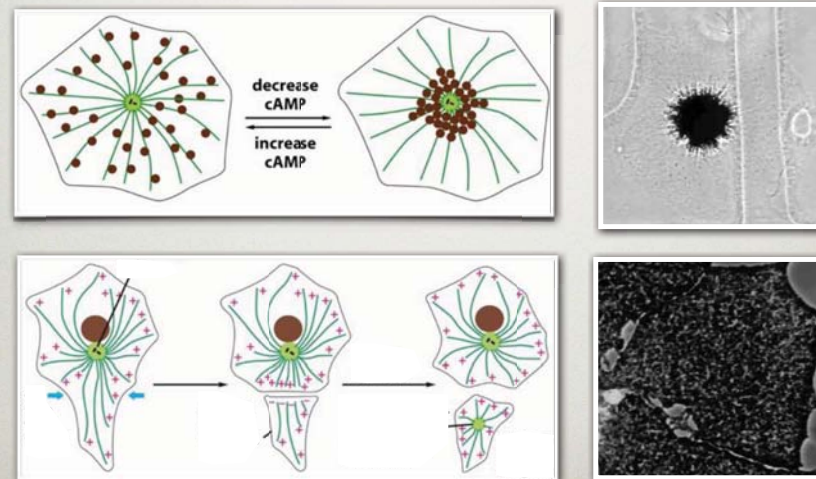
Centrosoma: 2 centriolum, centrosoma matrix, benne γ -tubulin

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



Mikrotubuláris rendszer funkciói

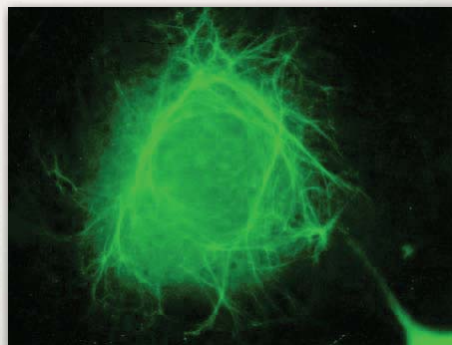
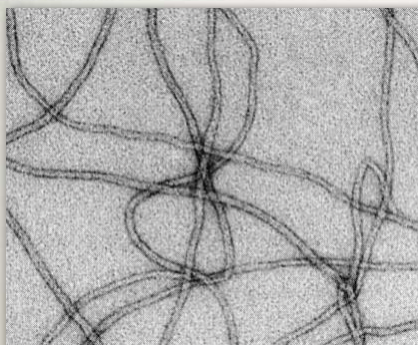
1. Autópályák motorfehérjék számára
2. Érzékeli, monitorozza és megtalálja a sejt geometriai középpontját
3. Motilitási funkciók (sejtosztódás)



Intermediér filamentális rendszer

8-10 nm átmérőjű szövetspecifikus, filamentális fehérjerendszer, mely a legtöbb (de nem minden) állati sejtben megtalálható.

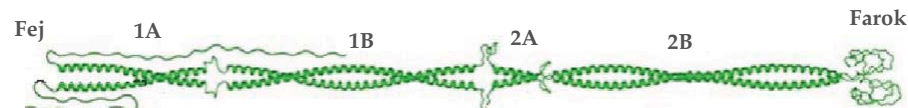
Alapvető szerep: mechanikai ellenállás biztosítása



Vimentin, Vic Small

Intermediér filamentum építőkövek

Intermediér filamentum dimer:



Tulajdonságok:

- Kémiai 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 intermedier filamentum alegysége: „coiled-coil” dimer

Heptád ismétlődés szerkezet, hidrofób aminosavak



Vimentin dimer szalagdiagramja



Vimentin dimer drótháló diagramja

Intermedier filamentumok csoportosítása

Szövetspecifititás 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

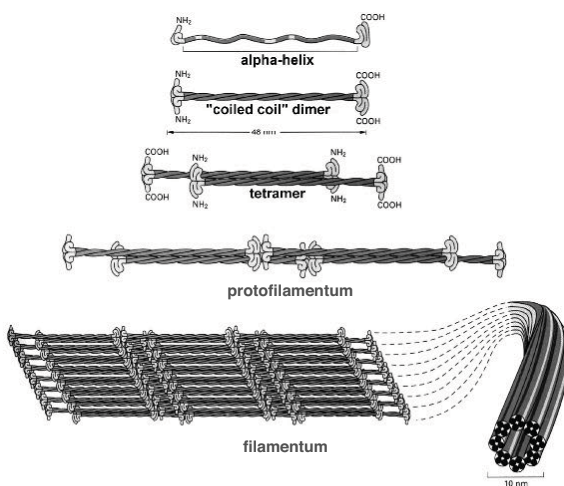
A sejtben teljesen polimerizált állapotban
(nem dinamikus egyensúly)

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

2 dimer → tetramer
(antiparalel elrendeződés,
szerkezeti apolaritás)

Tetramerek longitudinális sorozata
→ protofilamentum

8 protofilamentum → filamentum

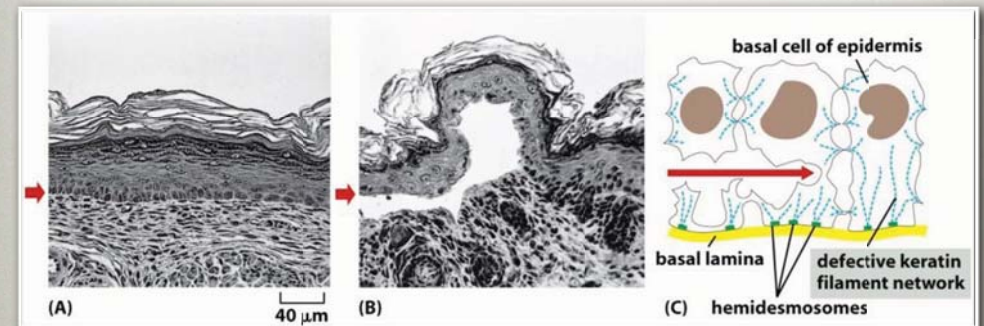


Intemedier filamentumok szöveti funkciói

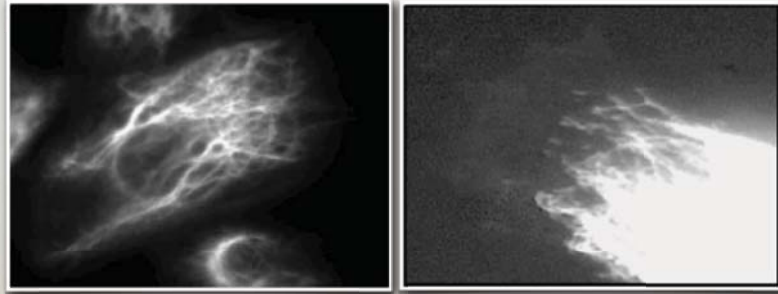
Szöveti mechanikai stabilitás biztosítása

Epiteliális (hám-) sejtekben:

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



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 mínusz vég irányába mozognak.
- b. Kinezinok:** 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

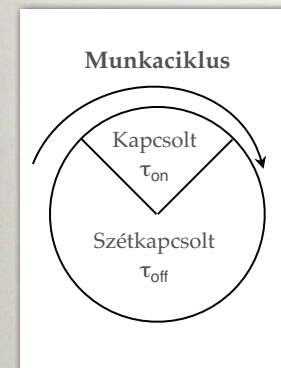
4. Rotációs motorok

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.

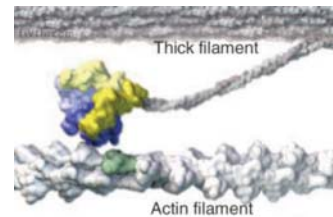
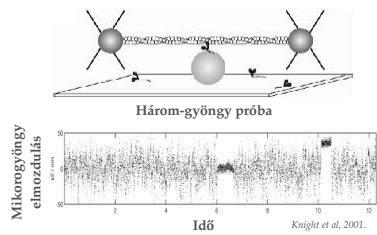
Nonprocesszív motor: $r < 0$

Pl. miozin.
Munkaciklus nagy részében szétkapcsolt állapotban.
Sokaság működik együtt.

Egyetlen motorfehérje által kifejtett erő: néhány pN.

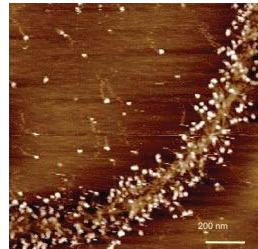
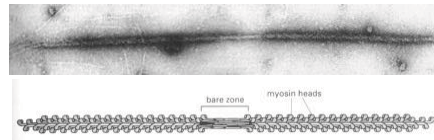
NEM-PROCESSZÍV MOTORFEHÉRJÉK

Miozin



Lépéstávolság: 5,5 nm
(szomszédos aktin alegységek közötti távolság)

A nem-processzív motorok sokaságban dolgoznak.

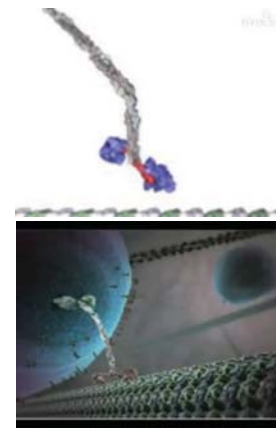


Szintetikus vastag filamentum
AFM felvétel

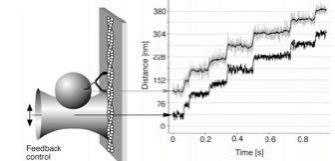
PROCESSZÍV MOTORFEHÉRJÉK

Kinezin

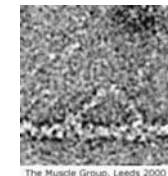
Lépéstávolság: 8 nm (minden második tubulin alegység közötti távolság)



Miozin V

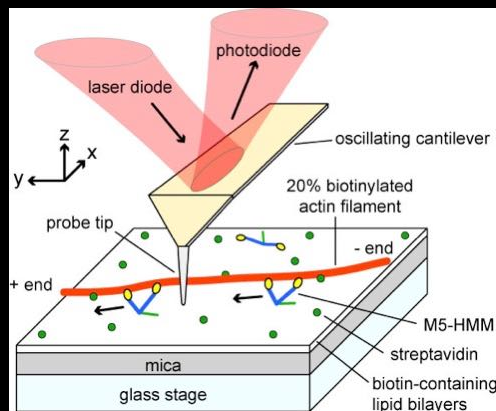


Lépéstávolság: ~36 nm nm
(aktin filament hélix félmenet emelkedés)

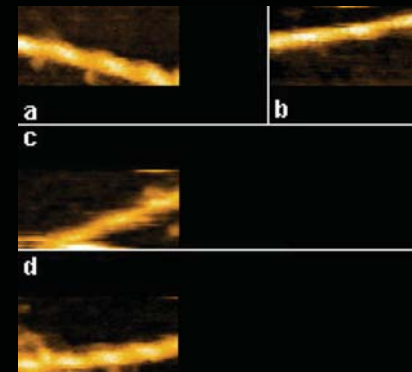


A processzív motorok egyedül dolgoznak.

Ultragyors AFM mérések a miozin V-HMM molekulán



Egyirányú processzív mozgás



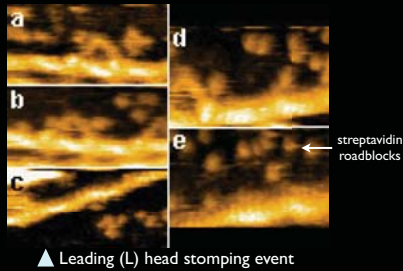
Stomping:
• Rapid detachment-reattachment
• ~5 nm translocation

▲ Trailing (T) head stomping event

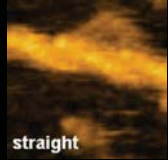
▲ Leading (L) head stomping event

Intramolekuláris változások

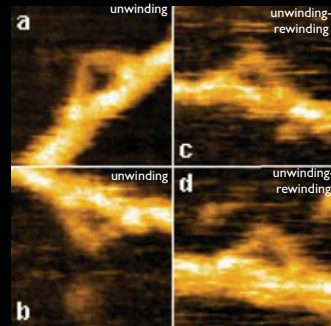
Hand-over-hand stepping



"Straight" - "sharp bend" transition

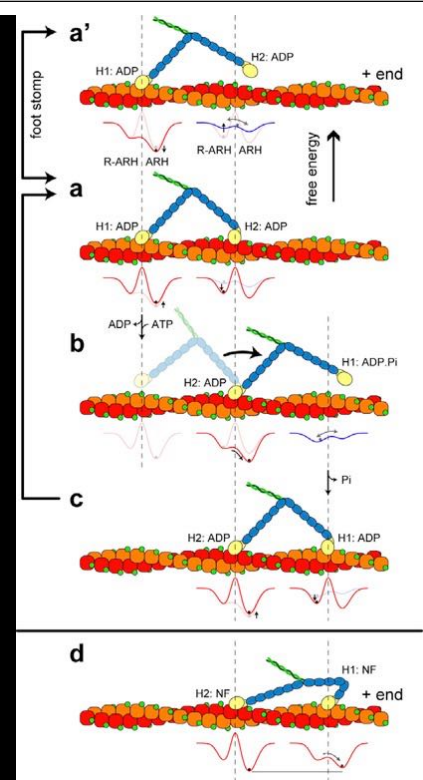


Coiled-coil tail unwinding



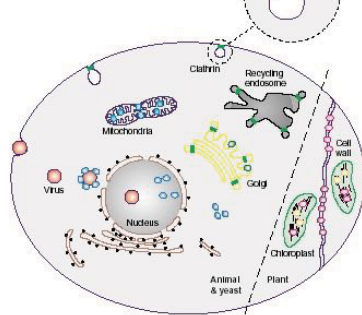
Lépési mechanizmus

- a. Initial state, both heads in the ADP state.
- a'. Stomping, in equilibrium with the bound state.
- b. ADP release, ATP binding, trailing-head detachment, L-head swing (completion of power-stroke), T-head "rotational diffusion" (\rightarrow L-head), L-head in the ADP-P_i pre-stroke state.
- c. L-head attachment, P_i release, 36 nm advance.
- d. Sharp bend state, only in the nucleotide-free condition.

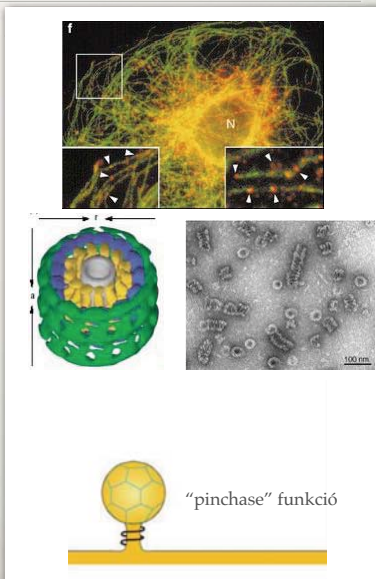


Dinaminok

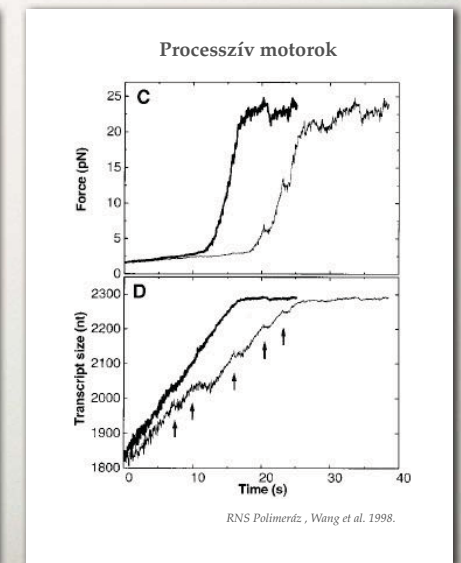
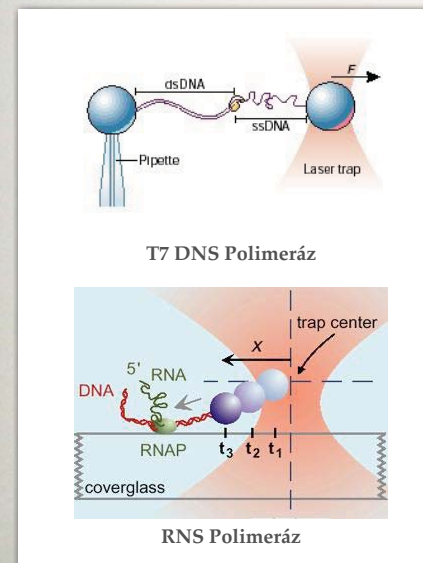
Vakuoláris fehérjeválogatás GTPázok



Protein	Localization	Function	Self-assembly
Cytosol	Plasma membrane (clathrin-coated cavities), Golgi, endosome	Vesicle formation, fission	+
Vps1	Golgi	Vesicle formation and transport	Unknown
Osm1/Dyn1/Grp78	Mitochondria outer membrane	Mitochondrial fission and morphology	+
Mgm1/Atg18/Atg18b	Mitochondria inner or outer membrane, or matrix	Mitochondrial morphology	Unknown
Phagocytosis	Cell wall	Membrane morphology	+
ADL1	Cell wall, chloroplast	Membrane biogenesis	+
ADL2	Chloroplast	Unknown	Unknown
YOL181	Cytoplasm	Anti-viral activity	+
Atx	Cytoplasm, nucleus	Anti-viral activity	+

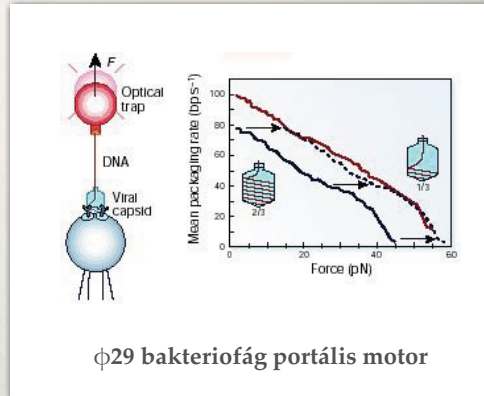
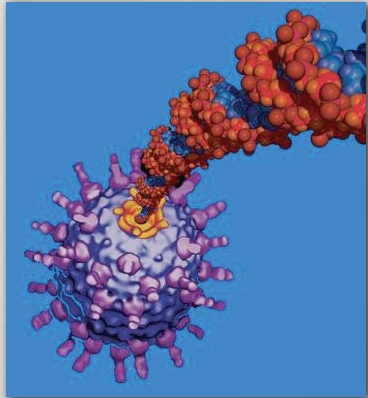


DNS Motorok



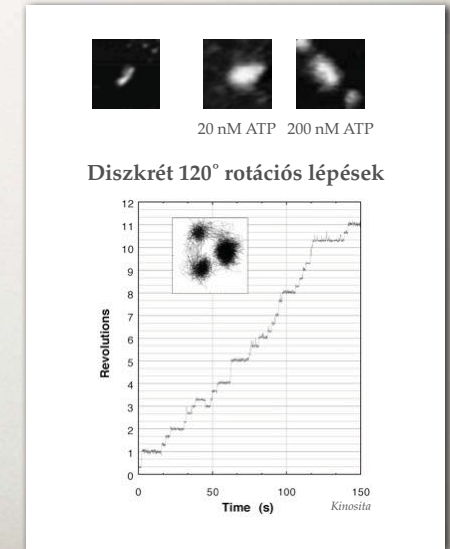
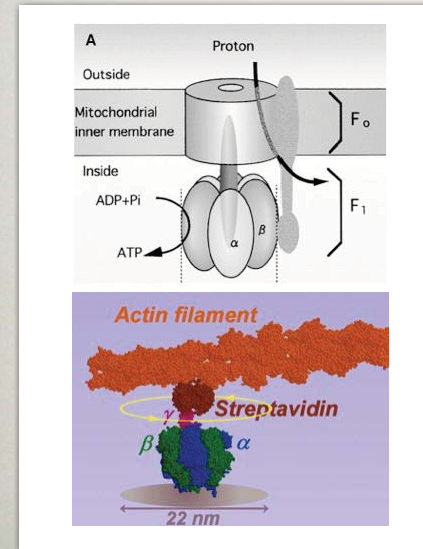
Vírus portális motor

Különleges DNS motor



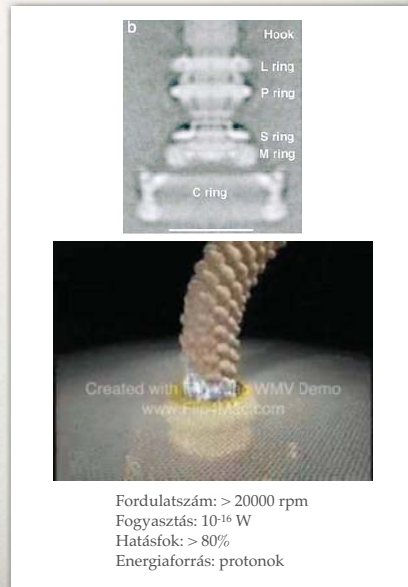
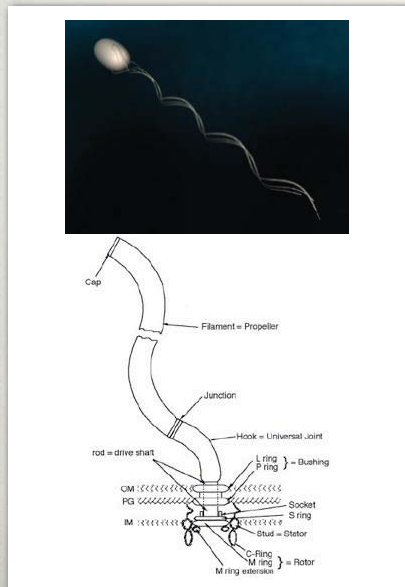
ROTÁCIÓS MOTOROK I:

F1F0-ATP SZINTETÁZ



ROTÁCIÓS MOTOROK II:

Bakteriális flagellum motor



Mechanoenzim komplex

Riboszóma

