

# POLIMERIZÁCIÓ, ÖNSZERVEZŐDÉS, MOTORFEHÉRJÉK, EGYENSÚLYTÓL TÁVOLI FOLYAMATOK

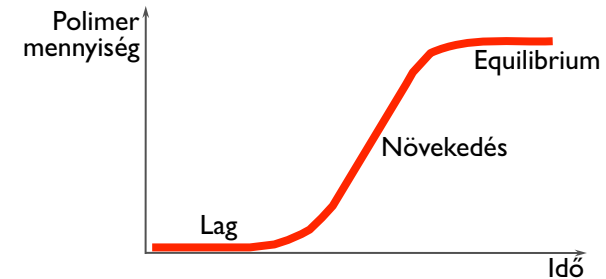
KELLERMAYER MIKLÓS

## Polimerizáció

Alegységek összeállásának folyamata

A polimerizáció fázisai:

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



## Polimerizációs egyensúlyok

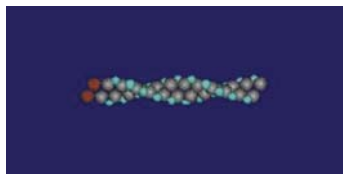
1. valódi equilibrium



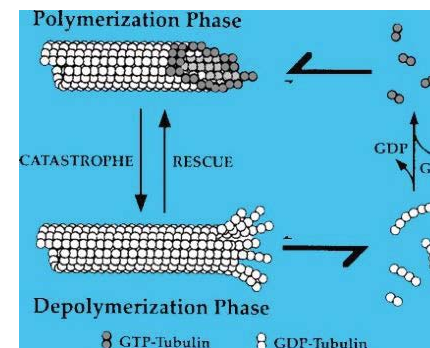
2. dinamikus instabilitás: folyamatos, lassú  
növekedést követő katasztrofikus  
depolymerizáció



3. Treadmilling:  
taposómalom



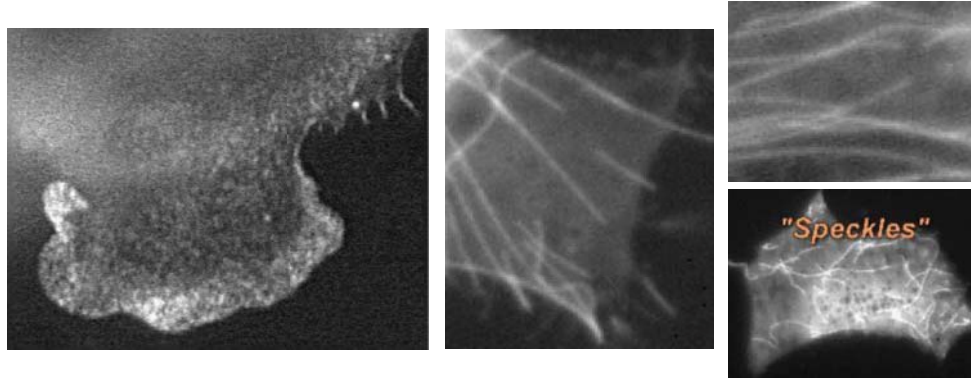
## Dinamikus instabilitás Mikrotubulusok



CHO Cytoplasm  
with  
Centrosome

Gary Borisy

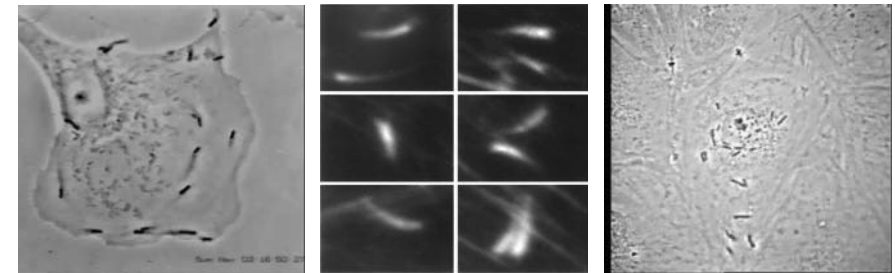
# In vivo treadmilling



**Aktin**  
GFP-aktin Speckle microscope  
Clare Waterman-Storer

**Microtubulusok**  
Gary Borisy

# Motilitás aktin polimerizációval Intracelluláris patogének mozgása



*Listeria monocytogenes*

F-aktin jelölés phalloiddinnel

*Shigella flexneri*

# Motilitás aktin polimerizációval In vitro körülmények



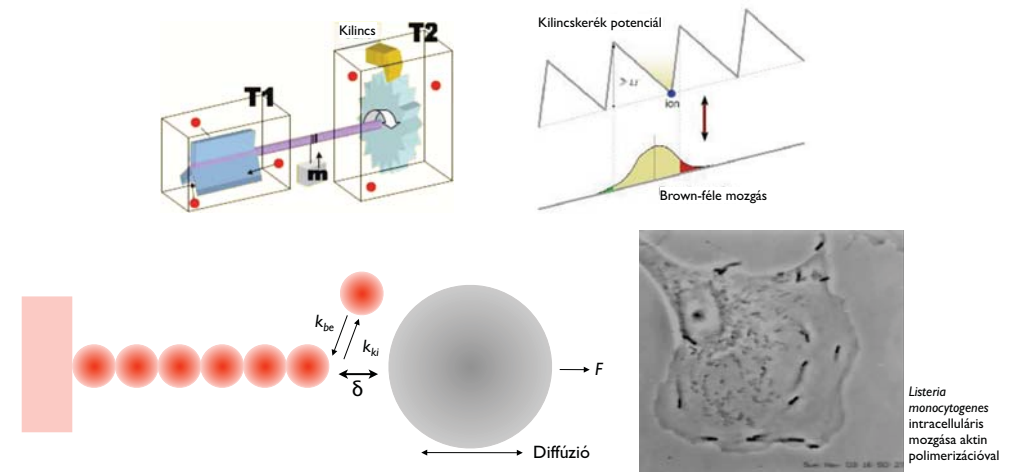
*Listeria Xenopus* extraktumban

ActA-val aszimmetrikusan bevont  
mikrogöngy *Xenopus* extraktumban

ActA-val szimmetrikusan bevont  
mikrogöngy *Xenopus* extraktumban

ActA: A protein expressed by the bacterium *Listeria monocytogenes* that is responsible for the "rocketing" motility of the bacterium throughout the eukaryotic host cell. In addition to other host proteins, ActA binds actin directly.

# A diffúzió speciális esete: Brown-féle kilincskerék

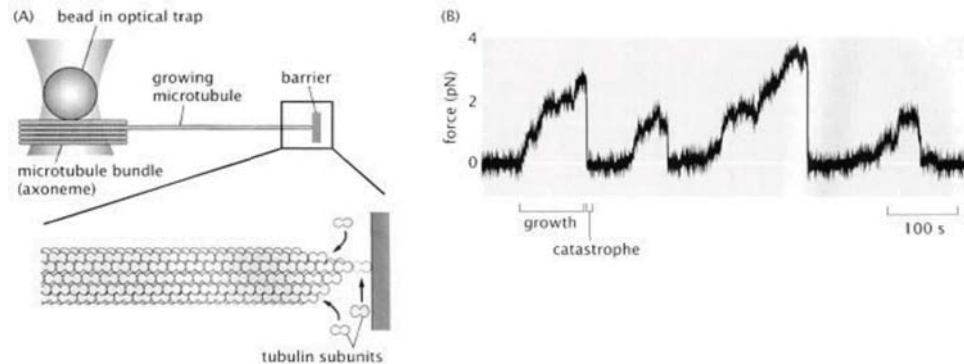


$$K(F) = K_c e^{\frac{F\delta}{k_B T}}$$

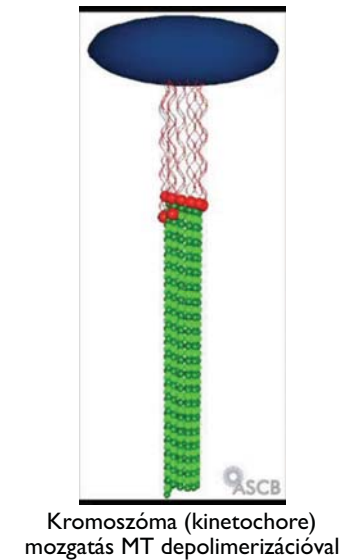
$K(F)$  = erő jelenlétében fennálló disszociációs állandó - az a monomer koncentráció, amelynél a nettó filamentum növekedés 0.  
 $K_c$  = kritikus koncentráció (0 erőnél);  $F$  = erő;  $\delta$  = diszkrét növekedés egyetlen monomer beépülésekor.  $k_B T$  = termikus energia.  
 N.B.:  $F$  lehet + vagy -. A folyamat lehet **reakcióvezérelt** (a  $k_{be}$ -hez képest túl gyors diffúzió) vagy **diffúzióvezérelt** (a  $k_{be}$ -hez képest lassú diffúzió).

*Listeria monocytogenes*  
intracelluláris  
mozgása aktin  
polimerizációval

# A polimerizációs erő megmérhető

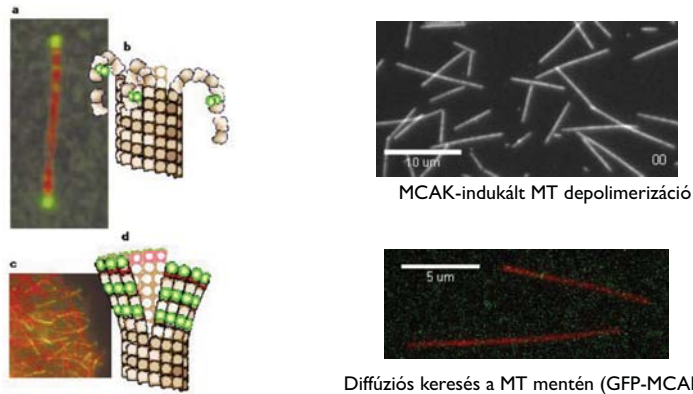


# MT-depolimerizáció- vezérelt erő kifejtés



# MCAK: MT-depolimerizáló kinezin

**MCAK:**  
 "Kinezin-13"  
 A MT + végéhez kötődik  
 Diffúziós mechanizmussal keresi meg a + véget  
 ATP-t hidrolizál  
 MT depolimerizációt szabályoz ("katasztrófa-faktor")



# Motorfehérjék

1. Specifikus citoskeletális filamentumhoz kapcsolódnak (DE...)
2. Elmozdulást és erőt generálnak
3. Kémiai energiát használnak fel
4. Kémiai energiát közvetlenül alakítják mechanikai munkává (nincs közbülső hő- vagy elektromos energia)

# Motorfehérjék alaptípusai

## 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

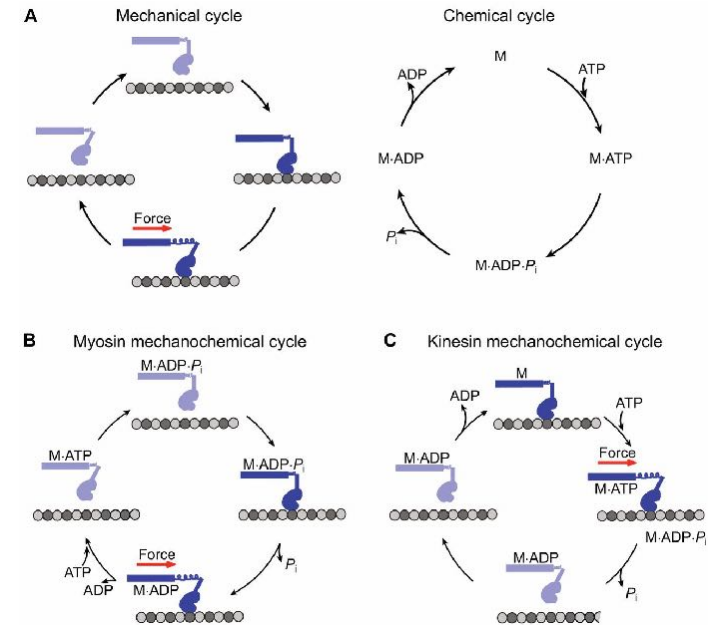
F1F0-ATP szintetáz

Bakteriális flagelláris motor

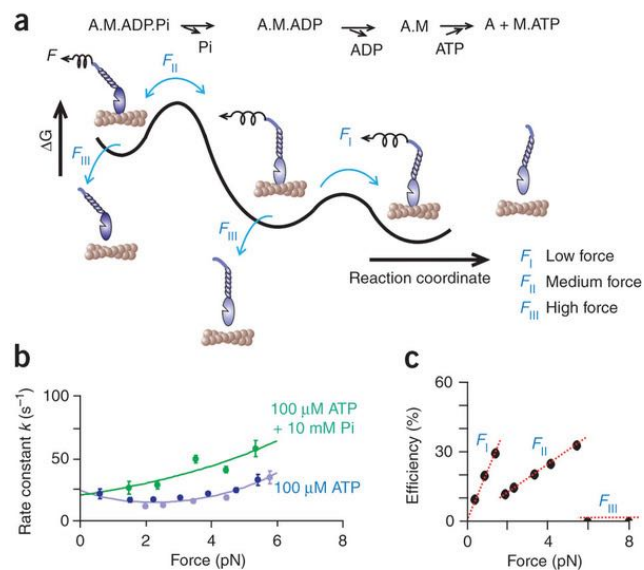
## 5. Mechanoenzim komplexek

Riboszóma

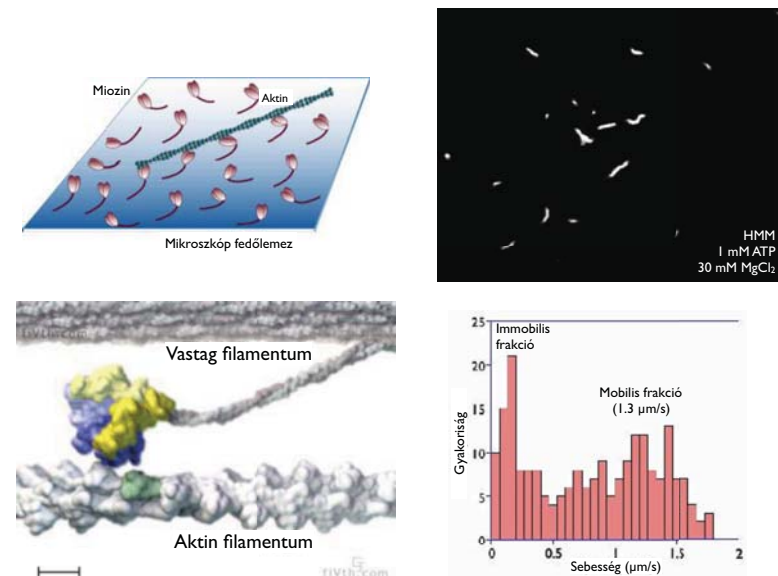
# Ciklusos működés - “duty cycle” (munkaciklus)



# Energetika, kinetika, mechanika

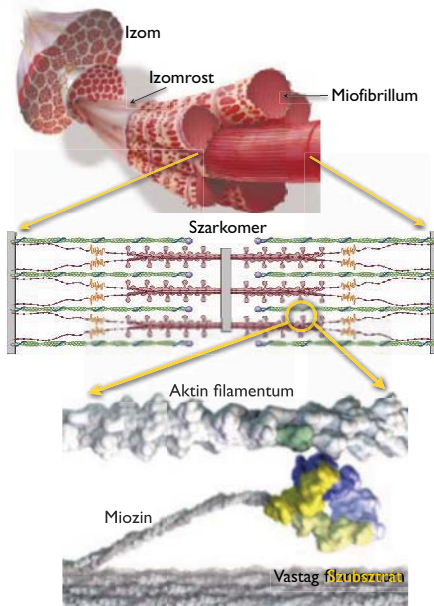


# In vitro aktomiozin motilitás



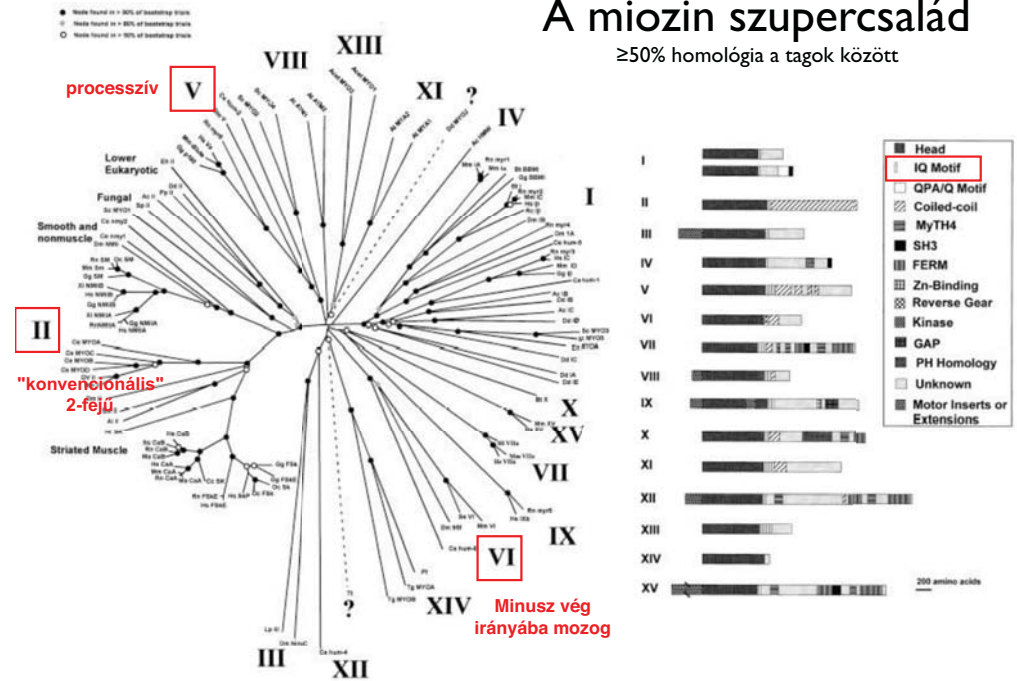


# Miozin motorfehérje

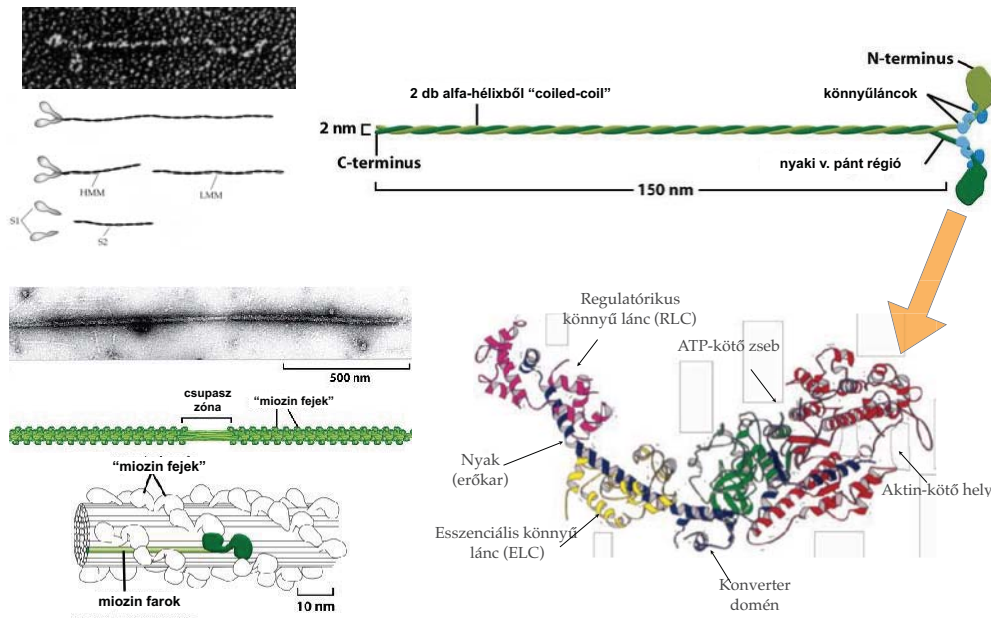


## A miozin szupercsalád

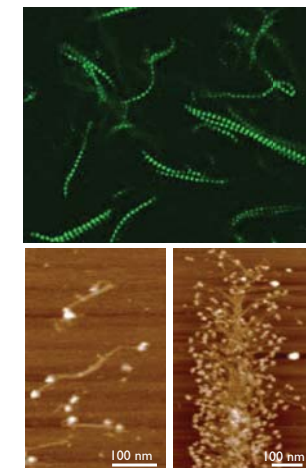
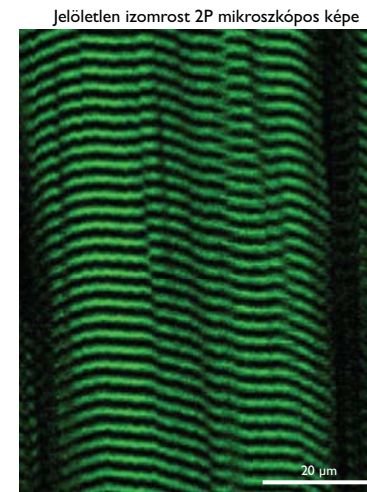
≥50% homológia a tagok között



## A miozin II



## A miozin II molekulák vastag filamentumokká állnak össze



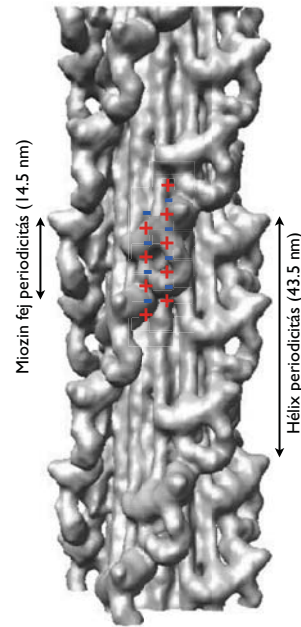
Jelforrás: miozin filamentum helikális szerkezete

Gerjesztés: 1000 nm

Második harmonikus generálás (SHG): 500 nm

Miozin vastag filamentum elektronmikroszkópos képrekonstrukció

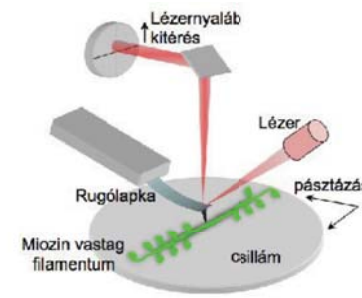
Myosin thick filament, EM map



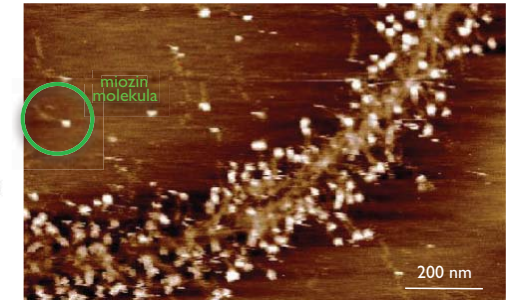
Woodhead et al. Nature **436**, 1195.

# Egyedi miozin filamentumok

Atomerő mikroszkópia

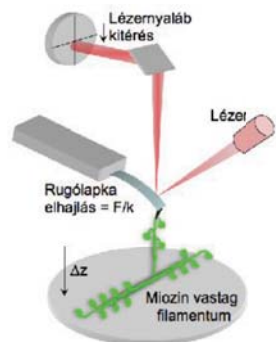


Szintetikus miozin filamentum  
Egyedi miozinmolekulák feloldhatóak vizes közegben

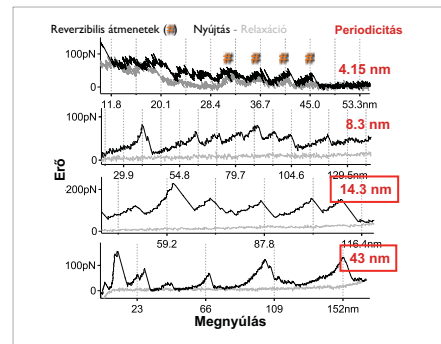


## Miozin filamentumok nanomechanikája

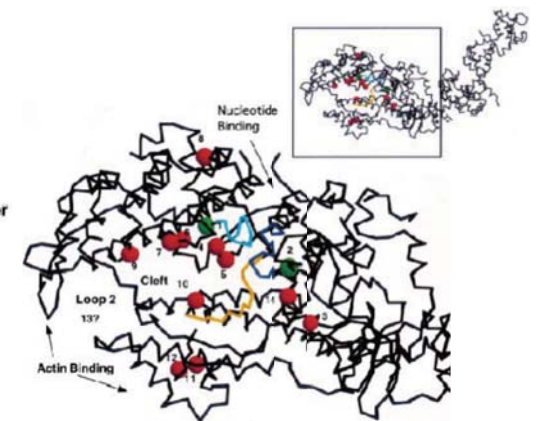
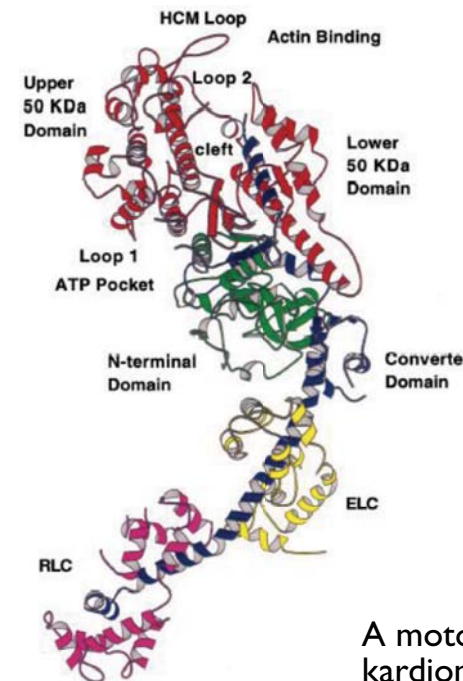
Egymolekula erőspektroszkópia  
 $Erő\ (pN) = Rugóállandó\ (pN/nm) * Elhajlás\ (nm)$



Az erőcsúcsok periodicitása korrelál a miozin rúd menti töltött régiók közötti távolsággal.



## A miozin fej (Subfragment-I)



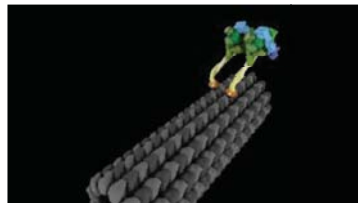
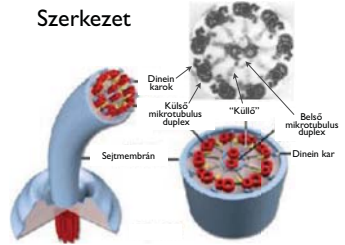
A motor domén mutációi hipertrofiás kardiomiopátiához vezetnek!



# Dineinek

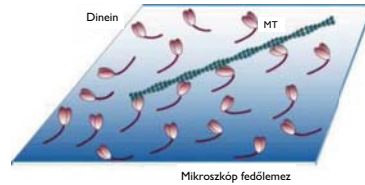
Típusok: axonemális és citoplazmális. Sok alegységes fehérjék (Mr~500 kDa). A minusz vég irányába mozognak. Koordinált működésük meghajlítja a ciliumot.

Szerkezet

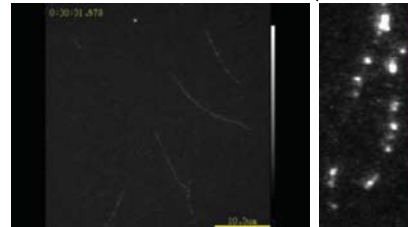


"Részeg tengerész" lépegetési mechanizmus

Biomolekuláris funkcionális modell: "In vitro motilitási próba"



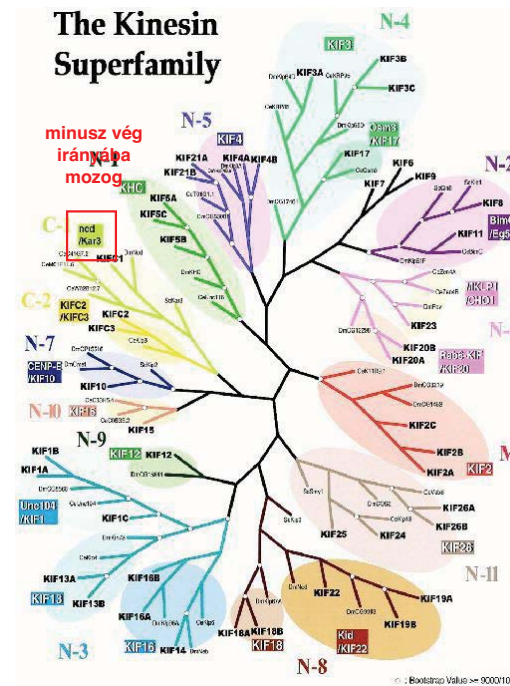
Fluoreszcencia videomikroszkópia



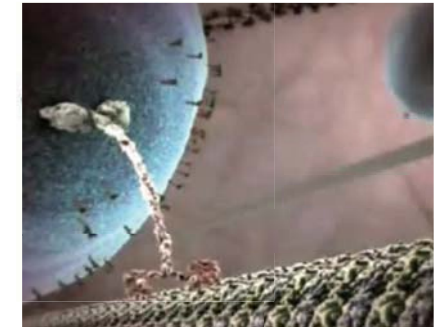
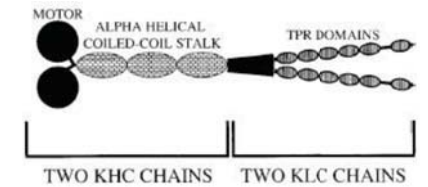
Mikrotubulus mozog a dineinen

Dinein mozog a mikrotubuluson

## The Kinesin Superfamily

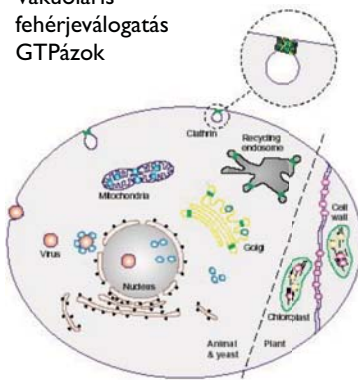


Processzív motorok. Plusz vég irányába mozognak. Vesicular transport

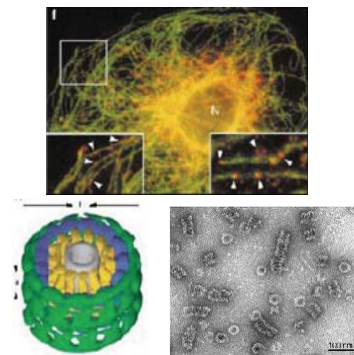


# Dinaminok

Vakuoláris fehérjevalogatás GTPázok

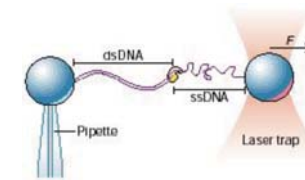


Protein	Localization	Function	Self-assembly
Dynamin	Plasma membrane (clathrin-coated vesicles), Golgi endosome, Golgi	Vesicle formation, Pinocytosis	+
Vps1		Vesicle formation and transport	Unknown
Dynamin GTPase	Mitochondrial outer membrane	Mitochondrial fission and morphology	+
Vps1	Mitochondrial inner or outer membrane, or matrix	Mitochondrial morphology	Unknown
Phosphatase	Cell wall	Membrane morphology	+
ADP	Cell wall, chloroplast	Membrane biogenesis	Unknown
ADP	Chloroplast		Unknown
ADP	Cytoplasm	Anticancer activity	+
ADP	Cytoplasm, nucleus	Anticancer activity	+

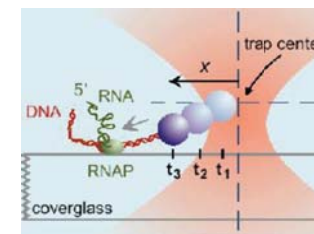


"pinchase" funkció

# DNS motorok

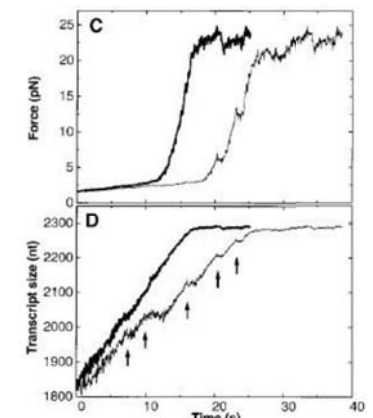


T7 DNS Polimeráz



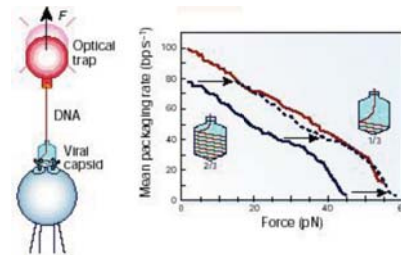
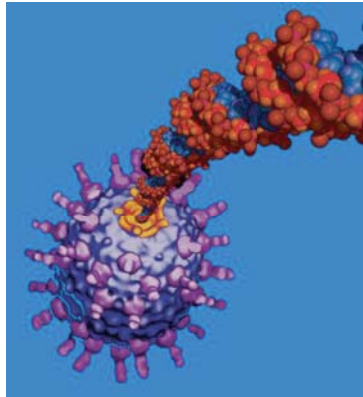
RNS Polimeráz

Processzív motorok



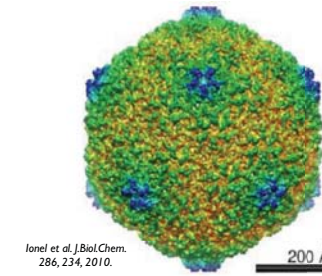
RNS Polimeráz, Wang et al. 1998.

# Vírus portális motor Különleges DNS motor



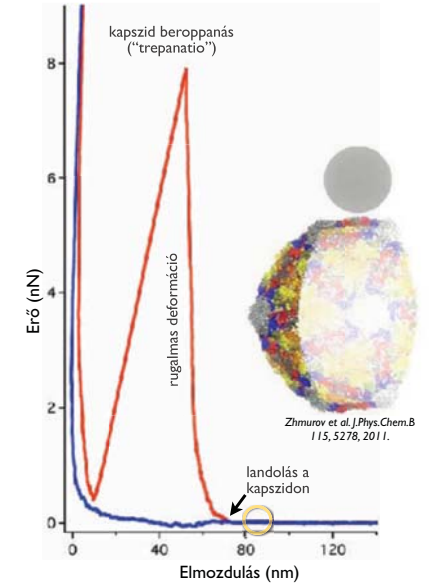
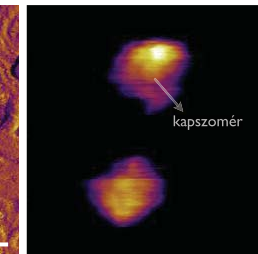
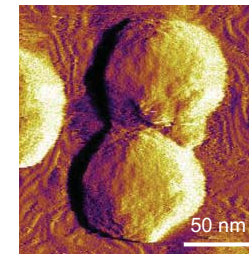
$\phi 29$  bakteriofág portális motor

# Érett vírus kapszid mechanikai beroppantás - irreverzibilis folyamat



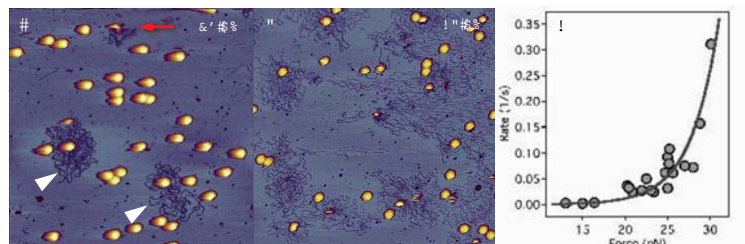
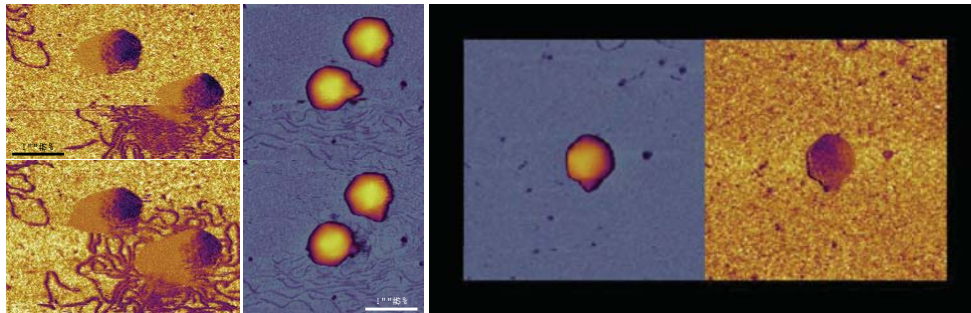
Ionel et al. J.Biol.Chem. 286, 234, 2010.

T7 bakteriofág AFM képe



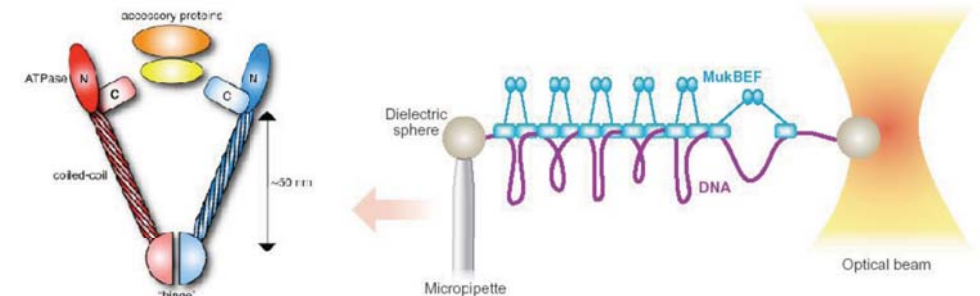
Zhmurov et al. J.Phys.Chem.B 115, 5278, 2011.

# Mechanikailag vezérelt DNS kilökődés a T7 fágból



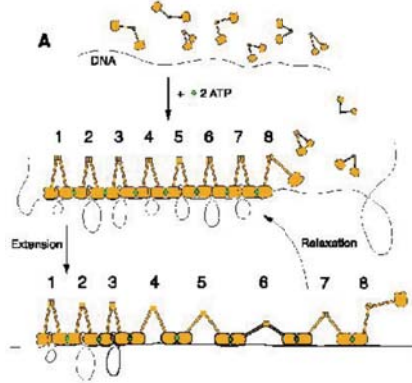
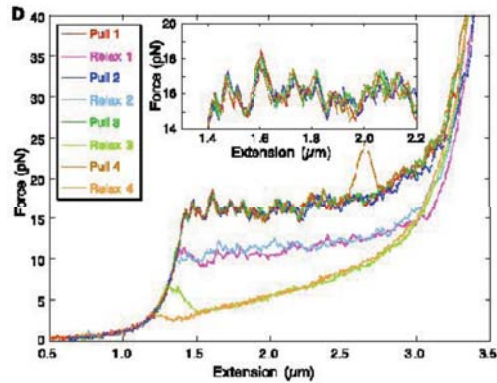
# DNS mechanoenzimek Kondenzinek

SMC fehérjecsald  
SMC = "structural maintenance of chromosomes"

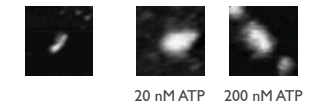
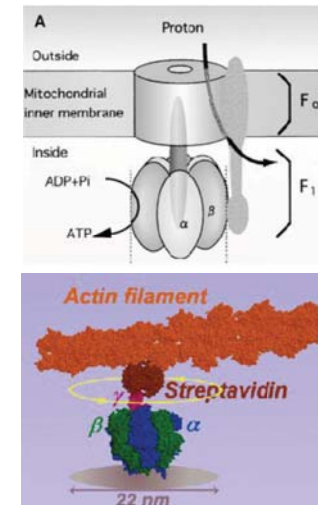




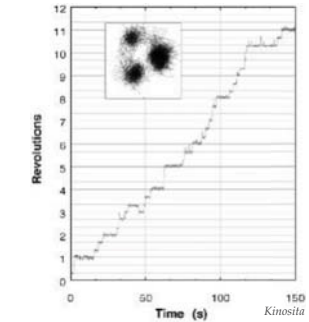
# MukBEF nanomechanika és kondenzációs model



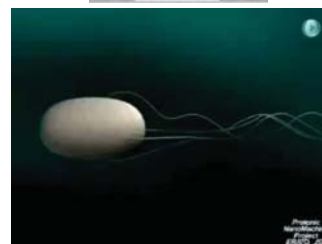
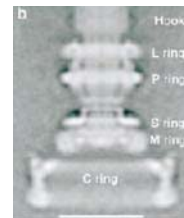
# ROTÁCIÓS MOTOROK I: F1F0-ATP SZINTETÁZ



Diszkrét 120° rotációs lépések

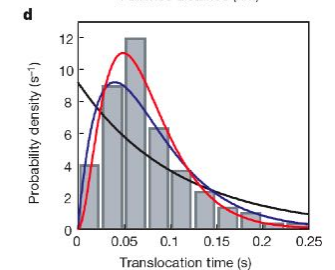
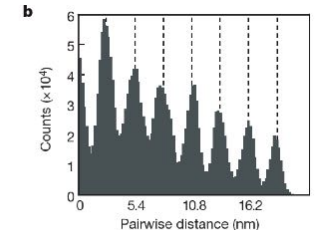
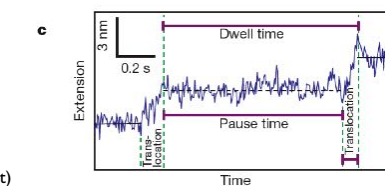
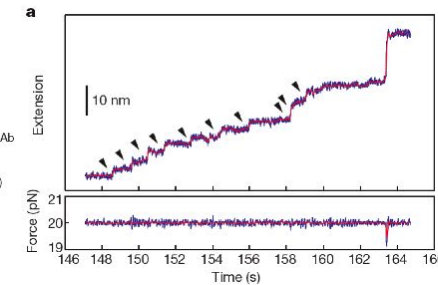
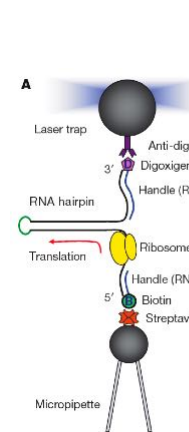


# ROTÁCIÓS MOTOROK II: Bakteriális flagellum motor



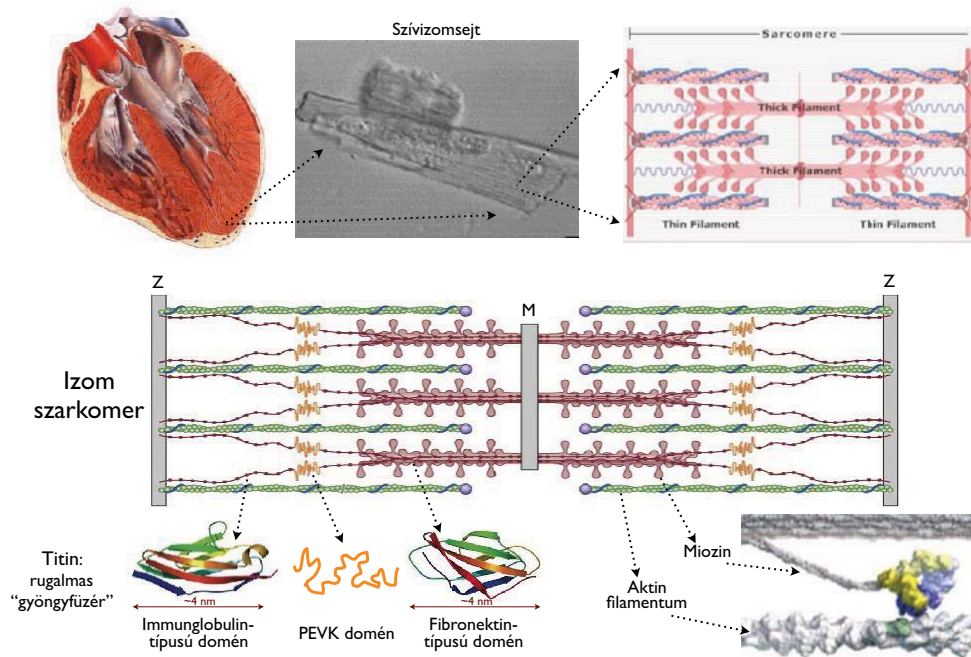
Fordulatszám: > 20000 rpm  
Fogyasztás:  $10^{-16}$  W  
Hatásfok: > 80%  
Energiaforrás: protonok

# Mechanoenzim komplex Riboszóma

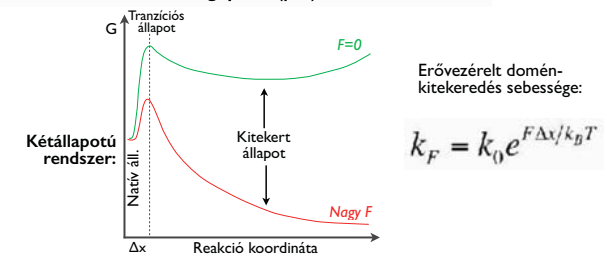
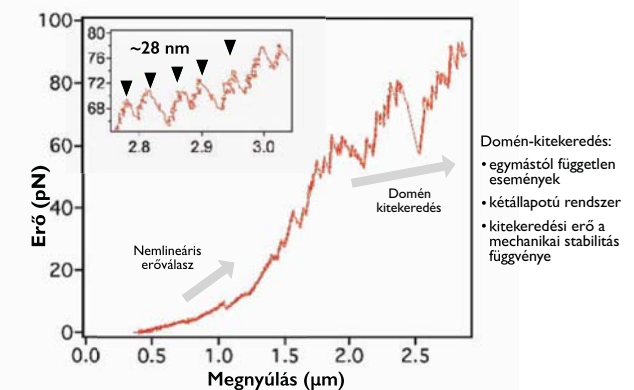
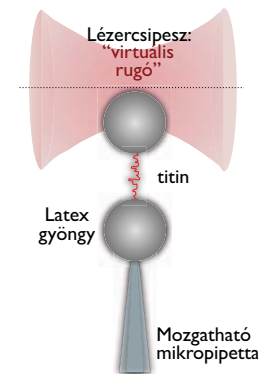


2.7 nm-es lépések (egy triplett)  
0.078 s transzlukációs idő  
Transzlukációval csatolt helikáz aktivitás

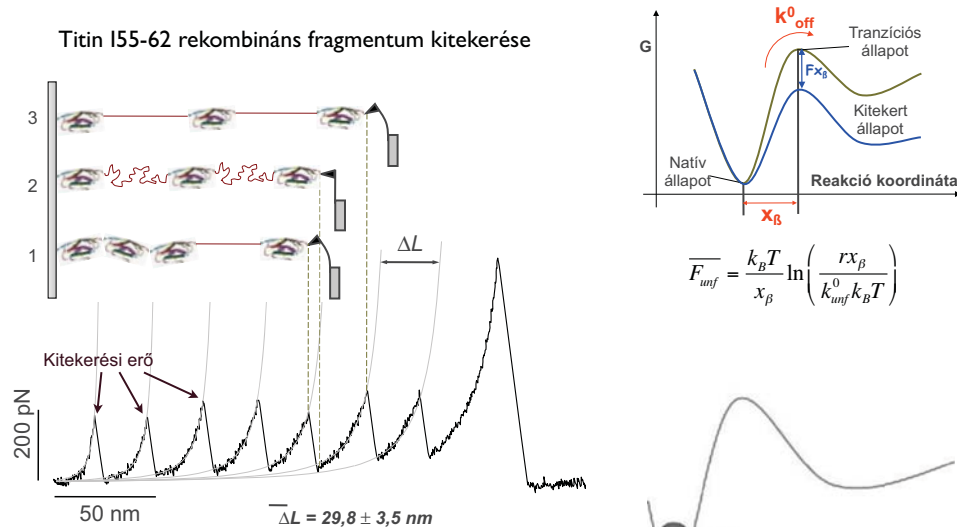
# “Kontraktilis” fehérjék az izomban



# Hogyan nyúlik a titin?



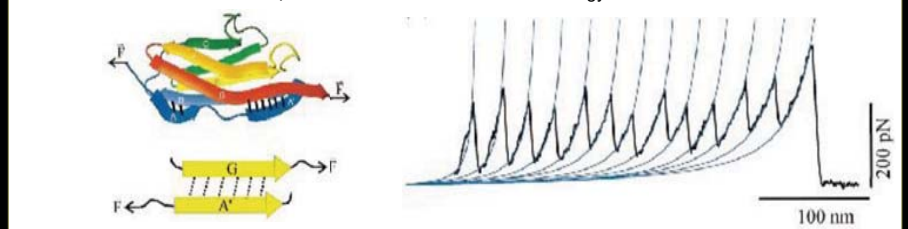
# Erővezérelt fehérje-kitékeredés



# Mechanikai stabilizálás H-kötések csatolásával

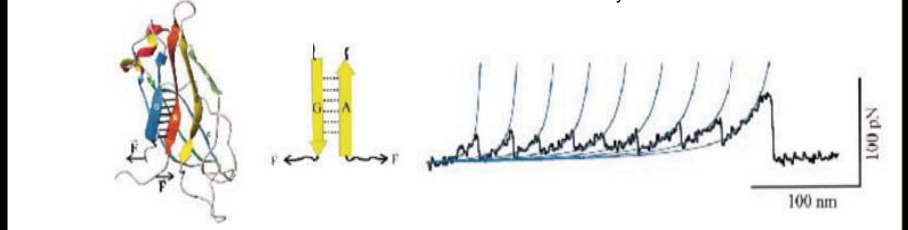
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kitékeredési erő



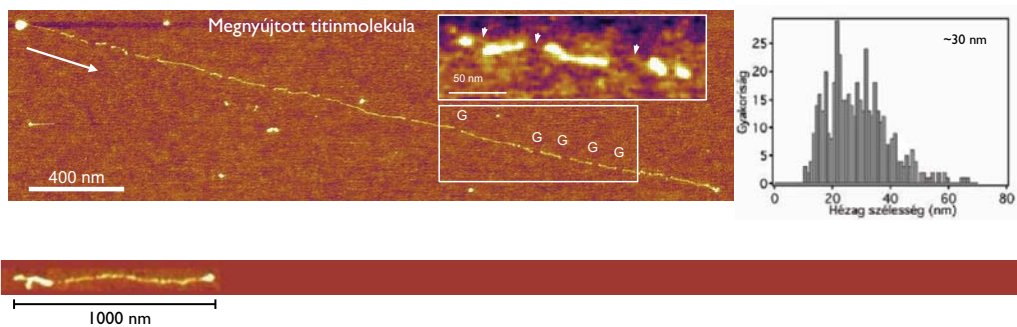
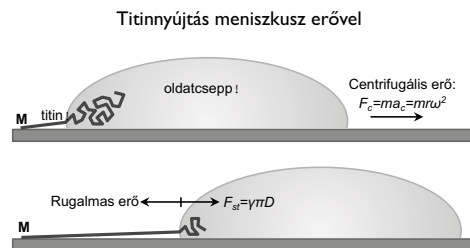
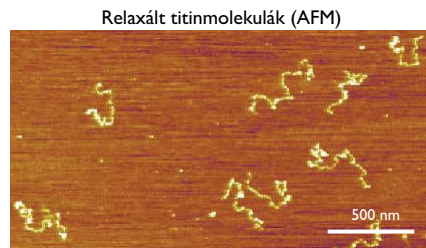
Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

Alacsony kitékeredési erő

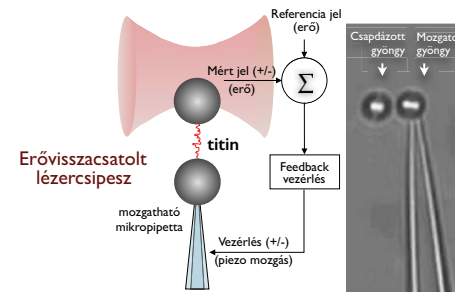
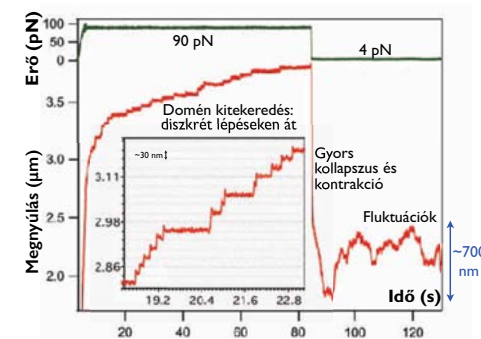
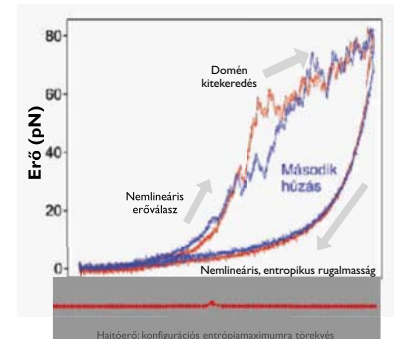




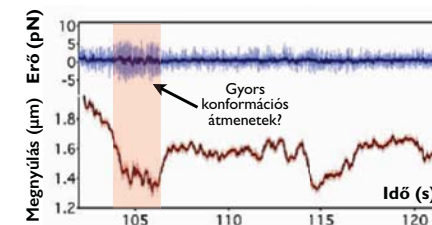
# Hol vannak az erővel kitekert domének?



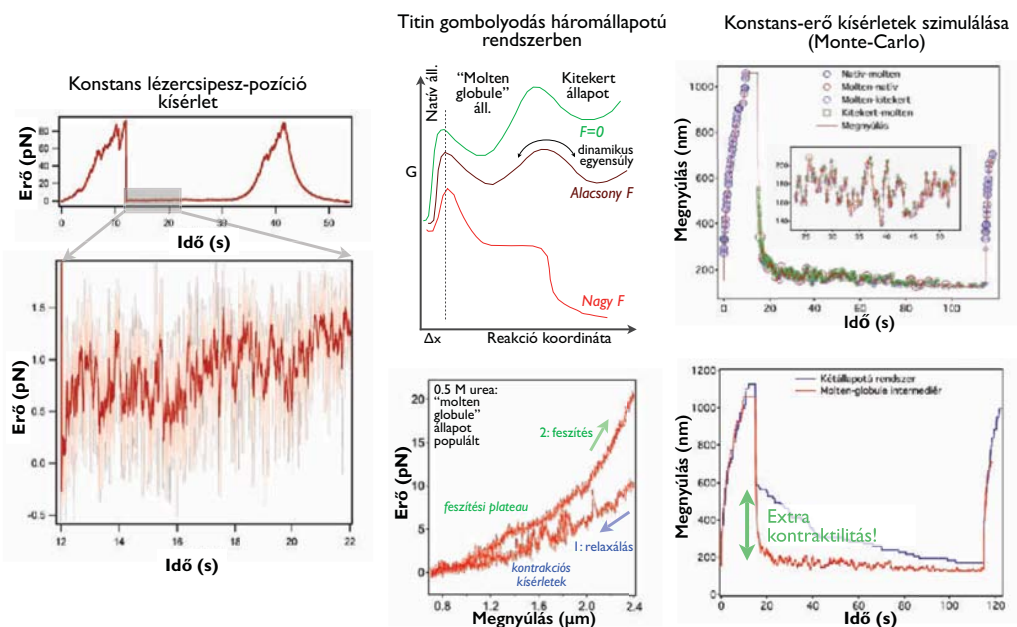
# Hogyan “kontrahál” a titin?



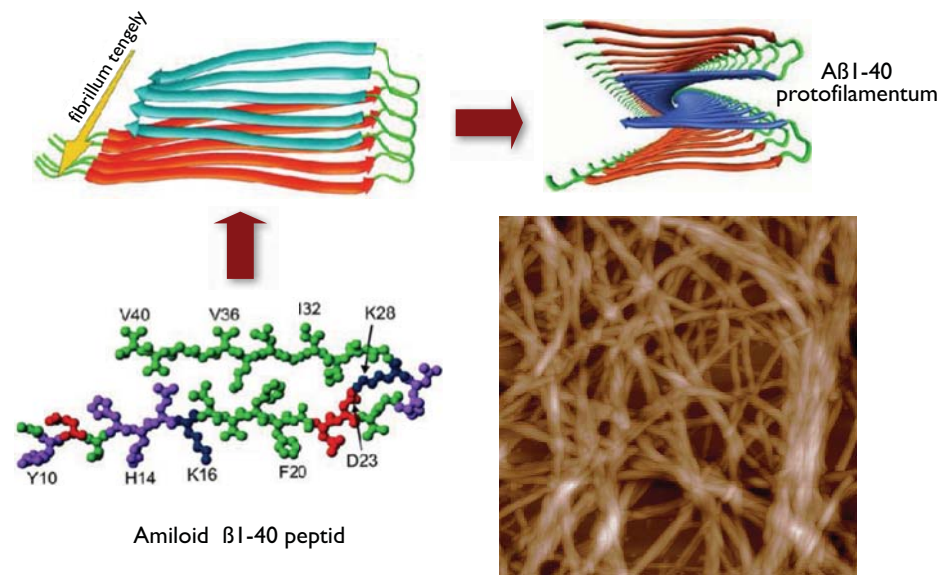
A fluktuációk nem magyarázhatók kétállapotú rendszerrel



# Titin gombolyodás intermediéren keresztül



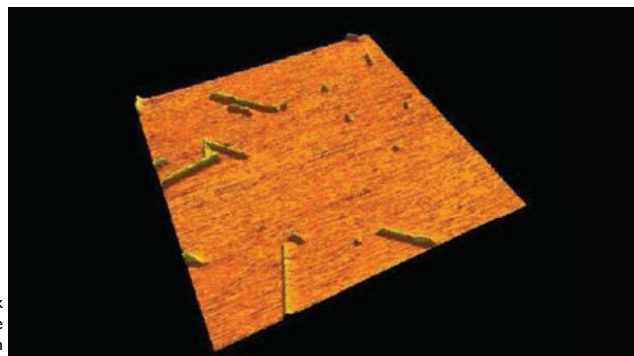
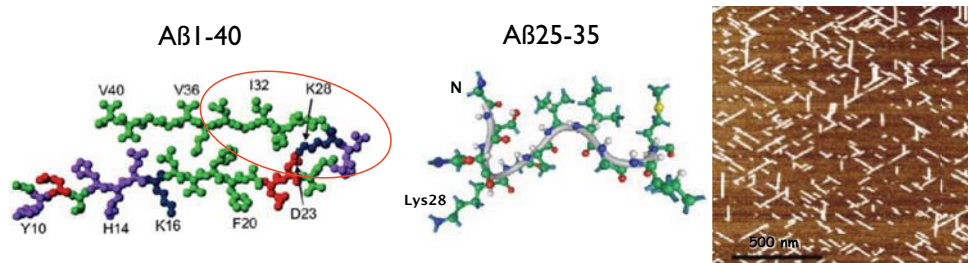
# Amiloid β-fibrillumok: az Alzheimer plakkok fontos komponensei



Aβ1-40 peptidből *in vitro* növesztett fibrillumok (AFM)

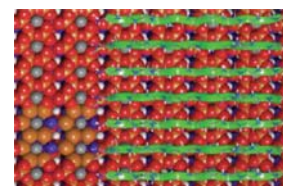
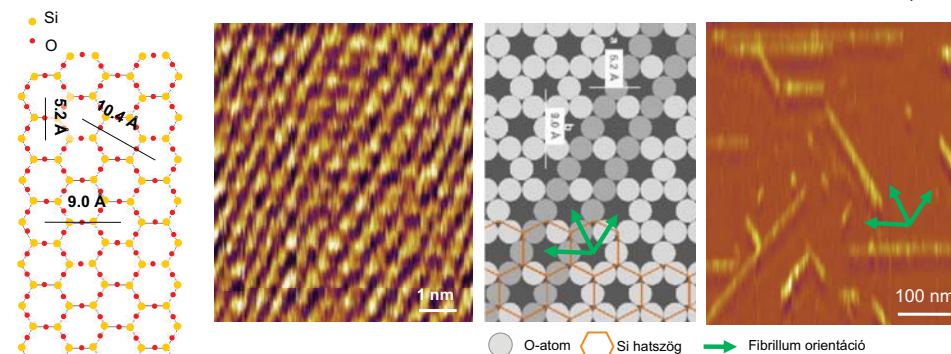


## Vezérelhető-e a fibrillum növekedés?

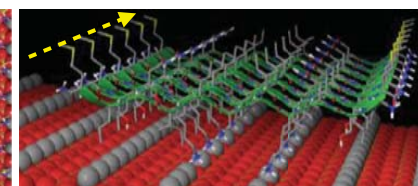


AB25-35 fibrillumok  
epitaxiális növekedése  
csillám felületen

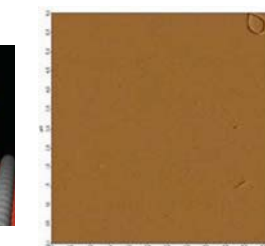
## Aß25-35 fibrillumok csillámfelületi orientációja



$\beta$ -lemezben antiparallel orientációjú peptidek

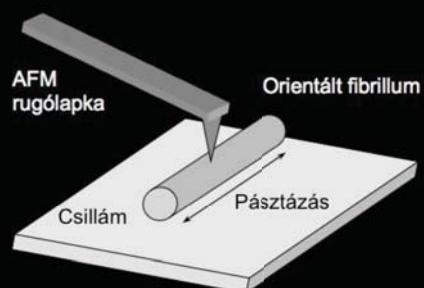


Lys28 oldallánc a  $K^+$ -kötő zsebben



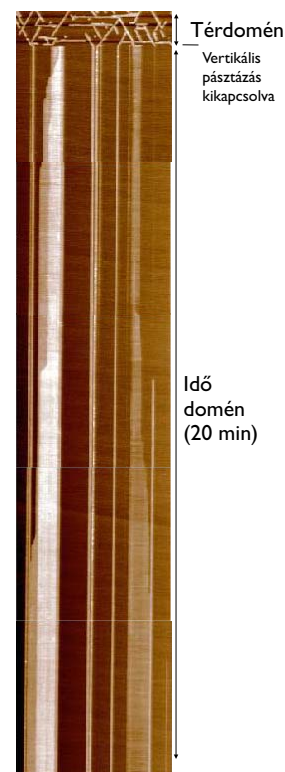
### Aβ25-35 Lys28-acetiláció hatása

**A katalizált fibrillum  
növekedés nano-skálájú  
mechanizmusa:  
pásztázó próba kimográfia**

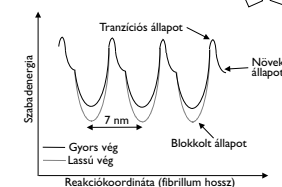
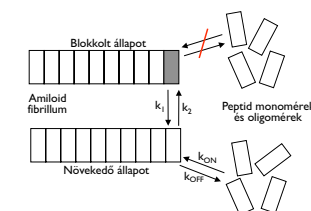
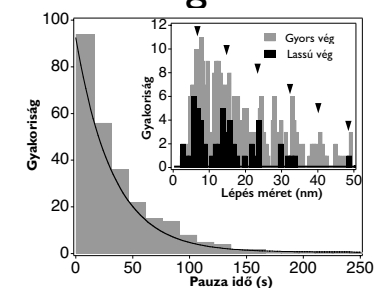
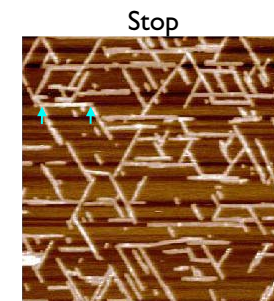
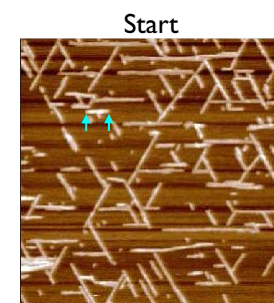


Térbeli felbontás:  
1 nm

Időbeli felbontás:  
300 ms

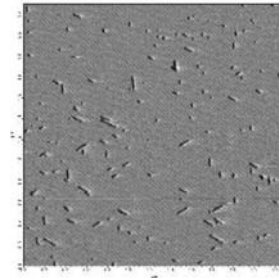
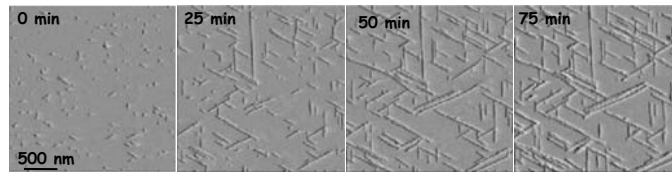


## Pásztázó próba kimográfia



# Szabályozható-e a fibrillum növekedés?

Alacsony  $K^+$  (15mM KCl): gyors felszíni kötődés és növekedés



Magas  $K^+$  (30mM KCl): lassú növekedés csak meglevő magokból

