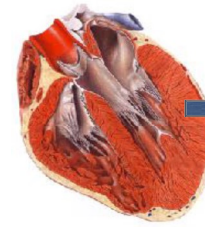


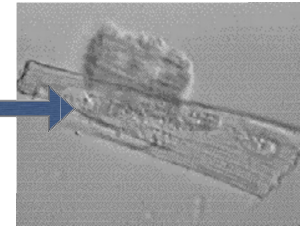
DINAMIKUS FEHÉRJERENDSZEREK A SEJT BEN

KELLERMAYER MIKLÓS

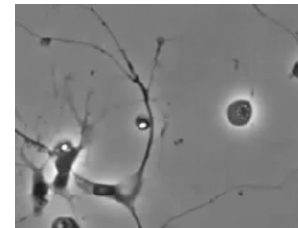
BIOLÓGIAI MOZGÁSOK



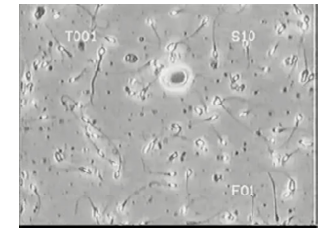
Ritmusosan összehúzódó szívizomsejt



Osztódó sejt

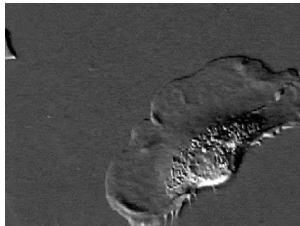


Axon (neurit) növekedés

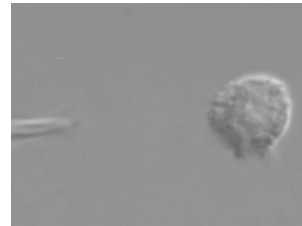


Mozgó spermatoцитák

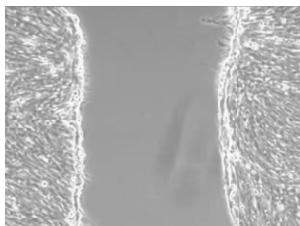
BIOLÓGIAI MOZGÁSOK



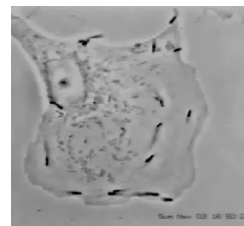
Tovakúszó keratinocita



Kemotaxis



Sebgyógyulás modell - fibroblasztok
kollektív mozgása



Listeria baktériumok
intracelluláris mozgása

A citoszkeletális rendszer

Intracelluláris dinamikus fehérje vázrendszer

Három fő filamentum-osztály:

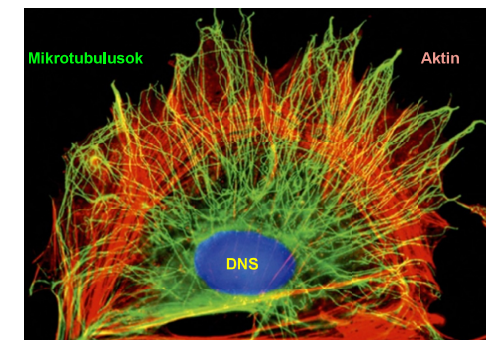
- A. Vékony (aktin)
- B. Intermedier
- C. Mikrotubulus

Filamentumok mechanikája fontos

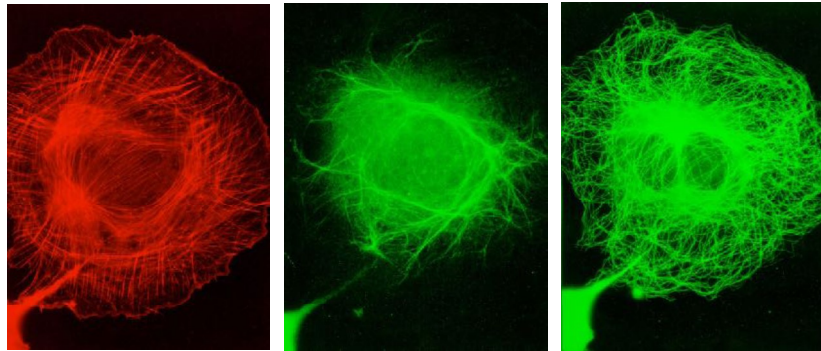
Polimerizáció: "okos téglák" alegységekből

Szerep:

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



A citoszkeletális rendszer



Aktin
(rodamin-phalloidin)

Vimentin
(anti-vimentin)

Mikrotubulusok
(GFP-tubulin)

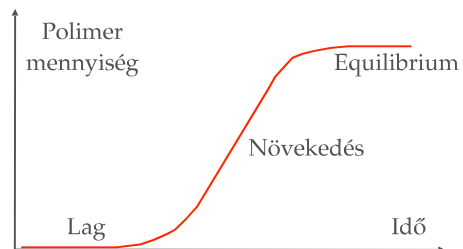
1. Mechanika
2. Polimerizáció

Polimerizáció

Alegységek összeállításának folyamata

A polimerizáció fázisai:

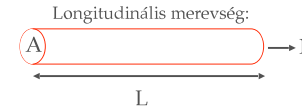
1. Lag fázis: nukleáció
2. Növekedés fázisa
3. Equilibrium (egyensúly) fázisa



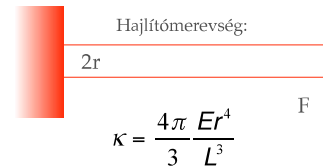
A citoszkeletális filamentumok rugalmassága

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.



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



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

"Termikus" rugalmasság

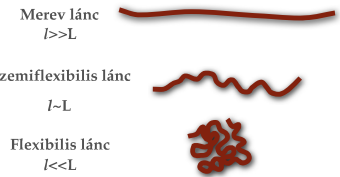
A polimerlánc átlagos alakja leírható egyszerű paraméterek segítségével:

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

A perzisztenciahossz a lánc hajlítómerevségével áll összefüggésben: minél rövidebb L_p , annál hajlékonyabb a lánc, és megfordítva.

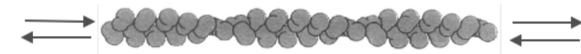
$$L_p = \frac{EI}{k_B T}$$

EI = hajlítómerevség
 E = Young modulus
 I = hajlítási tehetetlenségi nyomaték (körkeresztmetszetű rúd esetében $I = r^4 \pi / 4$)
 k_B = Boltzmann állandó
 T = abszolút hőmérséklet.



Polimerizációs egyensúlyok

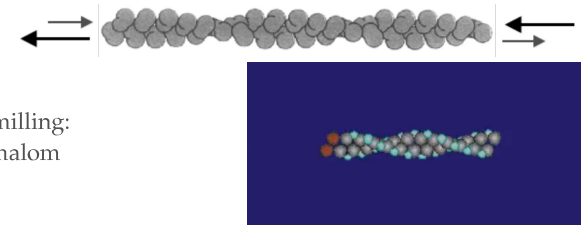
1. valódi equilibrium



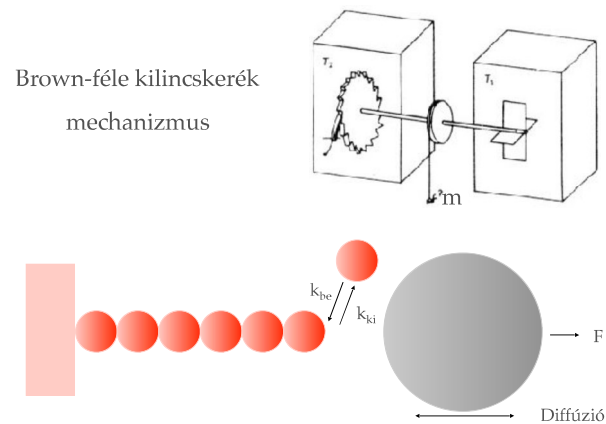
2. dinamikus instabilitás: folyamatos, lassú növekedést követő katasztrofikus depolimerizáció



3. Treadmilling: taposómalom



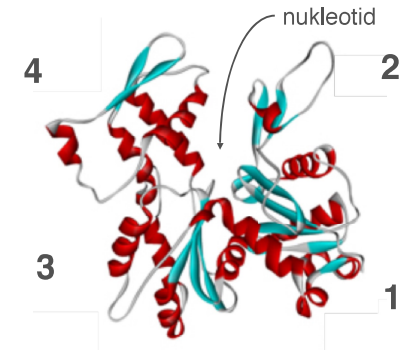
Erőkifejtés citoszkeletális filamentum polimerizációjával



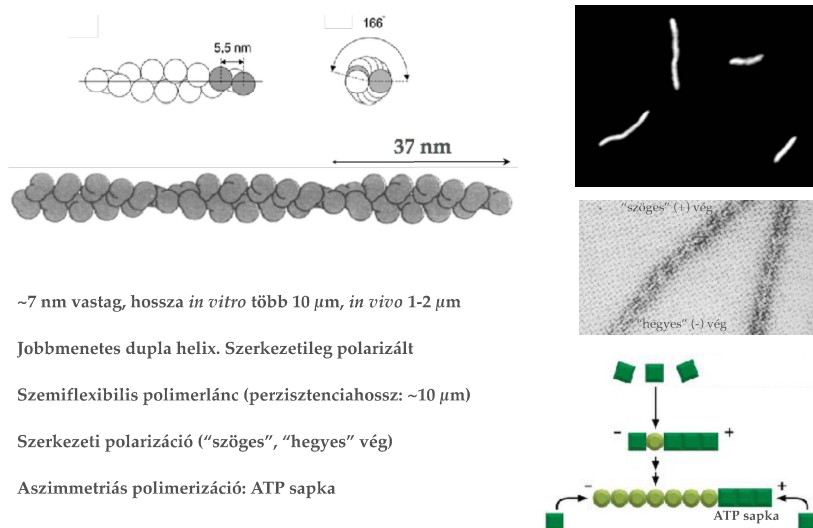
Az aktin monomer (G-aktin)

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)

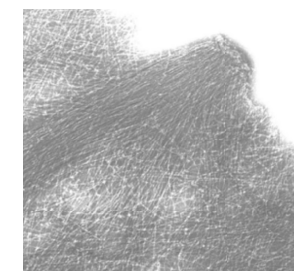
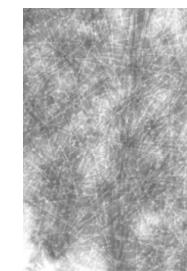
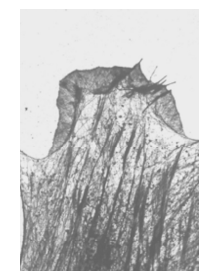
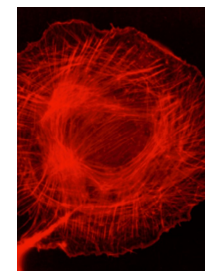
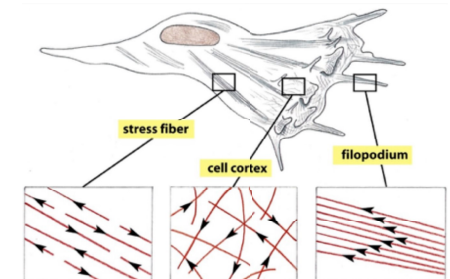


Az aktin filamentum (F-aktin)



Aktin a sejtben

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

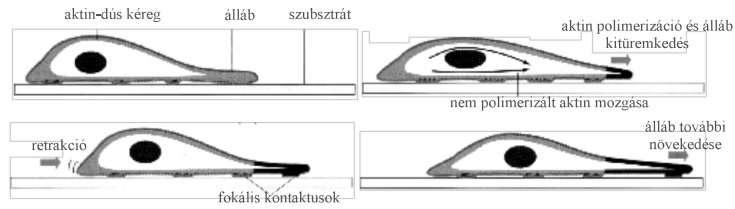


Stress rostok

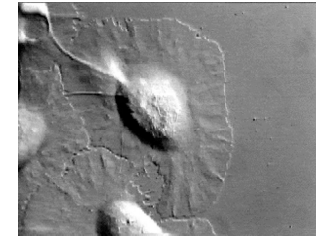
cortex

filopodium

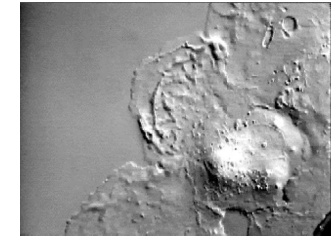
Aktin-függő sejtmozgás



Aktin-függő sejtmozgás megnyilvánulásai



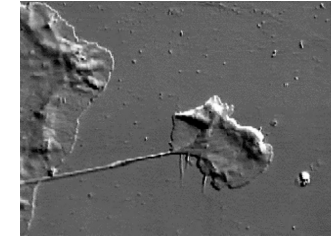
Retrográd áramlás



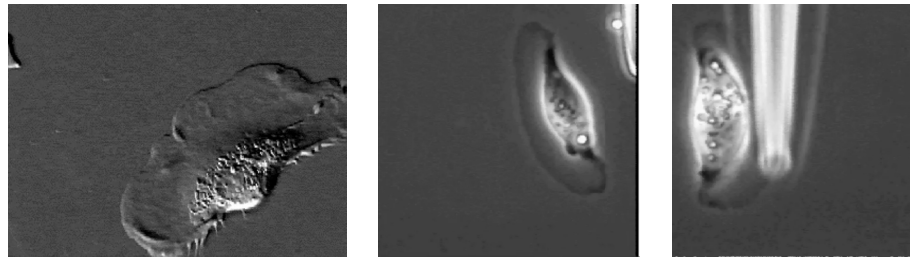
Filopodium képződési dinamika



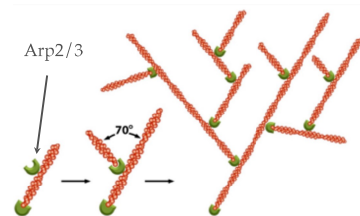
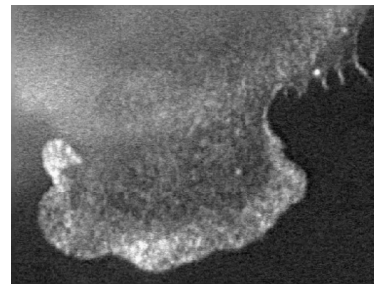
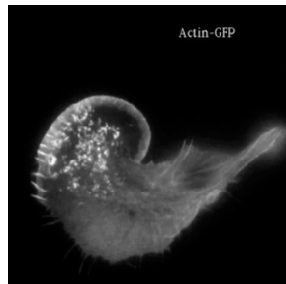
Citoplazst (anukleáris sejtfagmentum) autonóm mozgása)



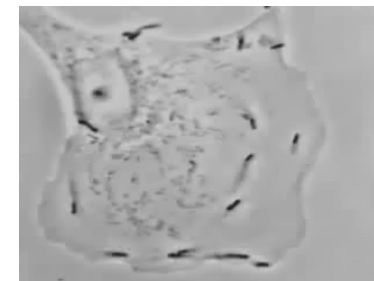
Membrán fodrozódás



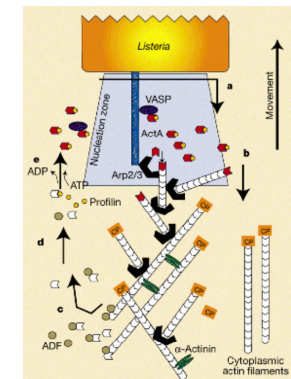
Aktin dinamika a lamellipodiumban



Intracelluláris patogének is kihasználják az aktin rendszert

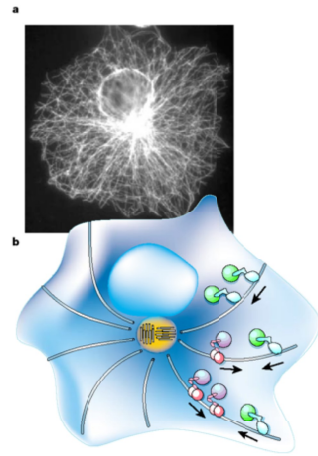
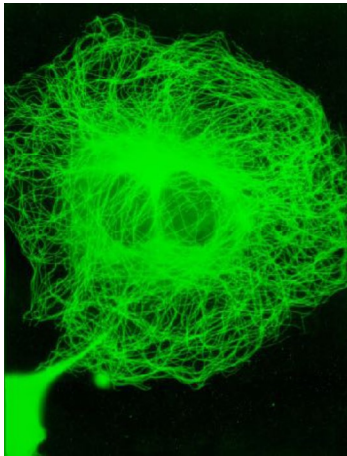


Listeria monocytogenes intracelluláris motilitása



Mikrotubuláris rendszer

Eukarióta sejtek tubulinból és kapcsolódó fehérjékből álló rendszere.



A mikrotubulusok építőköve: tubulin

Alegység: tubulin

Idegszövetben az összfehérje 10-20%-a

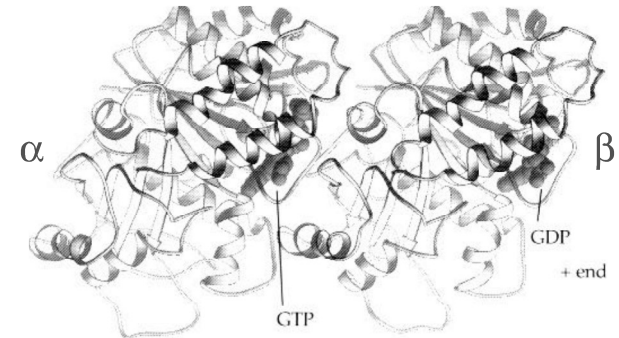
MW: ~50 kD: α - és β -tubulin \rightarrow heterodimér

1 molekula kötött guanozin nukleotid (GTP vagy GDP);

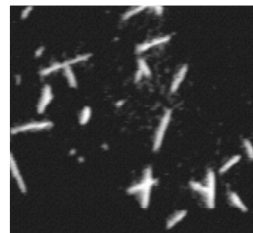
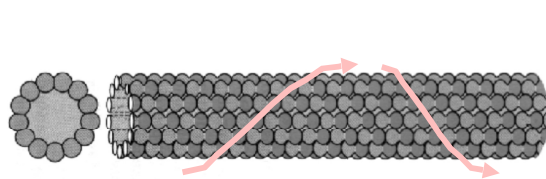
kicserélhető (β), illetve nem kicserélhető (α)

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:

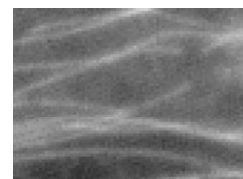
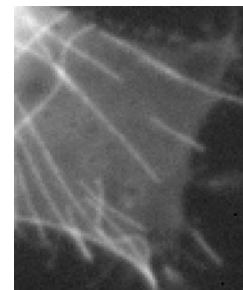
+vég: polimerizáció gyors, β -alegység által terminált

-vég: polimerizáció lassú, α -alegység által terminált

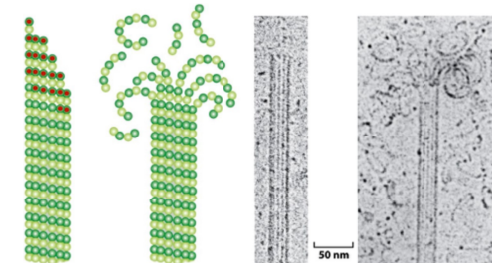
GTP-sapka

Polimerizációs egyensúlyok mikrotubulusokban

Treadmilling



Dinamikus instabilitás



Mikrotubuláris rendszer az eukarióta sejtben

Hol található az eukarióta sejtben?

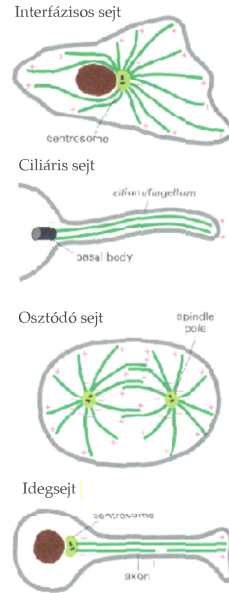
interfázisos sejt cytoplasmája, axon, cilium, flagellum, osztódó sejt húzóorsója.

Polaritás a sejtben belül

centrosomában -vég, a periférián +vég.

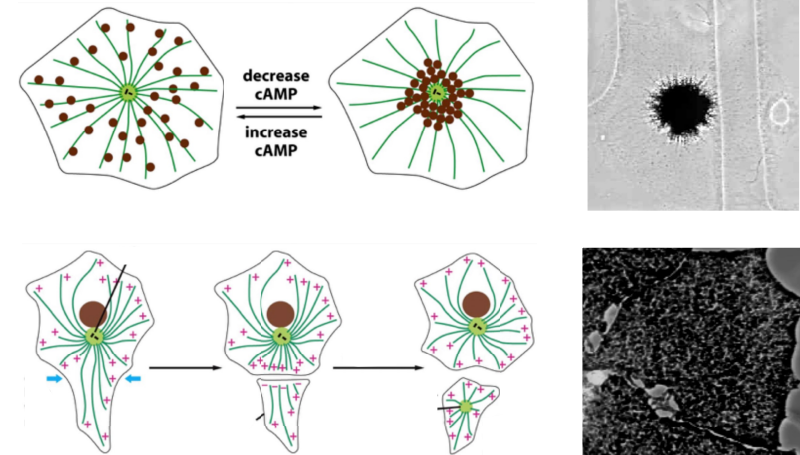
Centrosoma: 2 centriolum, centrosoma matrix, benne γ -tubulin

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



Mikrotubuláris rendszer funkciói

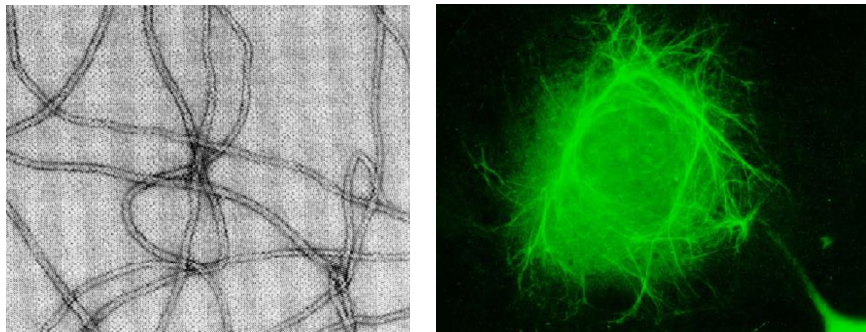
1. Autópályák motorfehérjék számára
2. Érzékeli, monitorozza és megtalálja a sejt geometriai középpontját
3. Motilitási funkciók (sejtosztódás)



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:

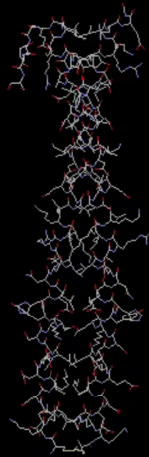
- Kémiai ellenálló (detergensek, magas ionerősség)
- Denaturáló szerekkel (pl. urea) extrahálható
- Fibrózus monomer (nem globuláris, mint az aktin vagy tubulin)
 - amino-terminális fej
 - centrális rúd (α -hélix, heptád ismétlődés)
 - carboxy-terminális farok
 - a szövetspecifikus monomerek egymástól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

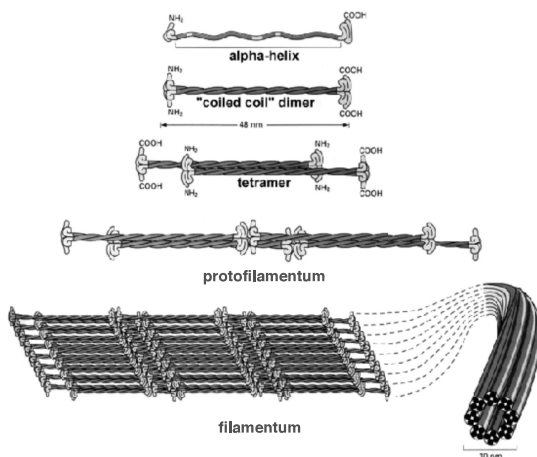
A sejten teljesen polimerizált állapotban
(nem dinamikus egyensúly)

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

2 dimer → tetramer
(antiparallel elrendeződés,
szerkezeti apolaritás)

Tetramerek longitudinális sorozata
→ protofilamentum

8 protofilamentum → filamentum



Intermedier filamentumok csoportosítása

Szövetspecifititás alapján
(Klasszikus csoportosítás)

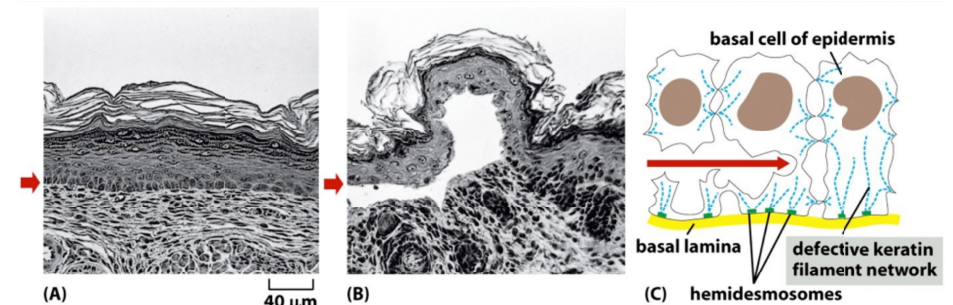
Szövet típus	Intermedier filamentum
Epithelium	Keratinok
Izom	Dezmin
Mesenchyma	Vimentin
Glia	Gliais fibrillaris savanyú fehérje (GFAP)
Ideg	Neurofilamentum (NF-L, NF-M, NF-H)

Intemedier filamentumok szöveti funkciói

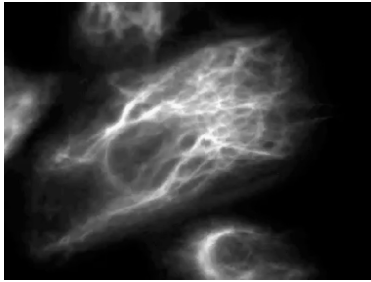
Szöveti mechanikai stabilitás biztosítása

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

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

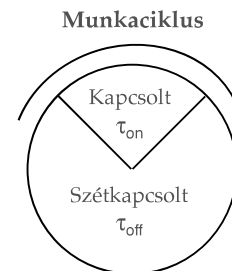
Riboszóma

MOTORFEHÉRJÉK

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

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.

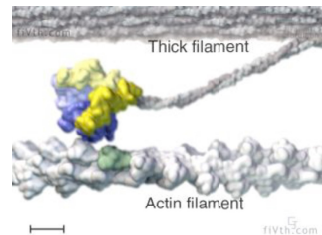
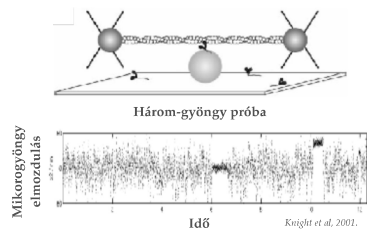
Nonprocesszív motor: $r < 1$

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

Egyetlen motorfehérje által kifejtett erő: néhány pN.

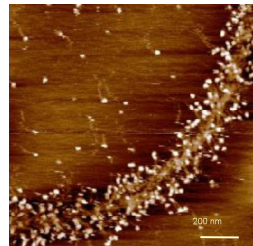
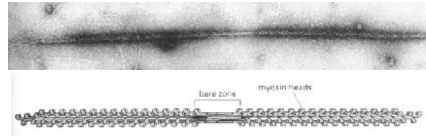
NEM-PROCESSZÍV MOTORFEHÉRJÉK

Miozin



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

A nem-processzív motorok sokaságban dolgoznak.

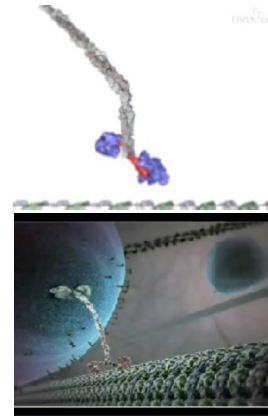


Szintetikus vastag filamentum
AFM felvétel

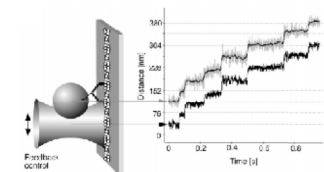
PROCESSZÍV MOTORFEHÉRJÉK

Kinezin

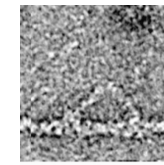
Lépéstávolság: 8 nm (minden második tubulin alegység közötti távolság)



Miozin V

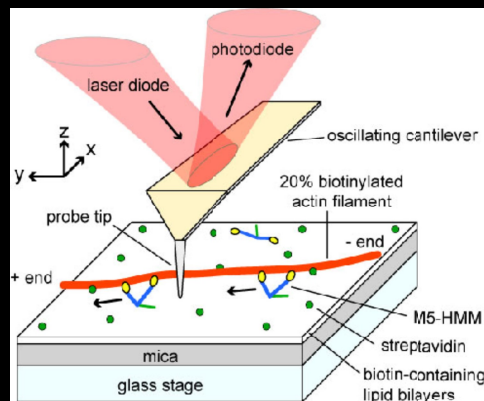


Lépéstávolság: ~36 nm
(aktin filament hélix félmenet emelkedés)

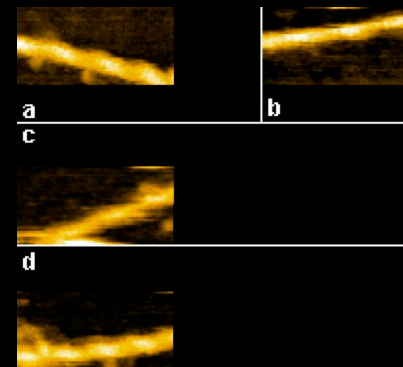


A processzív motorok egyedül dolgoznak.

Ultragyors AFM mérések a miozin V-HMM molekulán



Egyirányú processzív mozgás



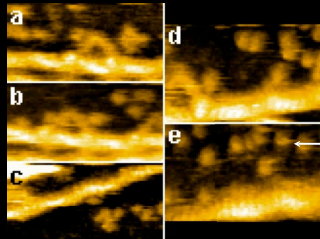
Stomping:
• Rapid detachment-reattachment
• ~5 nm translocation

▲ Trailing (T) head stomping event

▲ Leading (L) head stomping event

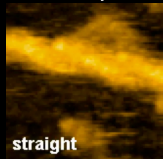
Intramolekuláris változások

Hand-over-hand stepping



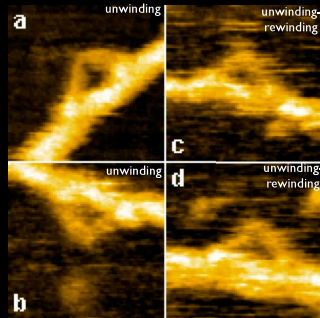
▲ Leading (L) head stomping event

“Straight” - “sharp bend” transition



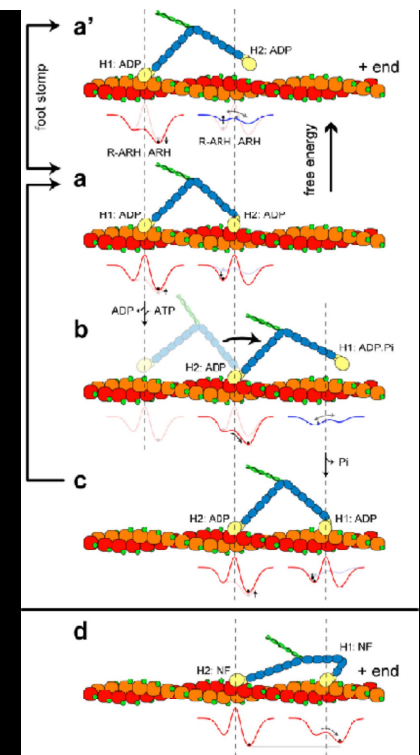
straight

Coiled-coil tail unwinding



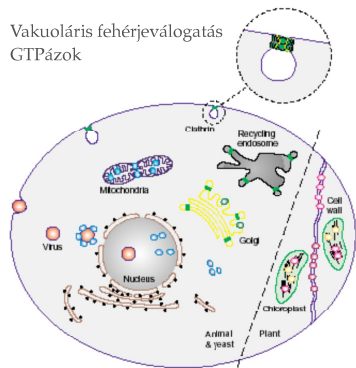
Lépési mechanizmus

- 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” (→ 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.

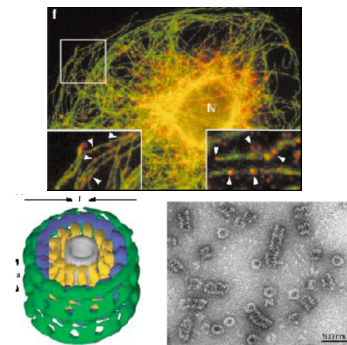


Dinaminok

Vakuoláris fehérjeválogatás
GTPázok

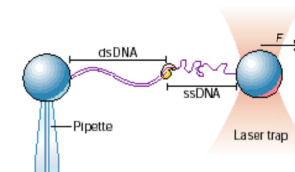


Protein	Localization	Function	Self-assembly
Dynamin	Plasma membrane (clathrin coated vesicles), Golgi, endosomes	Vesicle formation, vesicle formation and transport	+
Vps1	Golgi	Mitochondrial fission & morphology	Unknown
Dnm1/Drp1/COP1	Mitochondria outer membrane	Mitochondrial fission & morphology	+
Meg11/Atg13/COP1	Mitochondria inner or outer membrane, or matrix	Mitochondrial fission & morphology	Unknown
Phagocytosis	Cell wall	Membrane morphology	+
AOL1	Cell wall, chloroplast	Membrane biogenesis	+
AOL2	Chloroplast	Membrane biogenesis	Unknown
Cytoplasm	Cytoplasm	Antiviral activity	+
Mx	Cytoplasm, nucleus	Antiviral activity	+

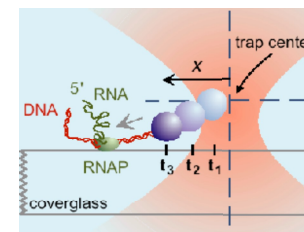


“pinchase” funkció

DNS Motorok

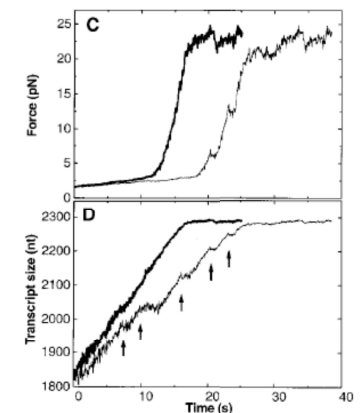


T7 DNS Polimeráz



RNS Polimeráz

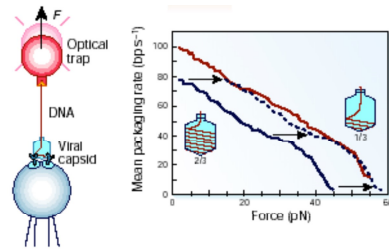
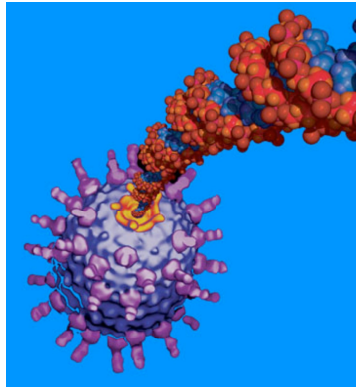
Processzív motorok



RNS Polimeráz, Wang et al. 1998.

Vírus portális motor

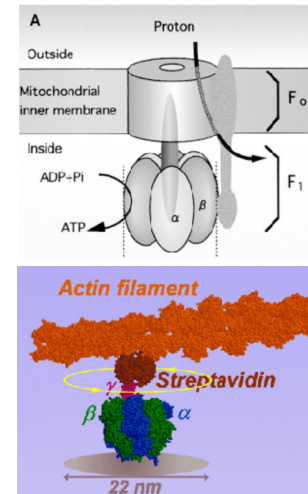
Különleges DNS motor



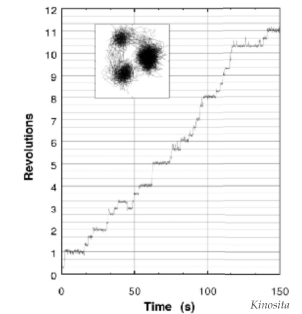
$\phi 29$ bakteriofág portális motor

ROTÁCIÓS MOTOROK I:

F1F0-ATP SZINTETÁZ

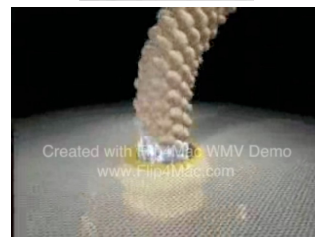
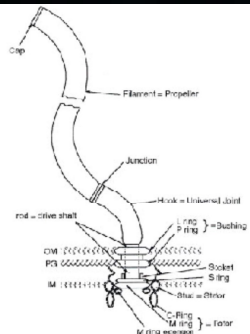
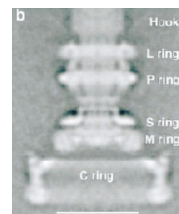
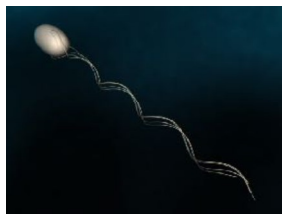


Diszkrét 120° rotációs lépések



ROTÁCIÓS MOTOROK II:

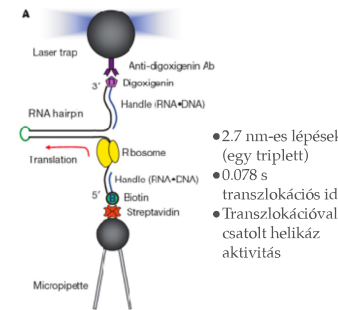
Bakteriális flagellum motor



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

Mechanoenzim komplex

Riboszóma



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

