

Fyziológia živočíšnej bunky

2. ročník Mgr.

Iveta Herichová

herichova1@uniba.sk

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského Bratislava

1

Ciele predmetu:

- opakovanie vedomostí o bunke pred štátnicami
- prehĺbenie existujúcich vedomostí
- doloženie niektorých prednášaných informácií experimentálnymi dôkazmi

Forma štúdia

- prednášky
- samoštúdium z doporučených učebníc
- samoštúdium z doporučených odborných článkov

2

Oznamy a umiestnenie prednášok

- oficiálna stránka katedry na univerzitnom webe

Skúška: písomná a následne ústna, všetko v jeden deň

Čas cca 11:00 – 16:00

- Hodnotenie – min 60% na E
- Termíny skúšok

Doporučená literatúra:

- **Prednášky**
- **Vaše poznámky**
- **The Cell**

3

Skúška: písomná a následne ústna

Doporučená literatúra:



-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>

4

Fyziológia živočíšnej bunky

1. Aktín

Iveta Herichová

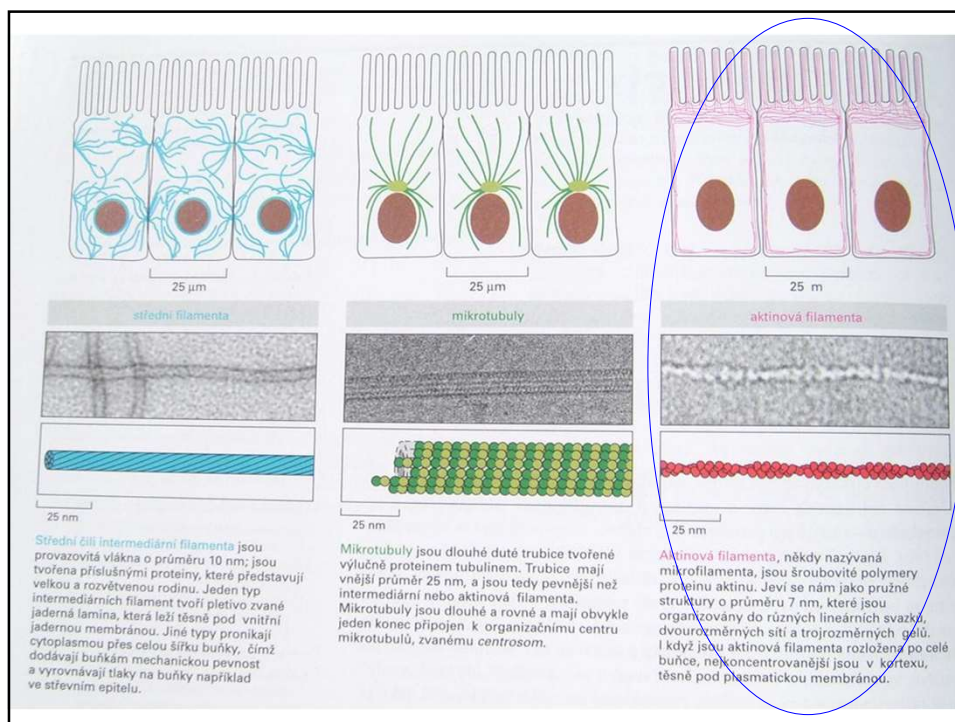
Katedra živočíšnej fyziológie a etológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského Bratislava

5

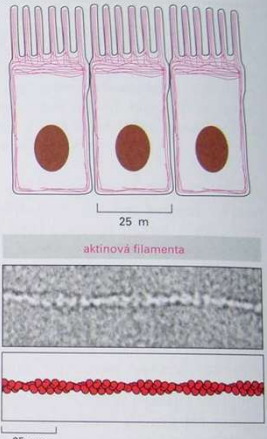
Cytoskelet

- sieť proteínových vlákien v cytoplazme, zabezpečujúca vnútornú organizáciu bunky
- dynamická kostra
- umožňuje eukaryotickým bunkám tvarovanie, pohyb a poskytuje bunke oporu
- pohyb organel, transport medzi nimi, rozdelenie chromozómov, zaškrcovanie živočíšnej bunky
- nie je u prokaryotov
- tri typy: stredné vlákna, mikrotubuly a mikrofilamenty
- každý typ vlákien je z iného typu proteínov
- *stredné vlákna*: rodina vláknitých proteínov
- *mikrotubuly*: tubulín
- *mikrofilamenty*: aktín

6



7



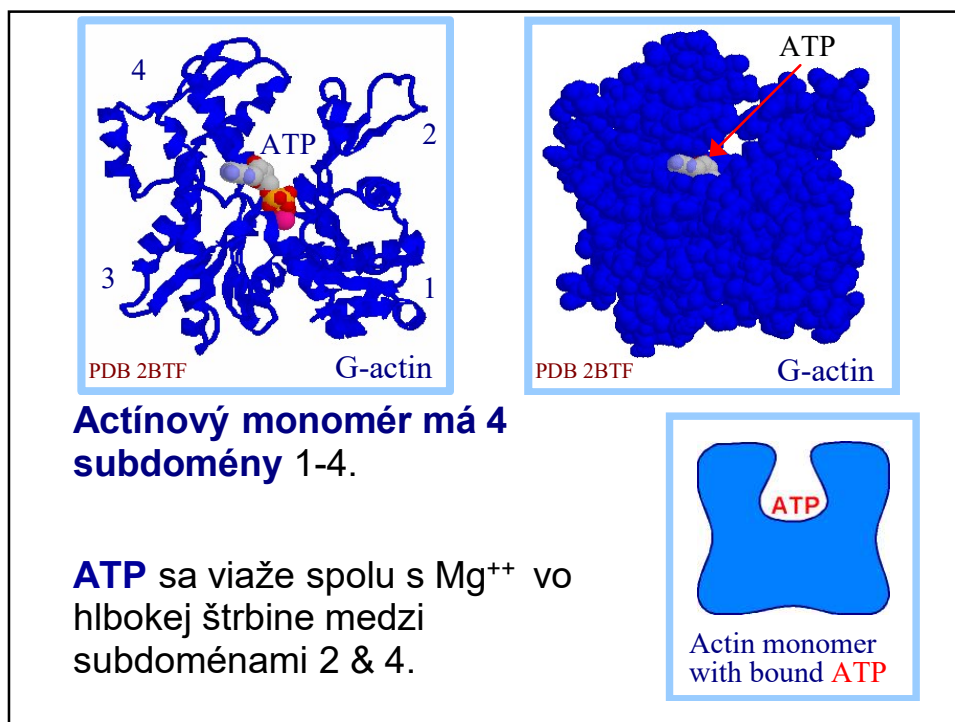
link

Aktinové vlákna

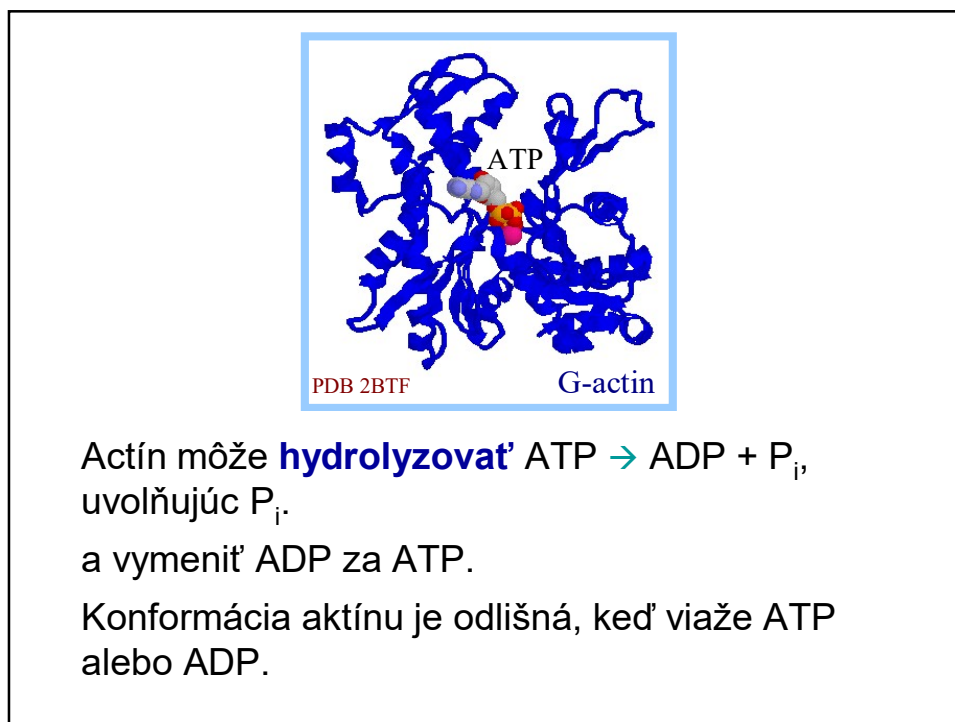
- vlákna s priemerom 7nm
- dva stočené reťazce pozostávajúce z rovnakých globulárnych molekúl aktínu (G-aktín), aktinové vlákna sú tenké a pružné (F-aktín)
- vo všetkých eukaryotických bunkách
- bez aktinových vlákien by sa živočíšna bunka nebola schopná pohybovať po podklade, nemohla by pohlcovať veľké častice pomocou fagocytózy, nemohla by sa deliť
- aktinové vlákna môžu v bunkách vytvárať aj stabilné štruktúry (napr. kotraktilný systém vo svaloch)

Aktinová filamenta, někdy nazývaná mikrofilamenta, jsou šroubovitě polymery proteinu aktinu. Jeví se nám jako pružné struktury o průměru 7 nm, které jsou organizovány do různých lineárních svazků, dvourozměrných sítí a trojrozměrných gelů. I když jsou aktinová filamenta rozložena po celé buňce, nejkoncentrovanější jsou v kortexu, těsně pod plasmatickou membránou.

8



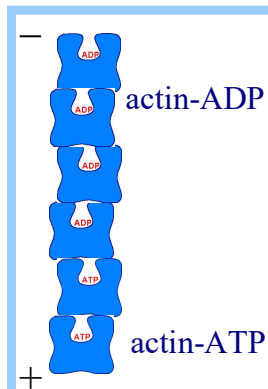
9



10

- všetky molekuly v reťazci smerujú rovnakým smerom pozdĺž osy vlákna, preto majú aktínové vlákna štrukturálnu polaritu, konce vlákna sú označované ako plus-koniec a mínus-koniec
- aktínové vlákna sú väčšinou organizované vo zväzkoch alebo sieťach, ktoré sú oveľa pevnejšie
- aktínové vlákna môžu rásť na plus aj mínus konci, ale rýchlosť rastu je väčšia na plus konci vlákna
- aktínové vlákno bez asociovaných proteínov je nestabilné a k jeho rozpadu môže dochádzať na oboch koncoch

- aktínové vlákna sú tenšie, pružnejšie a zvyčajne kratšie ako mikrotubuly
- v bunke je oveľa viac aktínových vlákien než mikrotubulov
- celková dĺžka aktínových vlákien v bunke je viac než 30 krát väčšia než dĺžka mikrotubulových vlákien

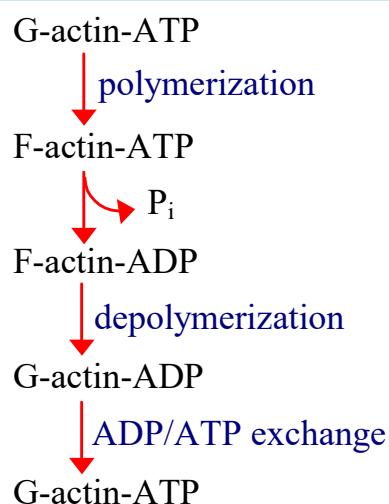


11

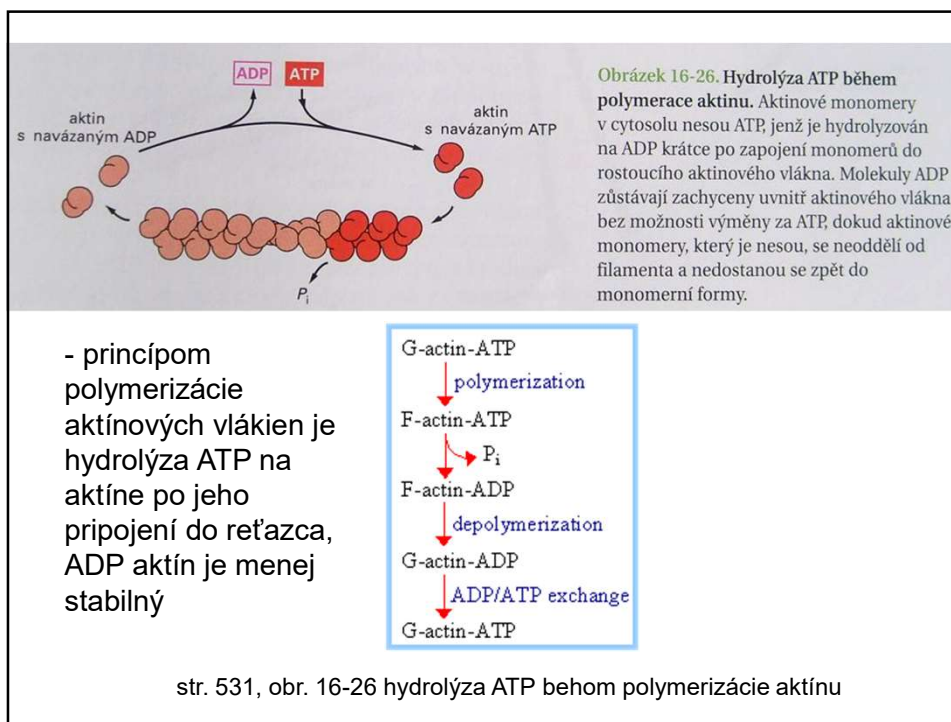
G-aktín (globulárny aktín), s naviazaným ATP, môže polymerizovať a tvoriť **F-aktín** (vláknitý).

F-aktín môže **hydrolyzovať** naviazaný ATP $\rightarrow$ ADP + P_i & uvoľnený P_i . ADP nemôže uniknúť z filamentu, lebo otvor štrbiny je zablokovaný.

ADP/ATP výmena: G-aktín môže uvoľniť ADP & bind ATP, ktorý je zvyčajne prítomný v cytoplazme vo vyššej koncentrácii ako ADP.



12



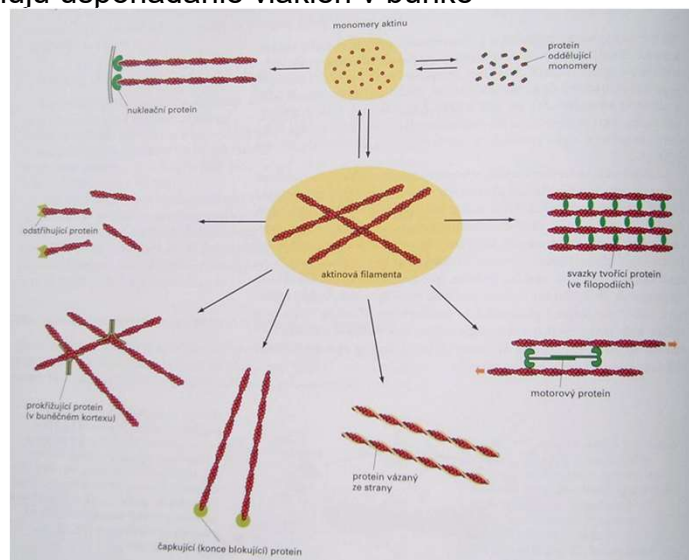
13

- aktínové vlákna sa spájajú s veľkým počtom aktín-viažúcich proteínov, ktoré umožňujú, aby vlákna vykonávali rôzne bunkové funkcie
- napr: relatívne stabilné proteíny asociované s aktínovými vláknami sú vlákna v mikrokľkoch tvoriacich výstelku tenkého čreva
- ďalší príklad je vytváranie malých miniatúrnych vnútrobunkových „svalov“
- aktínové vlákna sa môžu stať relatívne stabilnými štruktúrami vo výbežkoch bunky, ktorými ohmatáva okolie alebo v
- kontraktilnom prstenci, ktorý zaškrtením rozdeľuje cytoplazmu na dve časti
- prítomnosť špecifického aktín-viažúceho proteínu určuje, aké typy usporiadania aktínových vlákien sa v bunke vytvoria

link

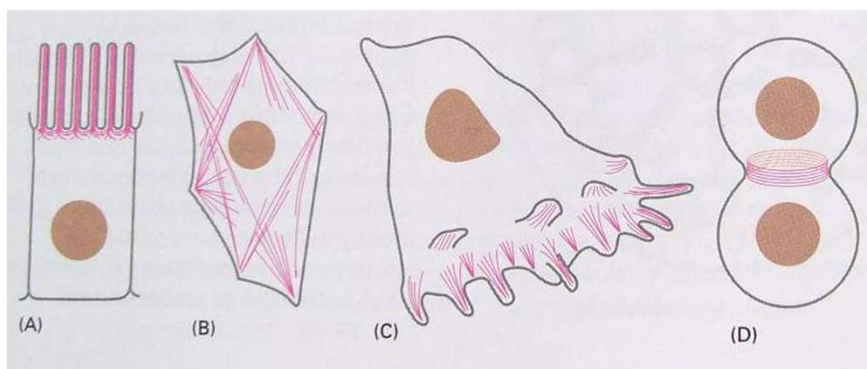
14

- špecifické proteíny svojou väzbou na aktínové vlákna ovplyvňujú usporiadanie vlákien v bunke



str. 532, obr 16-27 skupiny aktín-viažúcich proteínov v bunke

15



Obrázek 16-24. Svazky aktinových vláken v buňkách. Různé aktinové buněčné struktury jsou znázorněny červeně. (A) Mikrokly na povrchu střevní výstelky. (B) Kontraktilní svazky v cytoplasmě. (C) Listovité (*lamellipodia*) a prstovité (*filopodia*) výběžky na vedoucím okraji pohybující se buňky. (D) Kontraktilní prstenec během buněčného dělení.

[link](#)

str. 530, obr 16-24, funkcie aktínových vláken v bunke

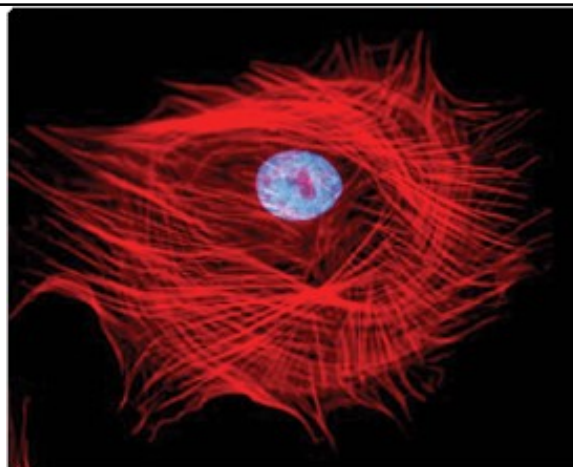
16

- aktínové vlákna sú flexibilné
- typické aktínové vlákno pretrváva v bunke len niekoľko minút
- v bežnej živočíšnej bunke tvorí aktín 5% všetkých proteínov, z toho je polovica vo forme vlákien, zvyšok monoméry v cytoplazme
- koncentrácia aktínu v cytoplazme je oveľa vyššia než je potrebné k polymerizácii *in vitro*, lebo
- v cytoplazme sú malé proteíny napr. *thymosin* a *profilin*, ktoré sa viažu k monomérom aktínu a ovplyvňujú polymerizáciu
 - [animácia](#) - [link](#)

17

- *thymosin* – tvorí komplex s G-aktínom, ak je jeho koncentrácia privysoká, vyvážuje G-aktín z poolu voľných molekúl a môže spôsobiť depolymerizáciu F-aktínu
- *profilin* – tvorí komplex s G-aktínom, mení jeho konformáciu tak, že molekula sa viac otvára do cytosolu, podporuje výmenu ATP/ADP a stúpa koncentrácia G-aktínu ATP, vlákno sa nezaloží, ale existujúce vlákno sa predlžuje
- **Experimentálne manipulácia**
 - *cofilin* – viaže sa k aktín-ADP podjednotkám F aktínu a rozrušuje ho
 - *cytochalasíny* – viažu sa na + koniec F-aktínu a blokujú polymerizáciu, okamžite dôjde k zmrazeniu pohybu
 - *faloidin* – viaže sa pozdĺž aktínového vlákna a stabilizuje ho, často sa využíva na vizualizáciu aktínových vlákien po zafarbení fluorescenčnou farbičkou

18



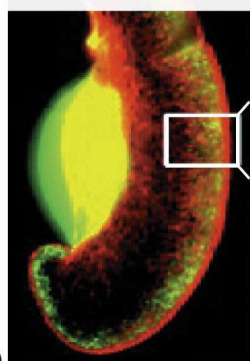
Rhodamine phalloidinové farbenie F-aktínu fibroblastov.

The actin cytoskeleton of a fixed and permabilized muntjac skin fibroblast was labeled with rhodamine phalloidin; the nucleus was stained with DAPI.

19

- *cofilin* – viaže sa k aktín-ADP podjednotkám F aktínu a rozrušuje ho

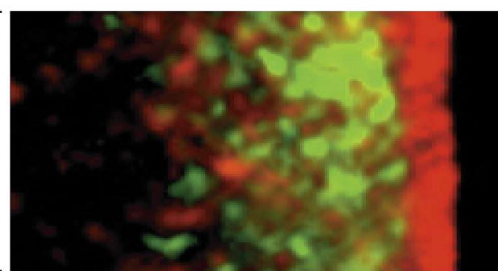
- neviaže sa na aktín-ATP



(A)

COFILIN IN LAMELLIPODIA

(A) A keratocyte with actin filaments labeled in red by fluorescent phalloidin and cofilin labeled in green with a fluorescent antibody. The regions where the two overlap appear yellow. Although the dense actin meshwork reaches all the way through the lamellipodium, cofilin is not found at the very leading edge, lebo tam je ATP čiapočka.



(B)

actin and cofilin

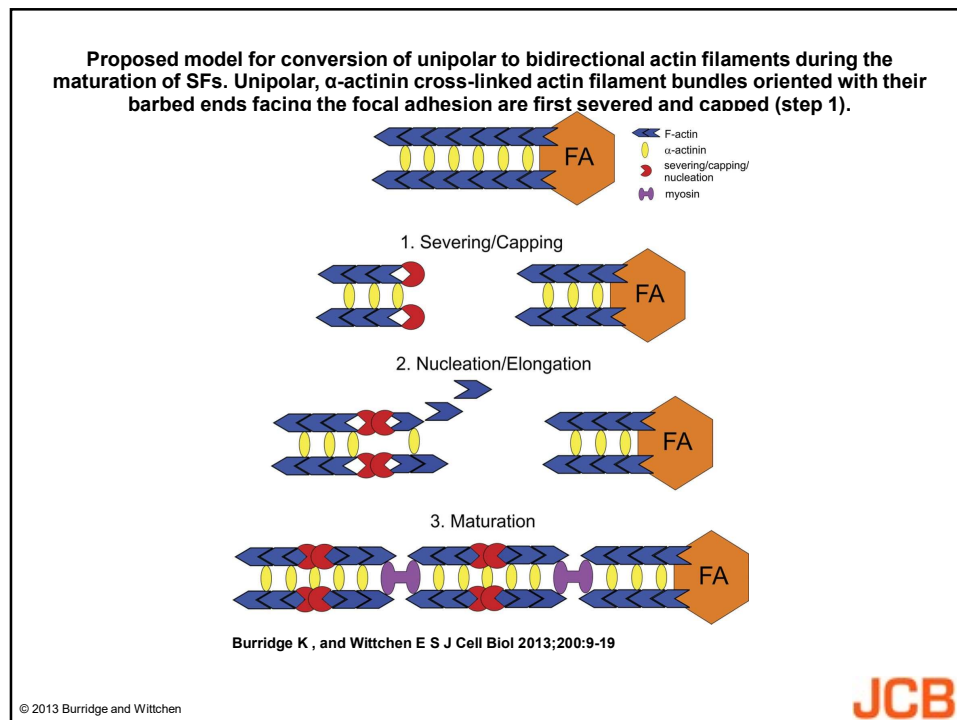
actin only

(B) Close up view of the region marked with the *white* rectangle in A. The actin filaments closest to the leading edge, which are also the ones that have formed most recently and that are most likely to contain ATP actin (rather than ADP actin) in the filament

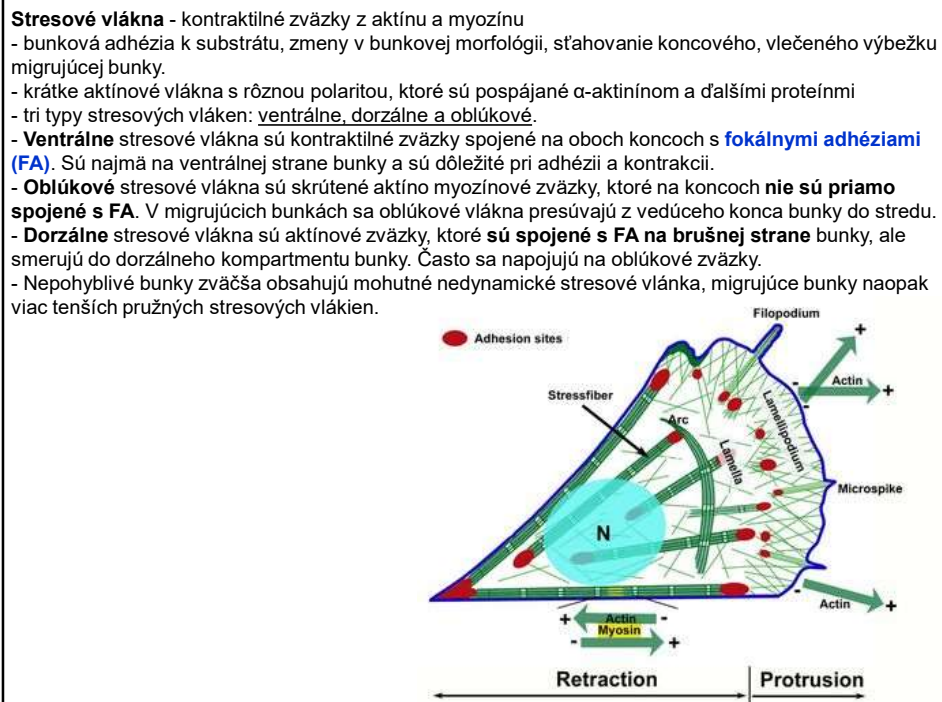
20

- ♦ **Stresové vlákna sa vytvárajú, keď bunka vytvára stabilné spojenie so substrátom.**
 - **Zväzky aktínových vlákien vystupujú z bunkového povrchu do cytoplazmy.**
konce aktínových vlákien sú orientované na opačný koniec bunky a môžu vytvárať sieť.
 - **Myozín zabezpečuje posúvanie vlákien aktínu počas kontrakcie.**
 - **α -Actinín** môže prepájať aktínové vlákna tvoriace stresové vlákna.

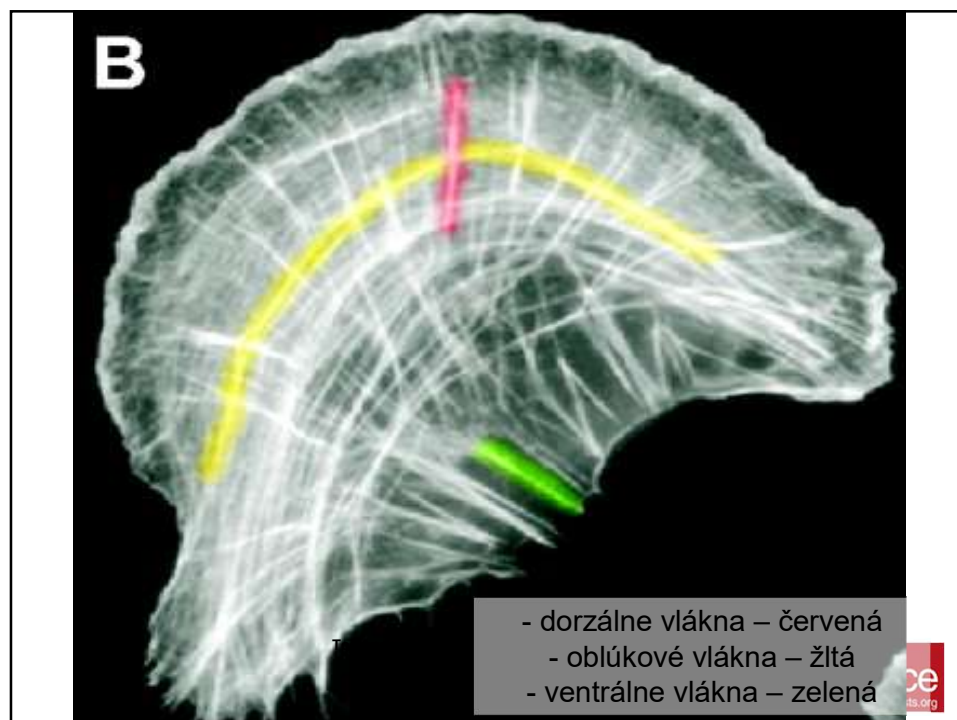
21



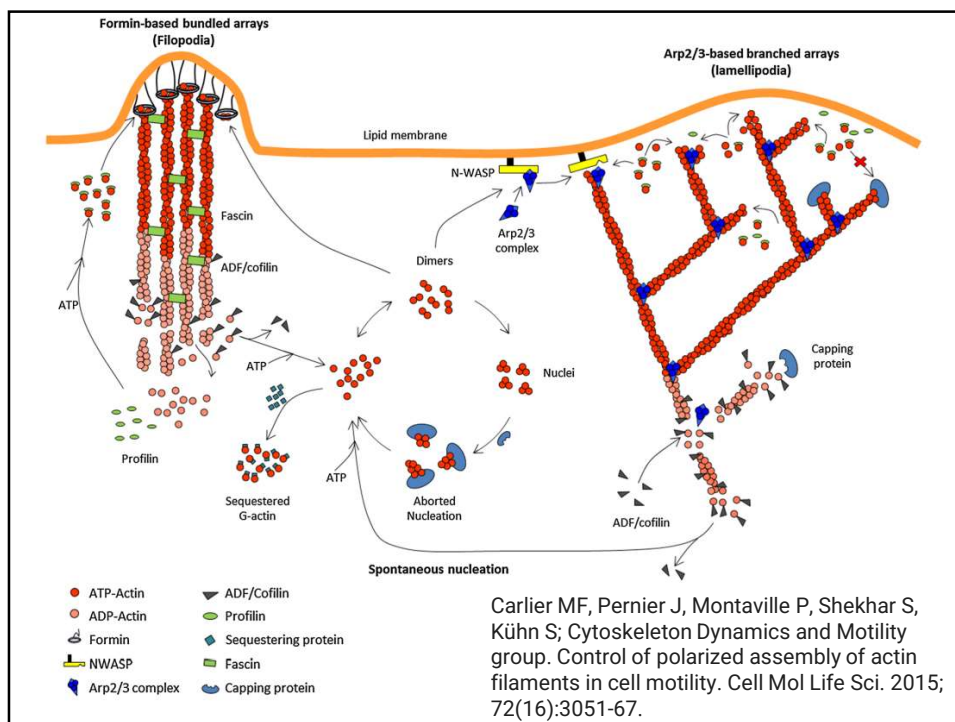
22



23



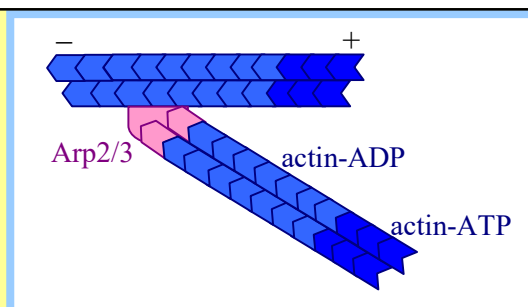
24



25

Nukleácia aktínovej polymerizácie:

Arp2/3 nukleuje aktínovú polymerizáciu v lamelipódiách.

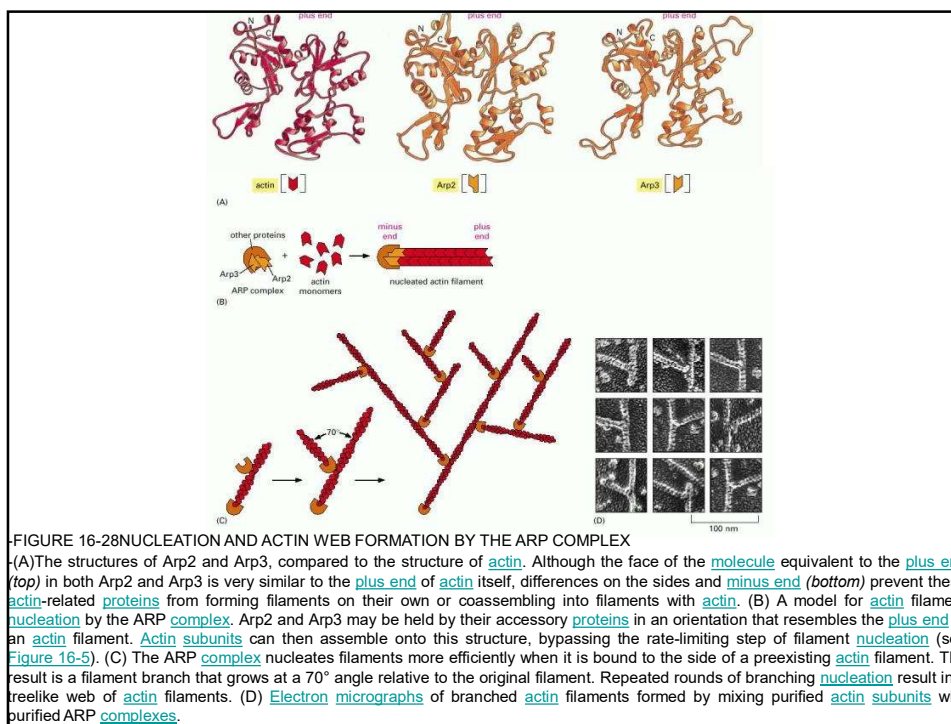


Arp2/3 komplex sa skladá z **2 aktínu príbuzných** proteínov, Arp2 & Arp3, a **5 menších proteínov**.

Keď sú aktivované pomocou faktoru NPF (nucleation promoting factor), komplex Arp2/3 sa viaže na existujúce aktínový filament a začína tu rásť nového vlákna.

Výsledná štruktúra je v tvare **Y**.

26



27

- bunkový kortex

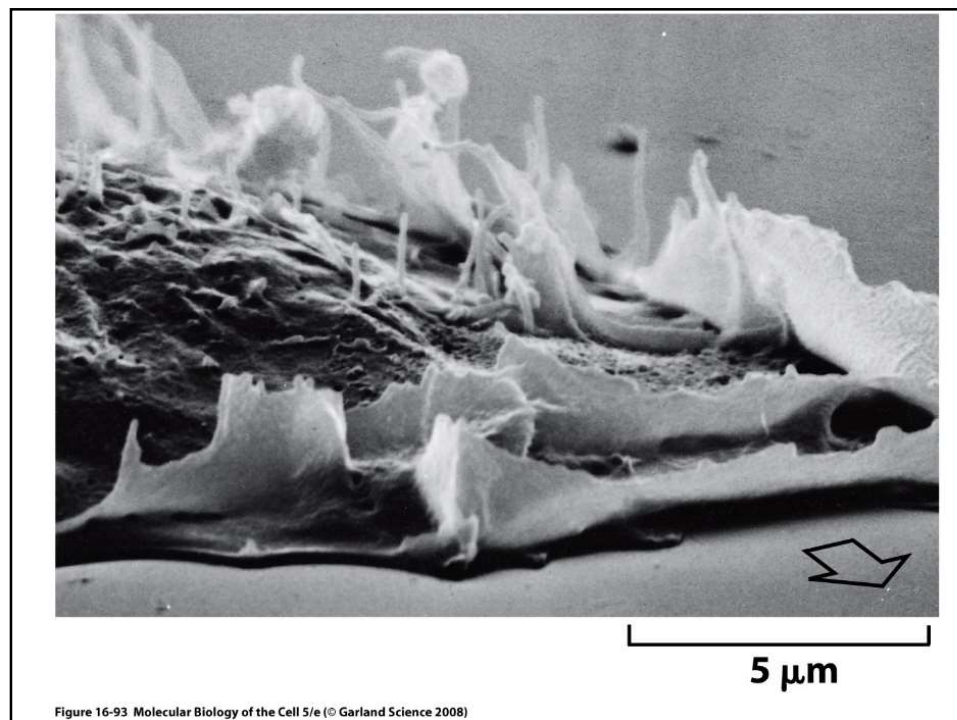
- aktín sa v bunke nachádza väčšinou vo vrstve cytoplazmy tesne pod cytoplazmatickou membránou - hustá sieť vlákien
- spevňuje povrch bunky, dodáva mu mechanickú odolnosť, ale zároveň bunke umožňuje pohybovať sa a meniť tvar
- napr. v červených krvinkách umožňuje udržať špecifický tvar
- bunkový kortex obsahuje tiež proteíny *spektrin* a *ankyrin*
- ak sa bunka pohybuje, len zriedkavo je to pomocou riasiniek a bičíkov, väčšina buniek sa pohybuje po povrchu podložky
- napr. biele krvinky – neutrofily; rast axónu
- molekulárny mechanizmus posúvania sa buniek - 3 kroky

[link](#)

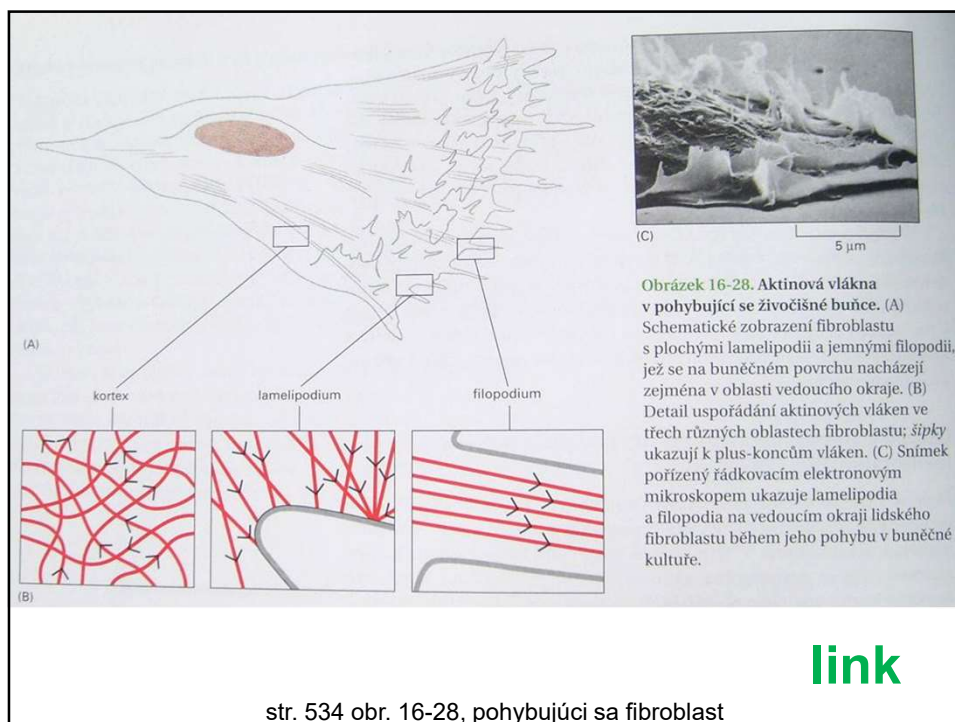
28

- posúvanie sa buniek:
 1. bunka vysúva výbežky na „prednej“ strane, resp. okraji, ktorý vedie posun
 2. výbežky priľnú k povrchu, po ktorom sa bunka pohybuje
 3. zvyšok bunky sa dotiahne za predným ukotvením
 - vo všetkých troch bodoch sa využíva aktín
- POSUN FIBROBLASTU V BUNKOVEJ KULTÚRE**
- vysunú sa tenké listovité **lamelipódia**, ktoré obsahujú hustú sieť aktínových vlákien, väčšina má plus konce tesne pod plazmatickou membránou
 - z **lamelipódií** sa vysunú ešte tenšie **filopódia**, 0,1 μm hrubé a 5-10 μm dlhé, obsahujú zväzky 10-20 aktínových vlákien, plus konce smerujú von
(neurón vysúva filopódia s dĺžkou aj 50 μm)
 - lamelipódia a filopódia sú priezračné pohyblivé štruktúry, ktoré sa vysunujú a zasunujú veľmi rýchlo, aktínové vlákna sú v nich nukleované pod plazmatickou membránou a rastom ju naťahujú bez roztrhnutia

29

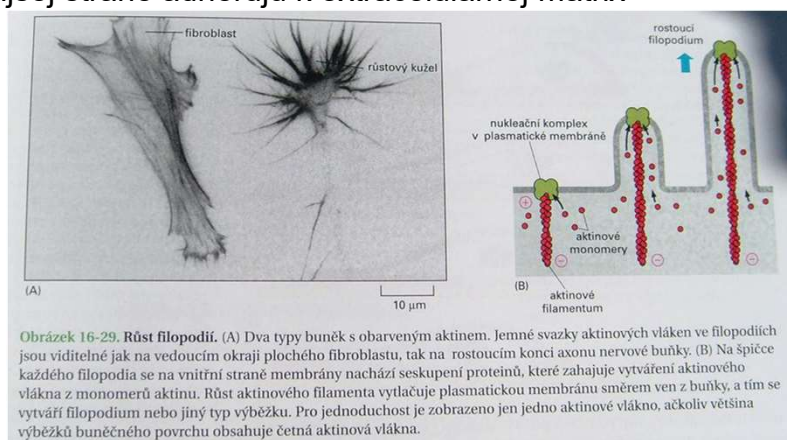


30



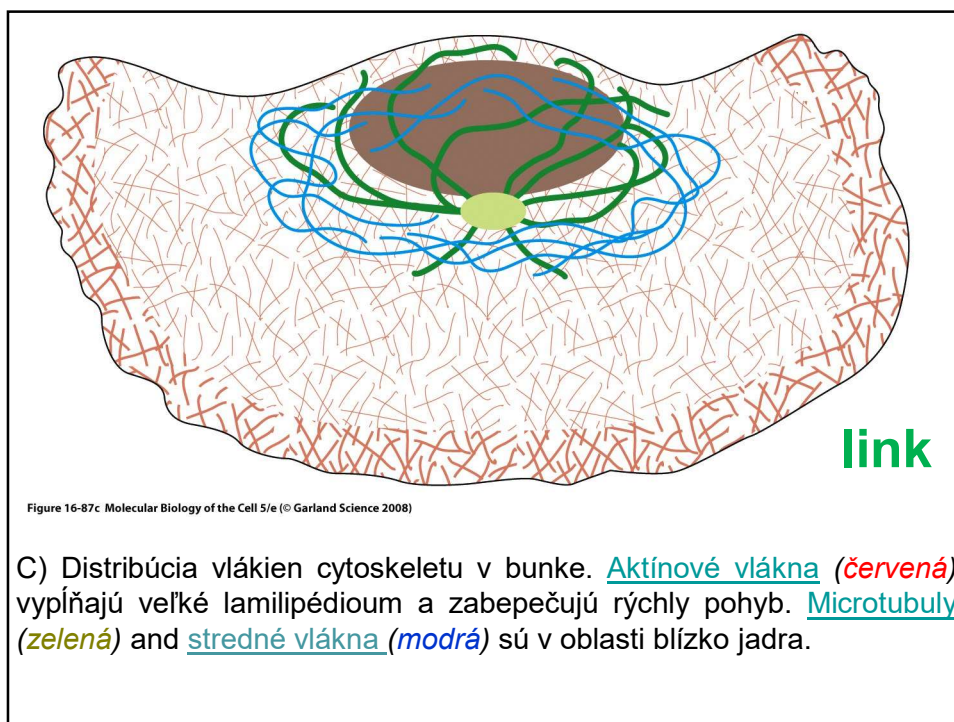
31

- keď sa lamelipódiá alebo filopódiá dotknú vhodného miesta na povrchu substrátu, prichytia sa tam pomocou transmembránových proteínov plazmatickej membrány
- **integríny** – na vnútornej strane nukleujú aktínové vlákna, na vonkajšej strane adherujú k extracelulárnej matrix

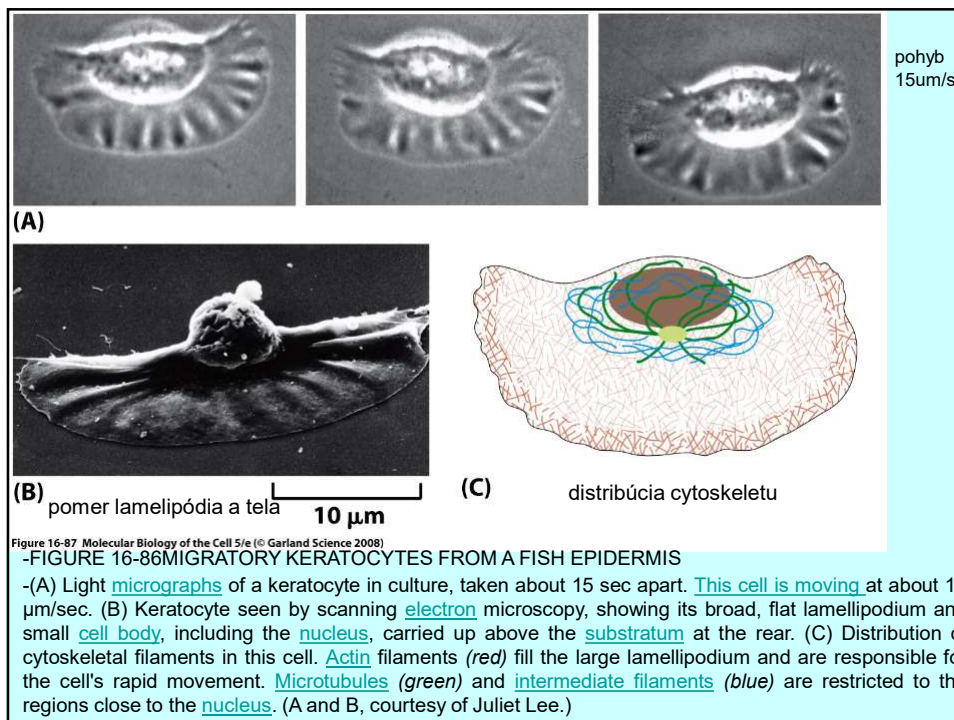


str. 535 obr. 16-29, rast filopodií

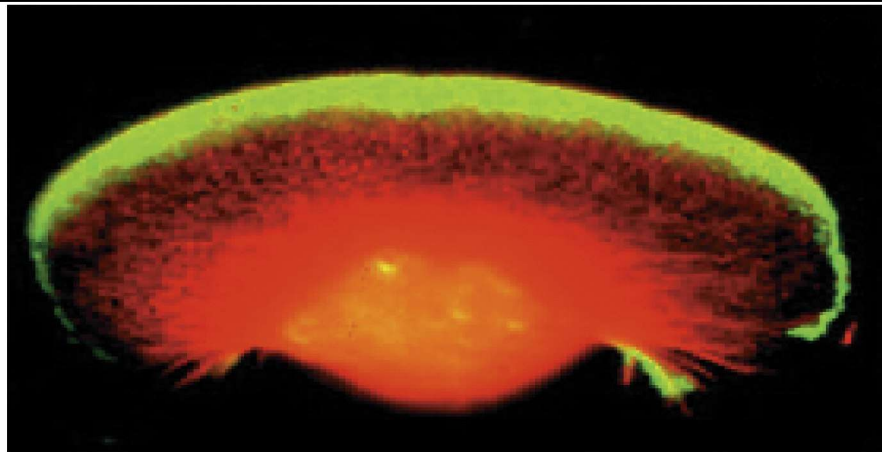
32



33



34



nukleácia aktínu ARP komplexom

ACTIN FILAMENT NUCLEATION AND WEB FORMATION BY THE ARP COMPLEX IN LAMELLIPODIA

(A) A keratocyte with **actin** filaments labeled in **red** by fluorescent phalloidin, and the **ARP complex** labeled in **green** with an antibody raised against one of its component protein. The regions where the two overlap appear **yellow**.

ARP complex je koncentrovaný najmä v prednej časti lamelipódia, kde prebieha

35

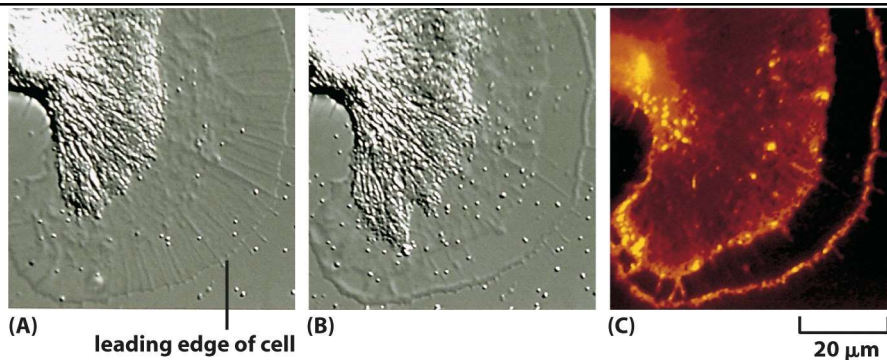


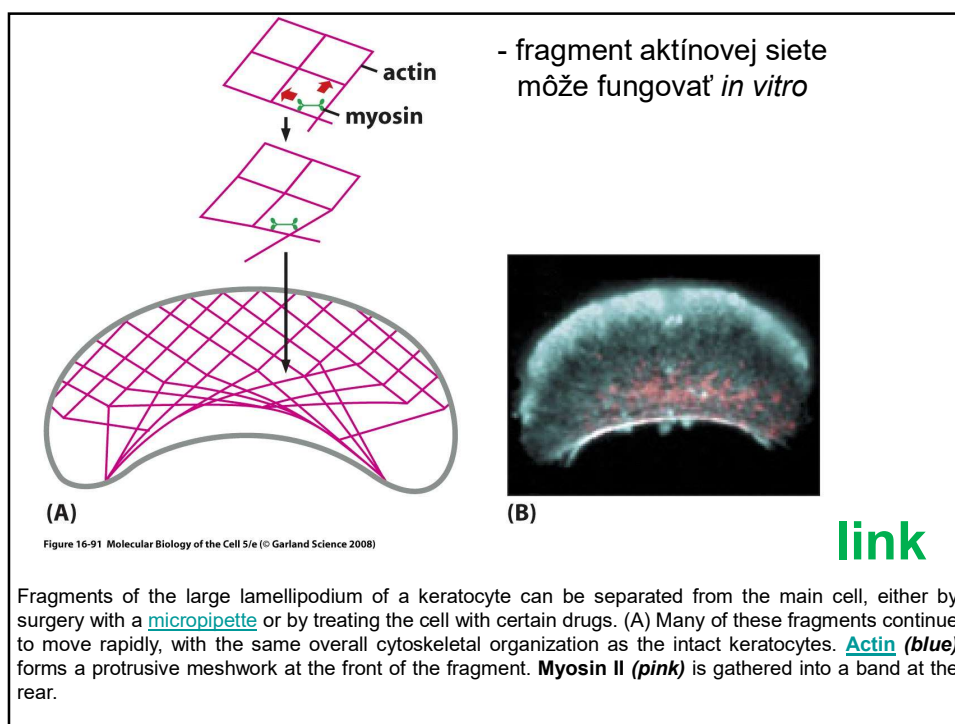
Figure 16-92abc Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

-B a C cytochalasíny – viažu sa na + koniec F-aktínu a blokujú polymerizáciu, okamžite dôjde k zmrazeniu pohybu

-FIGURE 16-91 REARWARD MOVEMENT OF THE ACTIN NETWORK IN A GROWTH-CONE LAMELLIPODIUM

(A) A **growth cone** from a neuron of the sea slug *Aplysia* is cultured on a highly adhesive **substratum** and viewed by differential-interference-contrast microscopy. **Microtubules** and **membrane-enclosed organelles** are confined to the bright, rear area of the **growth cone** (to the **left**), while a meshwork of **actin** filaments fills the lamellipodium (on the **right**). (B) After brief treatment with the drug **cytochalasin**, which caps the **plus ends of actin filaments**, the **actin meshwork** has detached from the front edge of the lamellipodium and has been pulled backward. (C) At the time point shown in B, the cell was fixed and labeled with **fluorescent phalloidin** to show the distribution of the **actin** filaments. Some **actin** filaments persist at the leading edge, but the region behind the leading edge is devoid of filaments.

36



37

Ďakujem za pozornosť

38