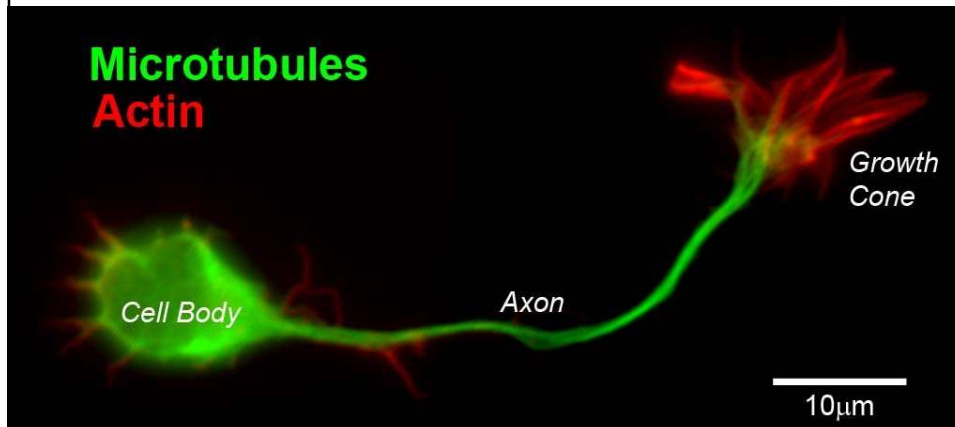


Fyziológia živočíšnej bunky

2. Stredné vlákna a mikrotubuly

Iveta Herichová

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského Bratislava

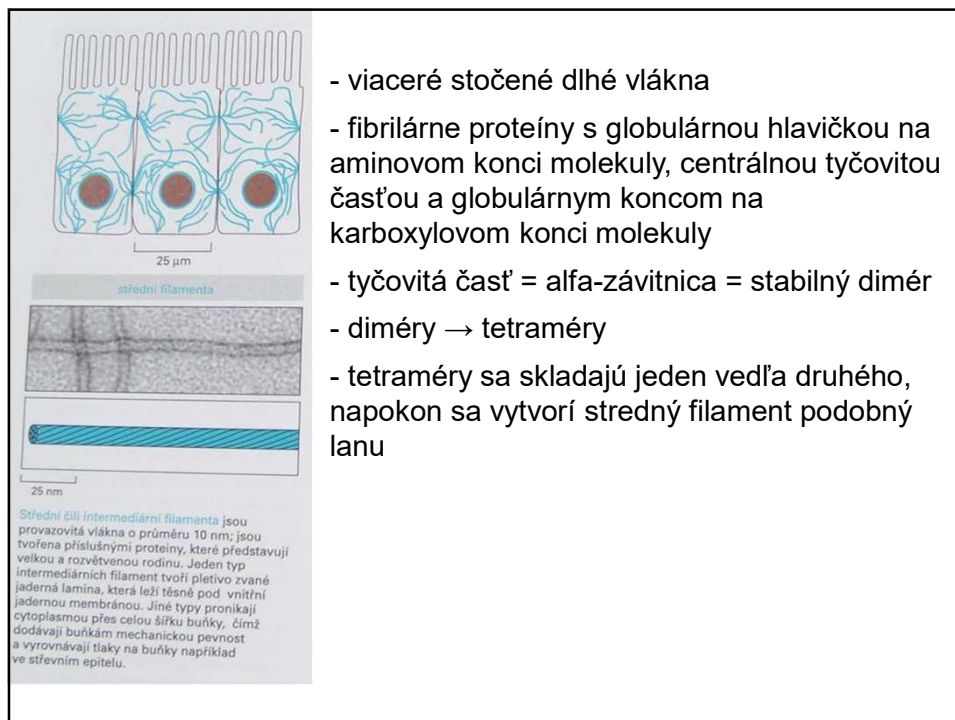


1

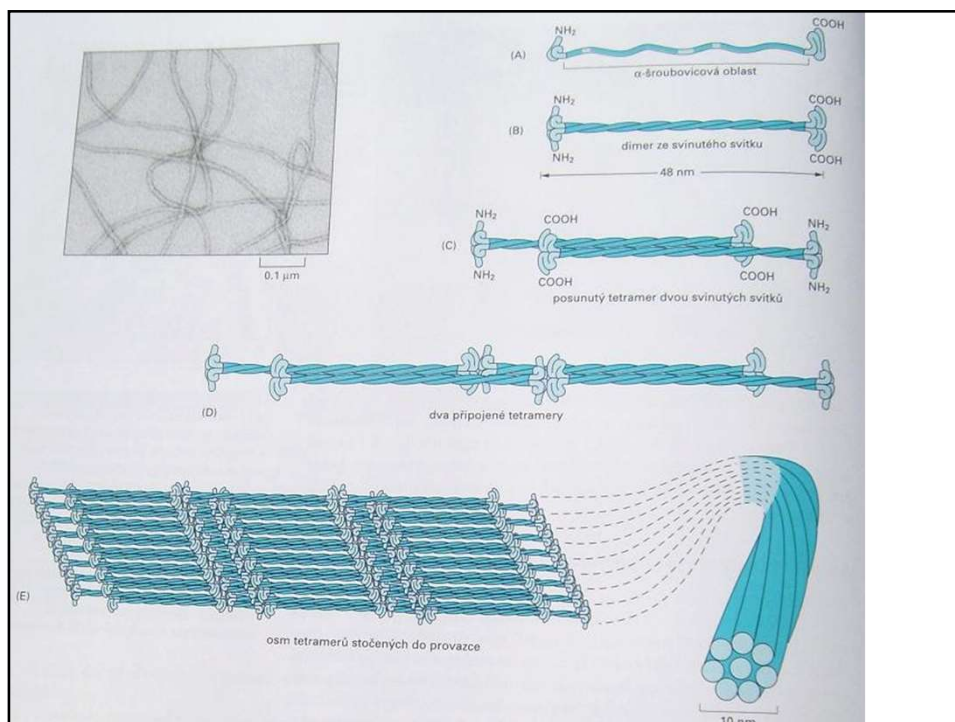
Stredné filamenty

- veľká pevnosť v ťahu
- podpora pri mechanickom strese pri natiahnutí
- nazývajú sa stredné, lebo v bunkách hladkých svalov, kde boli popísané prvý krát, svojím priemerom spadajú medzi tenké aktínové a hrubšie myozínové vlákna, ich priemer je cca 10 nm
- koncentrované soli a niektoré detergenty
- nachádzajú sa v cytoplazme väčšiny buniek
- najčastejšie sú okolo jadra a vetvia sa k periférii
- jadrová lamina

2

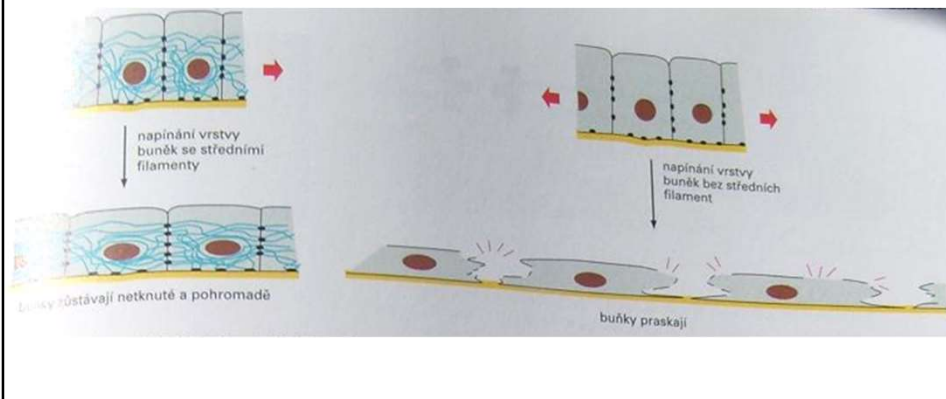


3



4

- stredné filamenty sa nachádzajú najmä v bunkách, ktoré sú mechanicky namáhané napr.:
 - axóny nervových buniek
 - svalové bunky
 - epiteliálne bunky (koža)
- vo všetkých týchto prípadoch chránia bunku pred roztrhnutím vyvolaným ťahom



5

- **cytoplazmatické stredné filamenty:**
 - keratínové filamenty v epiteliálnych bunkách
 - vimentínové a vimentínu príbuzné vlákna v spojivových tkanivách, v svalových bunkách a podporných bunkách nervového systému (neuroglie)
 - neurofilamenty v nervových bunkách
- zodpovedajúci typ proteínových podjednotiek

Subgrouping	Proteins	Cell type specificity
Type I	Keratins	Soft complex epithelia (skin, oral mucosa, etc.)
Type II		Soft simple epithelia (liver, gut, kidney, etc.)
		Hard epithelia (hair, nail, oral papillae)
Type III	Vimentin, Desmin GFAP, Peripherin syncoilin	Various (fibroblasts, leukocytes, endothelium muscle, astrocytes, glia, peripheral nerves)
Type IV	NF-L, NF-M, NF-H α-internexin synemin, nestin	CNS & neurons CNS & neurons Muscle, neural stem cells
Type V	Lamins A, B & C	Nucleus
Orphan	Filensin, Phakinin	Lens

6

Class	IF protein	Cell type	Molecular weight (Kd)
I	Type I, acidic keratins	Epithelia	52.5–68
II	Type II, basic keratins	Epithelia	40.0–64
III	Vimentin	Mesenchyma	54
	Desmin	Muscle	52
	GFAP	Glial cells; Astrocytes	53
	Peripherin	Peripheral nervous system	57
	Plasticin	Retinal ganglion cells	52.6
IV	Neurofilament proteins -L, -M, -H,	Central nervous system	68, 145, 200
	α -internexin	CNS neuronal cells	66
V	Lamins A, B, C	Nuclear membrane	60, 67, 70
VI	Nestin	Neuroepithelial cells	200

7

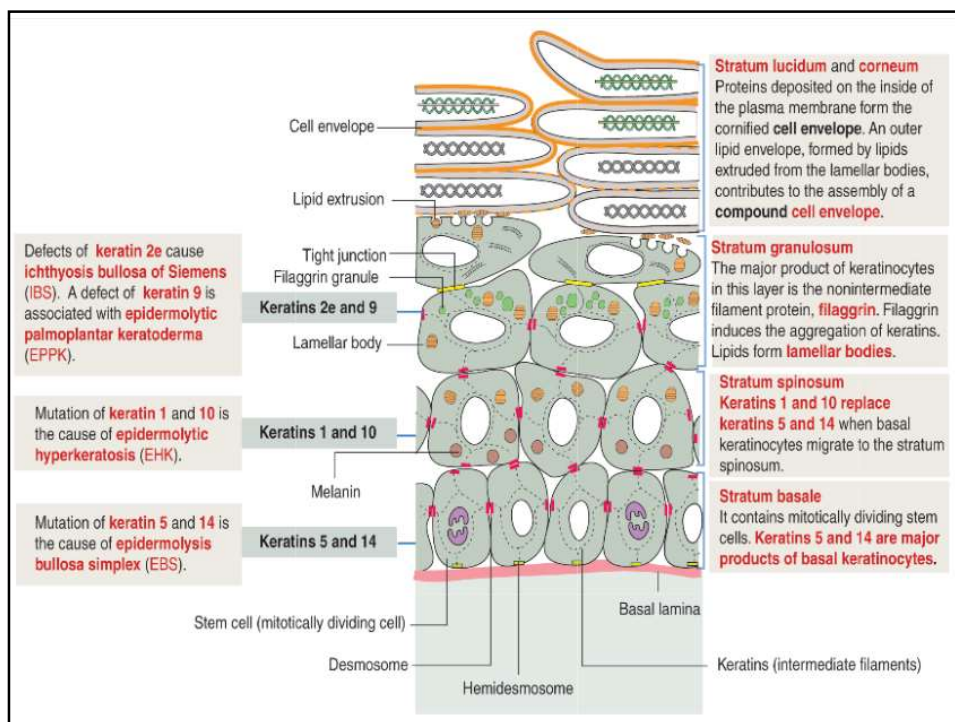
- keratíny sú najrôznorodejšou rodinou
- iné keratíny sú v epitelochoch (napr. črevná výstelka)
- iné keratíny sú v epidermálnej vrstve kože
- špeciálne keratíny sú vo vlasoch, perí a pazúroch

- v každom prípade sú keratíny tvorené zmesou rôznych keratínových podjednotiek

- v epiteliálnych bunkách sú keratínové vlákna zvyčajne natiahnuté naprieč celou cytoplazmou a filamenty susedných buniek sú nepriamo spojené pomocou medzibunkových kontaktov – dezmozómov;

- okrem toho jednotlivé vlákna prostredníctvom globulárnych hlavičiek a koncov, ktoré vyčnievajú do strán, vytvárajú bočné kontakty s ďalšími bunkovými štruktúrami

8



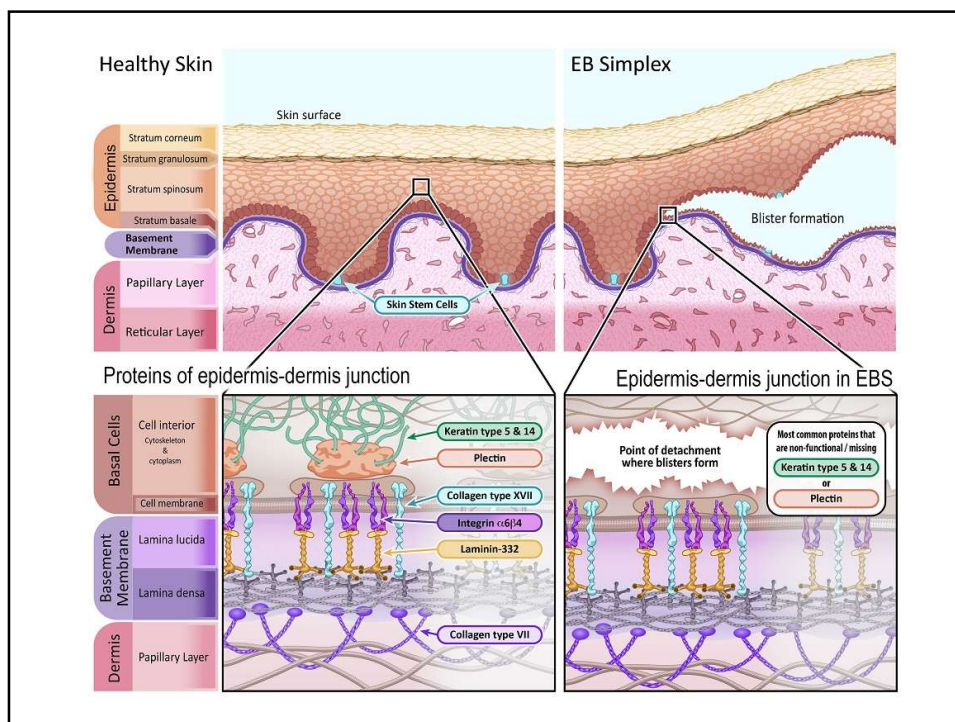
9

Epidermolysis bullosa simplex

- ochorenie, kde sa v dôsledku mutácie v keratínových génoch 5 alebo 14 nevytvárajú sa dostatočne pevné keratínové filamenty v pokožke
- pokožka potom nie je odolná proti mechanickému stresu, aj veľmi slabý tlak na koži spôsobuje popraskanie buniek a vzniku opuchov



10



11

- **jadrové stredné filamenty** vytvárajú dvojrozmernú sieť, ktorá vystieľa a spevňuje vnútornú jadrovú membránu

- stredné filamenty v tejto jadrovej vrstve sú tvorené triedou proteínov nazývajúcich sa „laminy“

- rozkladajú sa a zase skladajú pri každom bunkovom delení

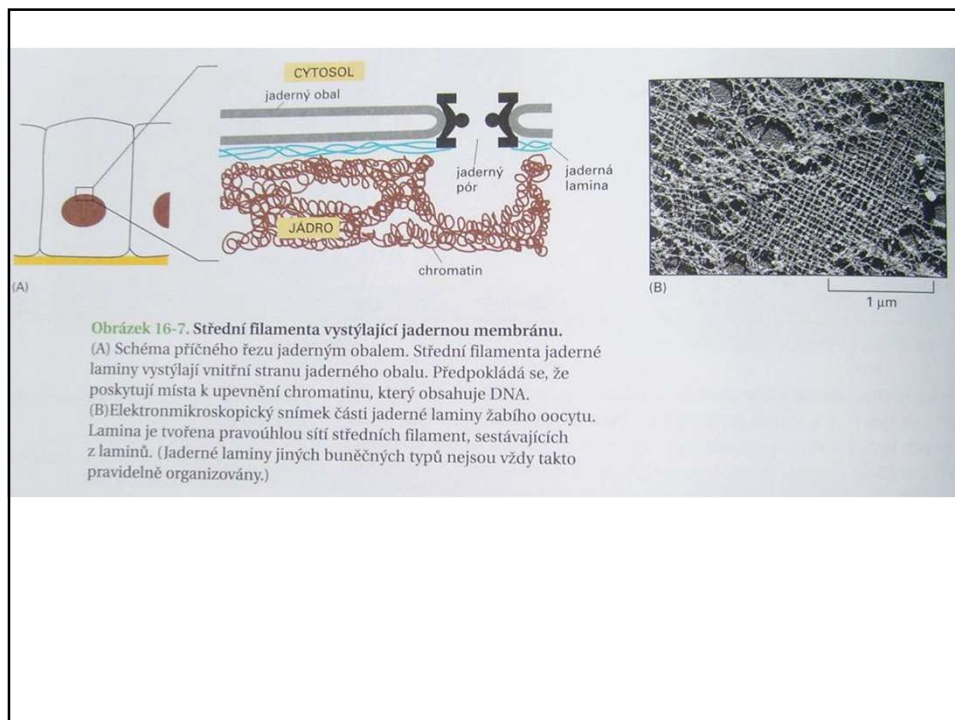
- rozpad a výstavba siete filament v jadre sú regulované fosforyláciou a defosforyláciou pomocou proteínkináz

- fosforylácia laminových proteínov – zmena konformácie - zoslabenie interakcií medzi tetramérmi - rozpad filament

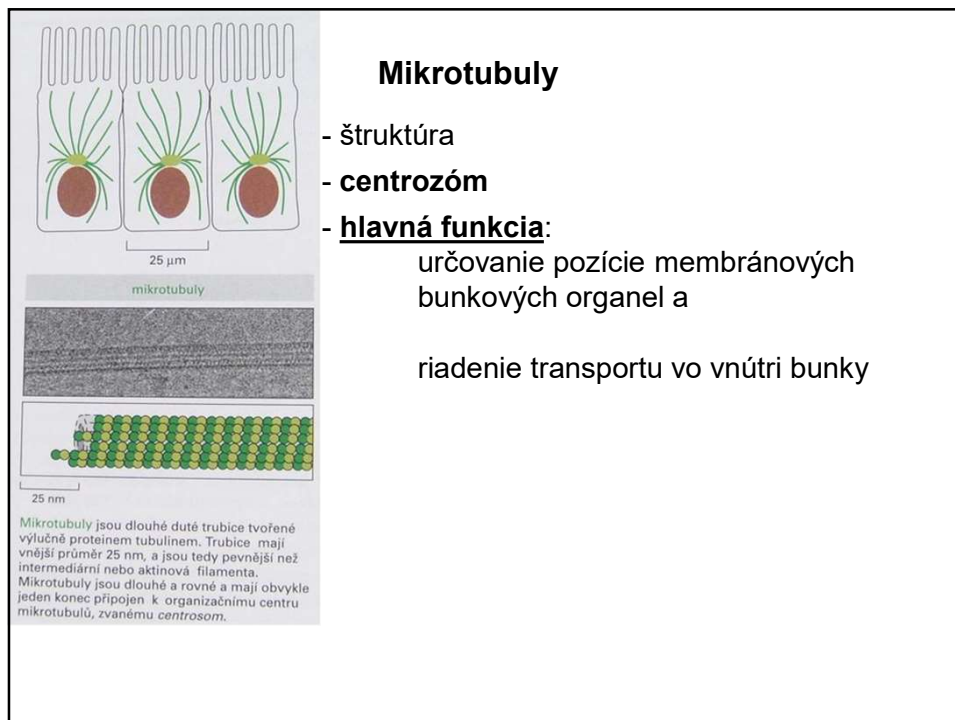
- defosforylácia na konci mitózy - laminové proteíny vytvoria filament

Aký majú stresové vlákna fyziologický význam?

12



13



14

- ak bunka vstupuje do mitózy, cytoplazmatické mikrotubuly sa rozpadajú a vytvára sa – deliace vretienko

- vďaka deliacemu vretienku sa chromozómy rovnomerne rozdelia medzi dcérske bunky

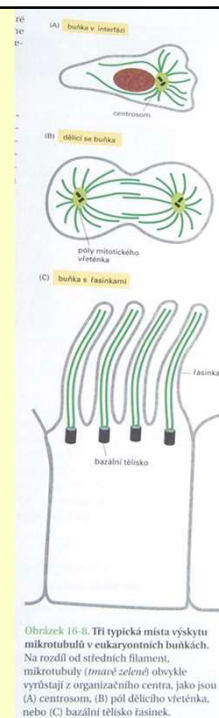
- mikrotubuly tvoria aj stále štruktúry:

riasinky

bičičky

- stred eukaryotických riasiniek a bičíkov je tvorený špeciálne usporiadaným zväzkom stálych mikrotubulov

- molekulové motory, ktoré posúvajú organely pozdĺž cytoplazmatických dráh



15

Štruktúra mikrotubulov

- tubulín

- α -tubulínu a β -tubulínu - pevné nekovalentné väzby

- tubulínové podjednotky

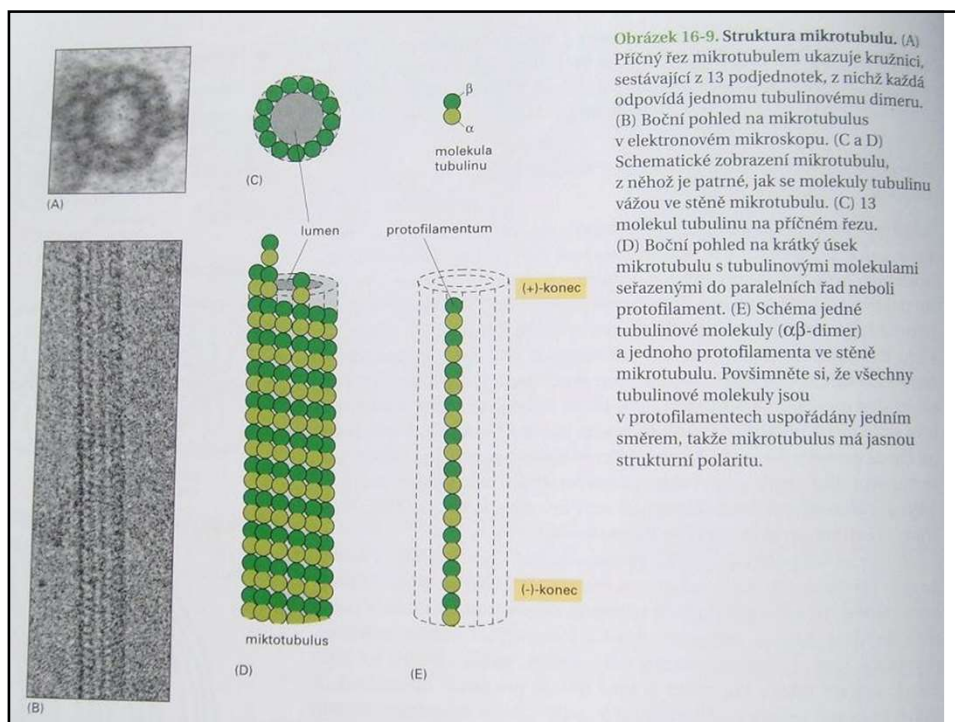
- každý cylinder pozostáva z 13 paralelných protofilamentov

- protofilament je štrukturálne polárny – na jednom konci je α -tubulín a na druhom konci β -tubulín

α -tubulínový koniec = mínus koniec

β -tubulínový koniec = plus koniec

16



17

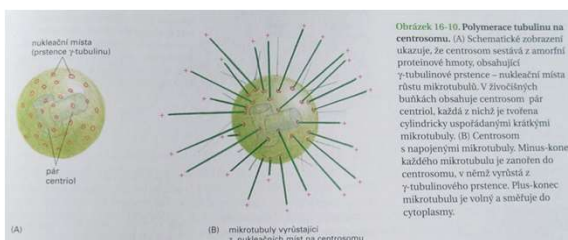
Dynamika štruktúry mikrotubulov

- živá bunka obsahuje mikrotubuly aj voľné tubulínové podjednotky
- v typickom fibroblaste je zvyčajne polovica bunkového tubulínu obsiahnutá mikrotubuloch
- druhá polovica je v cytoplazme a predstavuje zásobu podjednotiek na výstavbu
- u stredných vlákien sú takmer všetky podjednotky použité
- relatívna nestabilita mikrotubulov umožňuje neustálu rýchlu zmenu ich tvaru – funkčnosť
- napr. kolchicín spôsobuje inhibíciu polymerizácie tubulínových jednotiek a tak sa nevytvorí deliace vretienko

18

- **centrozóm** živočíšnych buniek je hlavným miestom, z ktorého sú organizované mikrotubuly
- centrozóm sa zvyčajne nachádza blízko jadra (*ak sa bunka nedelí*)
- mikrotubuly vyrastajú smerom od centrozómu
- centrozómy obsahujú stovky prstencovitých útvarov, tvorených ďalším typom tubulínu – γ -tubulín
- každý z γ -tubulínových prstencov slúži ako miesto, odkiaľ vyrastá jeden mikrotubulus
- $\alpha\beta$ -tubulínové diméry sú prikladané ku γ -tubulínovým prstencom a sú orientované tak, že mínus koniec (alfa) je ukotvený v centrozóme a mikrotubul rastie len na plus konci (beta)
- $\alpha\beta$ -tubulínové diméry v *in vitro* podmienkach môže polymerizovať aj spontánne, ale v cytoplazme bunky nie je dostatočná koncentrácia a preto je nevyhnutná prítomnosť γ -tubulínových prstencov

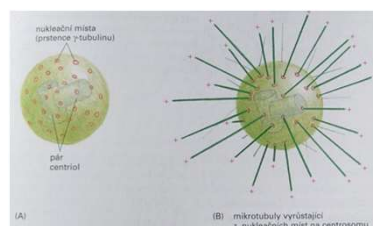
Čo spôsobuje ochorenie
Epidermolysis bullosa
simplex
link



19

Centrioly

- súčasťou centrozómov je aj štruktúra, ktorá sa niekedy zamieňa s γ -tubulínovými prstencami
- sú to **centrioly**
- centrioly pozostávajú z valcovito usporiadaných krátkych mikrotubulov a nachádzajú sa v centrozómoch väčšiny živočíšnych buniek
- centrioly nie sú priamo účastné na nukleácii mikrotubulov v centrozómoch a ich funkcia je čiastočne neznáma aj s ohľadom na to, že v rastlinných bunkách sa nenachádzajú
- centrioly sú podobné bazálnym telieskam, ktoré slúžia ako organizačné miesta mikrotubulov bŕv a bičíkov

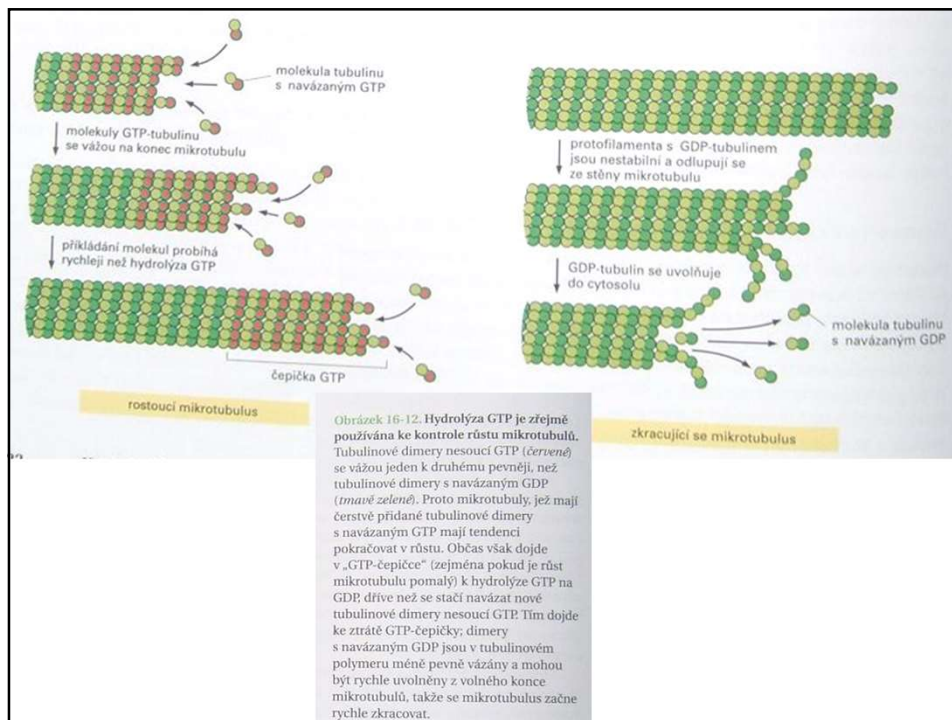


20

- ak sa realizovala nukleácia mikrotubulu, jeho plus koniec (beta) sa predlžuje smerom od organizačného centra, tento proces sa však môže kedykoľvek zvrátiť
- **dynamická nestabilita**
- tubulínové molekuly dokážu hydrolyzovať GTP
- každý voľný tubulínový dimér obsahuje jednu pevne naviazanú molekulu GTP, ktorá je hydrolyzovaná na GDP (stále pevne naviazaná) potom, ako bol dimér pridaný na koniec mikrotubulu
- tubulínové molekuly s GTP sa usporiadávajú do stien mikrotubulu
- tubulínové molekuly s GDP majú inú konformáciu a väzby medzi nimi sú slabšie
- ak dochádza k polymerizácii rýchlo, tubulínové molekuly sú na koniec mikrotubulu prikladané rýchlejšie ako je hydrolyzovaná GTP

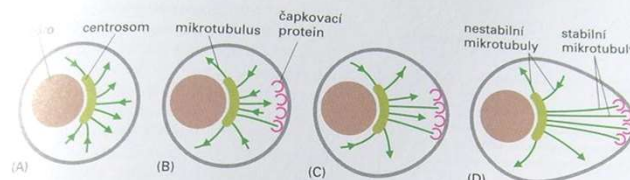
Kde v bunke sa nachádzajú keratínové vlákna?
link

21



22

- ak koniec mikrotubulu tvoria GTP-tubulínové podjednotky vzniká čiapočka označovaná ako GTP-čiapočka
- GTP-čiapočka zabraňuje depolymerizácii mikrotubulu
- v niektorých prípadoch však tubulín na konci mikrotubulu môže zhydrolyzovať GTP rýchlejšie ako prisadajú nové podjednotky
- tým dôjde k utvoreniu mikrotubulu tvoreného z podjednotiek s naviazaným GDP, čo posunie rovnováhu smerom k odoberaniu tubulínových podjednotiek
- uvoľnené molekuly GDP-tubulínu sú v zásobe, GDP je vymenené za GTP a môžu sa znovu zapojiť do stavby mikrotubulov
- mikrotubuly vyrastajúce od centrozómu môžu byť stabilizované ukotvením k nejakej inej molekule alebo organelle

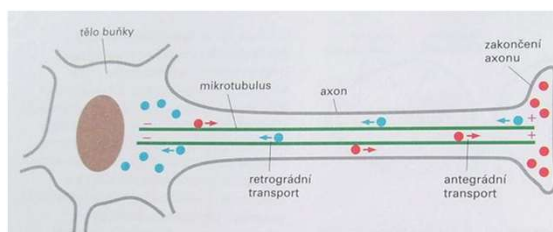


Obrázok 16-13. Selektívna stabilizácia mikrotubulov môže polarizovať. Nové vytvorené mikrotubuly môžu v budúci pretrvať, pretože majú na svojom konci chránený pred depolymerizáciou. V bunkách je minus-koniec mikrotubulu obvykle chránený organizačným centrom, z ktorého mikrotubulus vyrastá. Plus-koniec mikrotubulu je menej chránený, ale môže byť stabilizovaný naviazaním iných proteínov. Obrázok znázorňuje nepolarizovanú bunku (A) s novými mikrotubulami vyrastajúcimi z centrosomu a zkracujúcimi sa napätím k centrosomu zvonku mikrotubulu. Keď sa niektoré z týchto mikrotubulov v bunšom korektore naviažu na špeciálne proteíny, vytvárajúce čiapočku mikrotubulu (capping proteín), dôjde k stabilizácii voľného plus-konca mikrotubulu (B). Toto selektívne stabilizovanie spôsobí rýchlu zmenu orientácie sústavy mikrotubulov (C) a silnú polarizáciu bunky (D).

23

- v diferencovanej bunke sú často fixované v určitej pozícii
 - väčšina diferencovaných živočíšnych buniek je polarizovaná napr. v nervových bunkách na jednej strane vyrastá axón a na druhej strane dendrity; bunky, ktoré sú sekreторické majú Golgiho aparát umiestnený smerom k miestu sekrécie atď.
 - bunková polarita odráža polarizované systémy mikrotubulov vo vnútri bunky, ktoré pomáhajú umiestniť orgány na správne miesto a ktoré smerujú dopravné prúdy medzi jednotlivými časťami bunky
- príklad: v *nervovej bunke*, kde sú v axóne všetky mikrotubuly smerované plusovým koncom k axónovému zakončeniu - transport

Na ktorom
konci
vlákna
tubulínové
vlákno
dorastá?
link



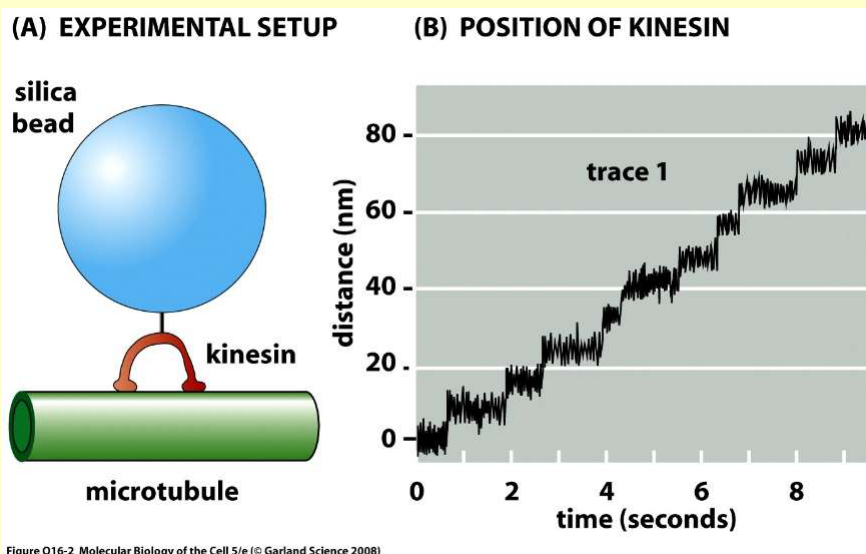
Obrázok 16-14. Transport podél mikrotubulov v axonu nervové bunky. V nervových bunkách smerujú všetky mikrotubuly (od jedného do druhého) v axonu stejným směrem - výnimkou plus-konci k axonovému zakončení. Orientované mikrotubuly slouží jako dráhy pro směřování transportu látek, syntetizovaných v těle buňky; jel jsou potřebné v axonovém zakončení (jako jsou například membránové proteiny, potřebné pro růst axonu). Cesta látek v axonu, který vytváří například z míchy a vede k ramennímu svalu, trvá přibližně dva dny. Tento deploidní neboli antegrádny transport látek je zajišťován jedním souborem molekulových motorů (černá kolečka), k čemuž patří i retrográdny transport v opačném směru je zajišťován jiným souborem molekulových motorů (modrá kolečka). Retrográdny transport nové látky pohlcené koncem axonu nebo produkty rozpadu proteinů a dalších molekul směrem k tělu buňky.

24

- niektoré náklady sa pohybujú aj rýchlosťou 10 cm za deň
- aj napriek tomu však môže náklad cestovať aj týždeň na koniec dlhých axónov
- pri plnení funkcií mikrotubulov vždy napomáhajú prídavné proteíny
 - niektoré ich stabilizujú
 - niektoré ich prepájajú
 - niektoré sa pohybujú pozdĺž mikrotubulov
= molekulové motory
- **molekulové motory** využívajú energiu uvoľňovanú pri hydrolýze ATP na transport organel a membránových vezikúl pozdĺž mikrotubulov
- dve skupiny: **kinezíny** sa pohybujú smerom k plus koncu
dyneíny sa pohybujú smerom k mínus koncu
- kinezíny aj dyneíny majú dve globulárne hlavičky, ktoré viažu ATP a koniec; hlavičky interagujú s mikrotubulmi priestorovo špecificky tak, že sa môžu naviazať vždy len jedným smerom

25

- Animácia kinezínu



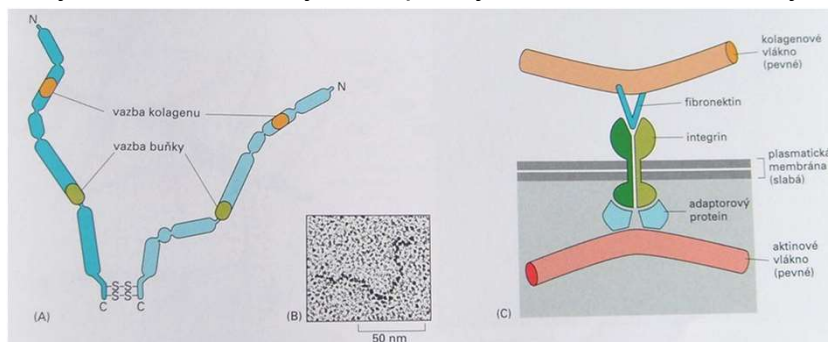
26

Extracelulárny priestor

Čo tvorí obal jadra eukaryotickej bunky?
link

27

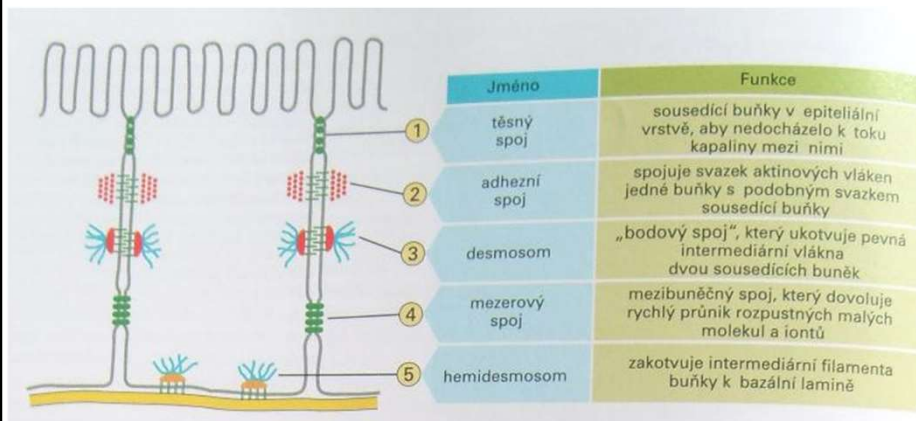
- v extracelulárnej matrix sa bunky prichytávajú k vláknám kolagénu (vytváraným bunkami spojivových tkanív)
- na vlákno kolagénu je prichytený proteín fibronektín
- na opačnom konci sa fibronektín viaže na integrín
- integrín v cytoplazme fixuje aktínové vlákno
- kompenzácia prípadného napätia z membrány na cytoskelet
- podobný mechanizmus využíva prichytenie svalov na šlachy



str. 603 obr. 19-14 prepojenie cytoskeletu s extracelulárnou matrix

28

Ukotvenia vláken cytoskeletu v medzibunkových spojoch



Které typy cytoskeletu můžu neustále polymerizovat a depolymerizovat?

link

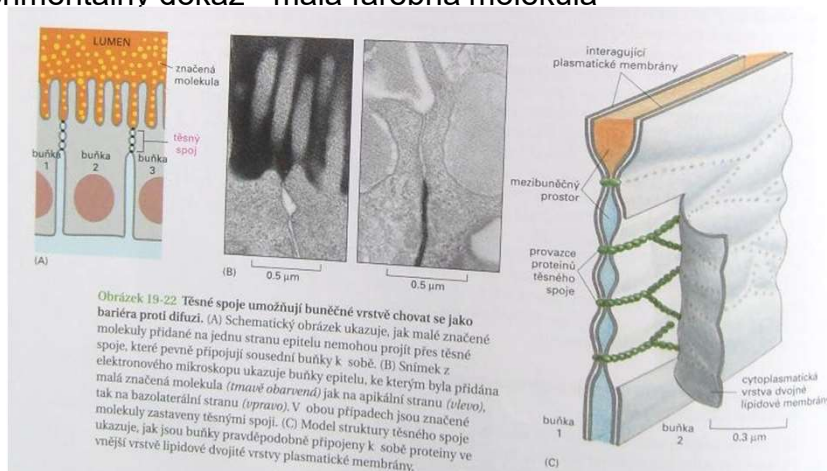
Které typy cytoskeletu můžu neustále polymerizovat a depolymerizovat?

str. 608, obr 19-21 medzibunkvé spoje

29

TESNÝ SPOJ

- zabezpečuje dokonalé spojenie tak, že úplne zabráni prechodu molekul, popri bočnej strane epitelálnych buniek
- experimentálny dôkaz - malá farebná molekula



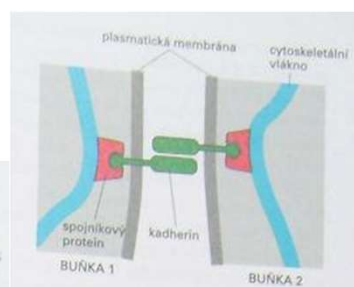
str. 608, obr 19-22 tesné spojenie

30

Mechanické (adhézne) spoje a desmozómy

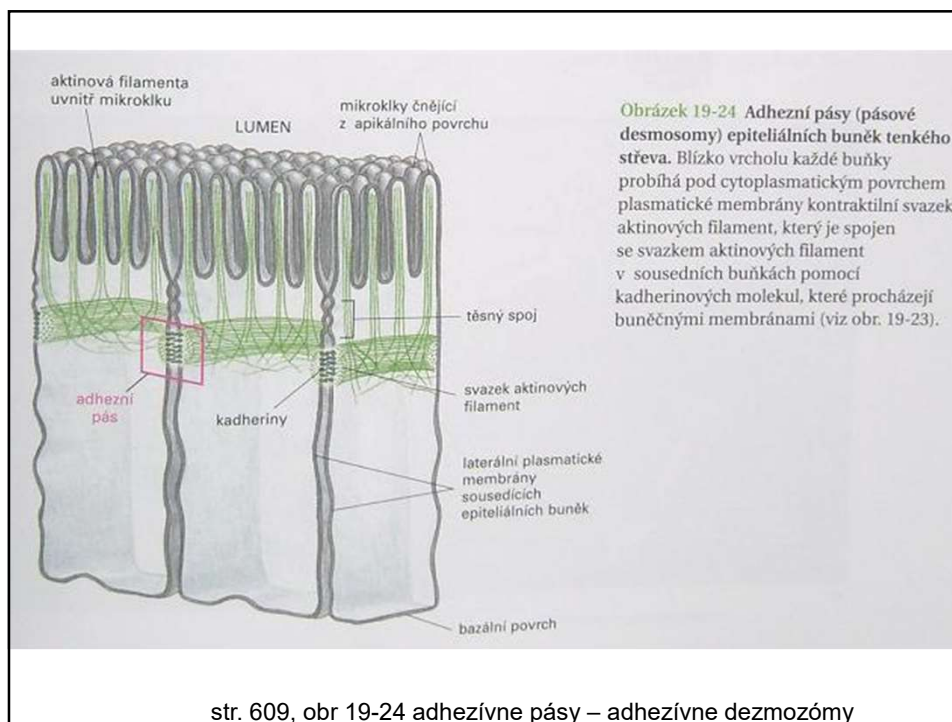
- spájajú bočné steny epiteliálnych buniek
- transmembránové proteíny – **kadheríny** (potrebujú Ca^{2+})
- v **mechanickom spoji** je každá kadherínová molekula vo vnútri bunky prepojená prostredníctvom niekoľkých spojovacích proteínov k aktínovým filamentom tzv. adhezívny pás alebo pásový desmozóm
- umiestnenie blízko apikálneho konca
- takto sú aktínové zväzky spojené z jednej bunky do druhej v celom epitely
- sieť sa môže sťahovať a vytvárať rôzne tvary

Obrázek 19-23 Molekuly kadherinu zprostředkovávají mechanické připojení jedné buňky k druhé. Dvě stejné molekuly kadherinů v plasmatických membránách sousedních buněk se vzájemně vážou; k cytoskeletálním vláknům.



str. 609, obr 19-23 spojenie buniek kadherínom

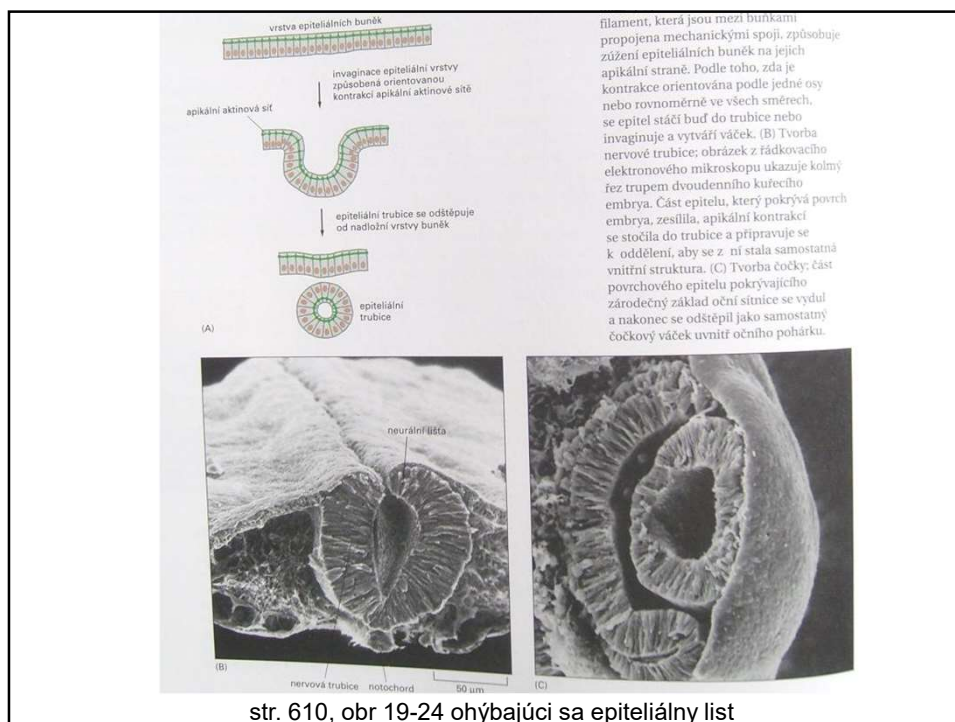
31



Obrázek 19-24 Adhezní pásy (pásové desmosomy) epiteliálních buněk tenkého střeva. Blízko vrcholu každé buňky probíhá pod cytoplasmatickým povrchem plasmatické membrány kontraktlní svazek aktinových filament, který je spojen se svazkem aktinových filament v sousedních buňkách pomocí kadherinových molekul, které procházejí buněčnými membránami (viz obr. 19-23).

str. 609, obr 19-24 adhezivne pásy – adhezivne desmozómy

32

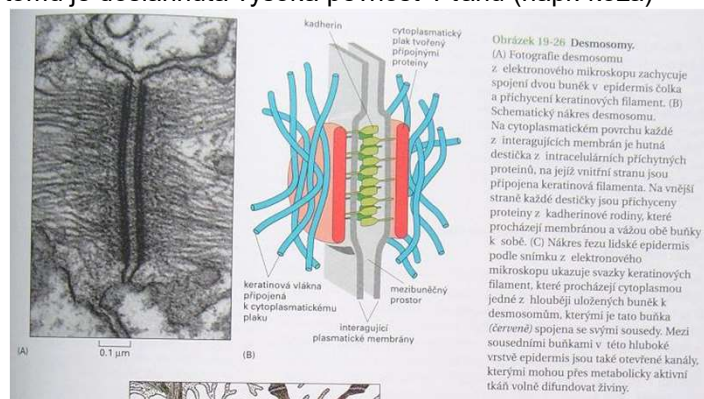


str. 610, obr 19-24 ohýbající se epiteliální list

33

Dezmozómy

- na rozdíl od adhezivních spojů sú kadherínové molekuly pripojené vo vnútri bunky k intermediárnym filamentom, predovšetkým ku keratínom (v epitelocho)
- zväzky keratínových vlákien križujú cytoplazmu a prostredníctvom dezmozómov sú pripojené ku keratínovým vláknám v susedných bunkách
- vďaka tomu je dosiahnutá vysoká pevnosť v ťahu (napr. koža)

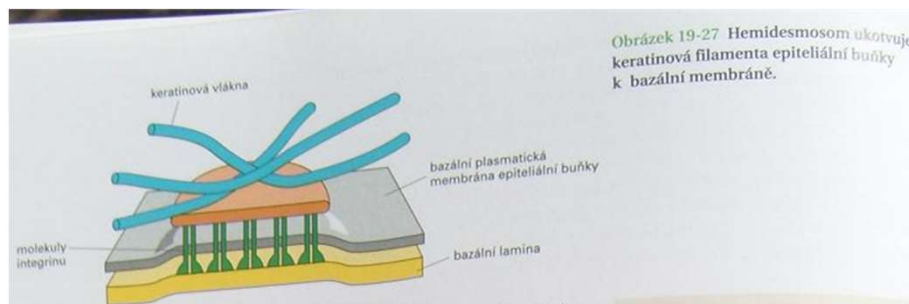


str. 611, obr 19-26 dezmozómy

34

Hemidezmózy

- epiteliálne bunky musia byť prichytené nie len jedna k druhej, ale aj k tkanivám pod nimi
- toto zakotvenie je sprostredkované integrínmi
- zvonku sa integríny viažu k laminínu, zvnútra ku keratínovým vláknám



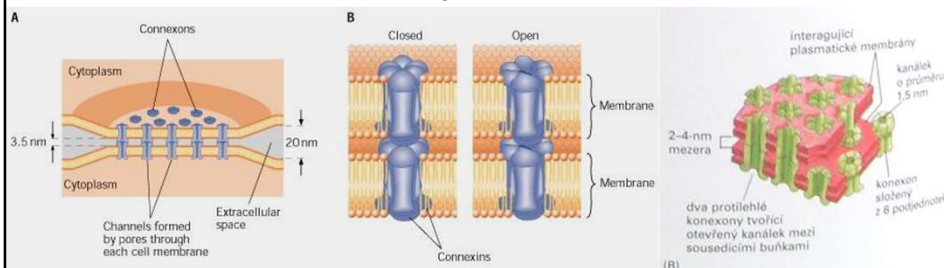
Link Čo je to GTP čiapočka?

str. 612, obr 19-27 hemidezmózy

35

Medzerové spoje

- umožňujú výmenu iónov a malých molekúl medzi bunkami
- štrbina cca 2-4 nm
- konexóny
- molekuly do veľkosti 1000 daltonov
- elektrické a metabolické prepojenie medzi bunkami



36

d'akujem za pozornosť

Aký je rozdiel medzi
medzibunkovými spojeniami
typu gap a tigh junction?

link