

Лекция 11

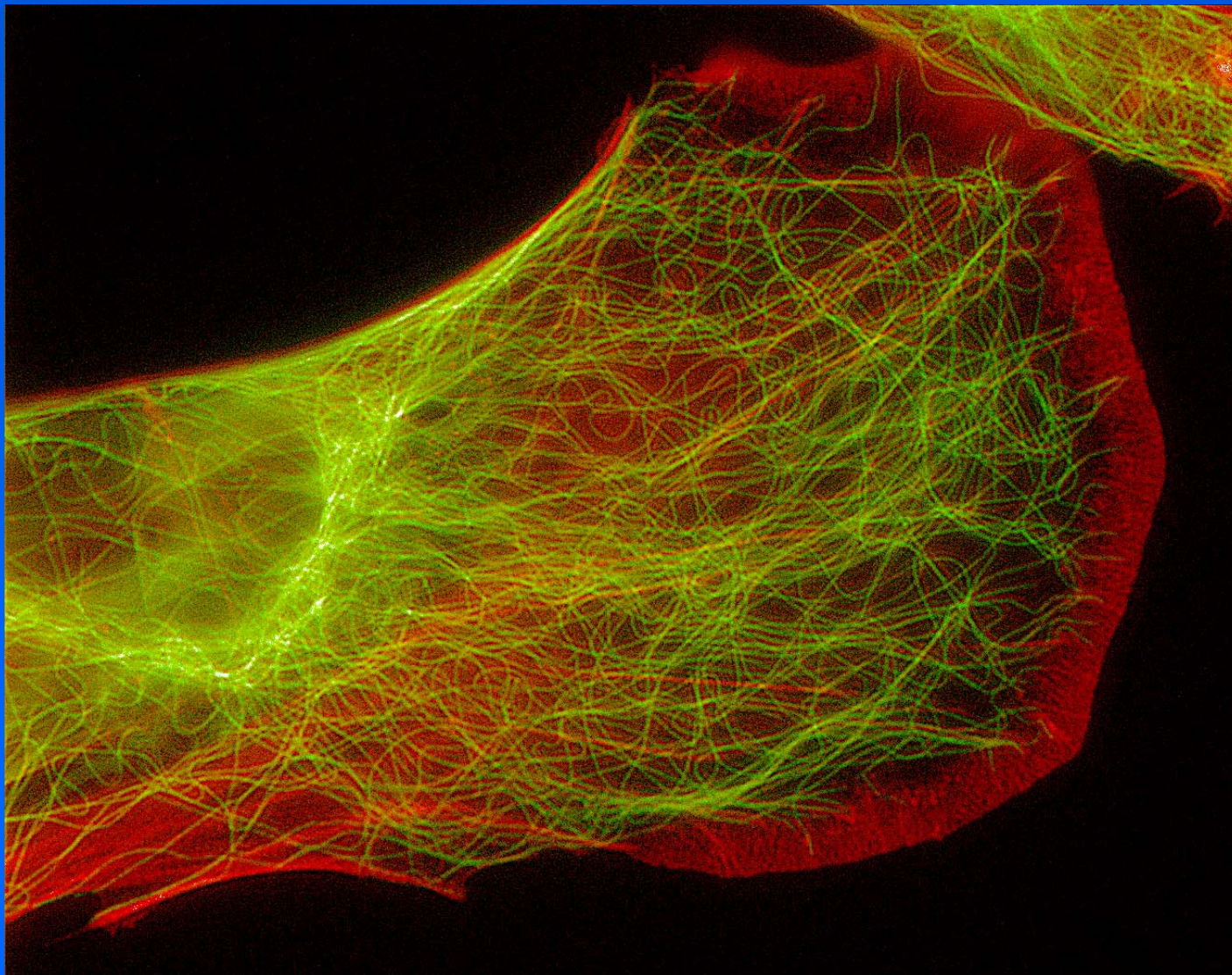
Цитоскелет

Актин и микрофиламенты

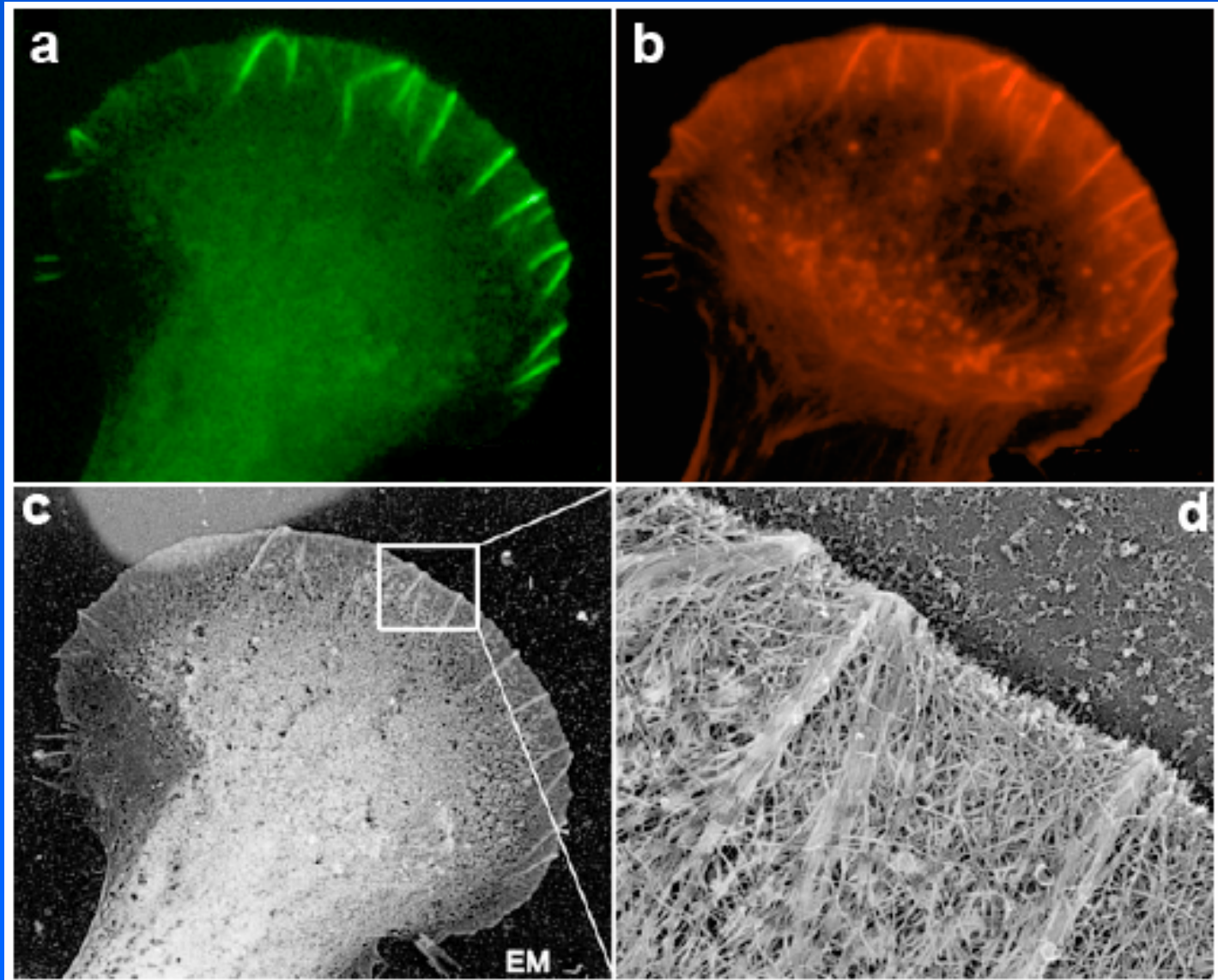
Актомиозиновая подвижность



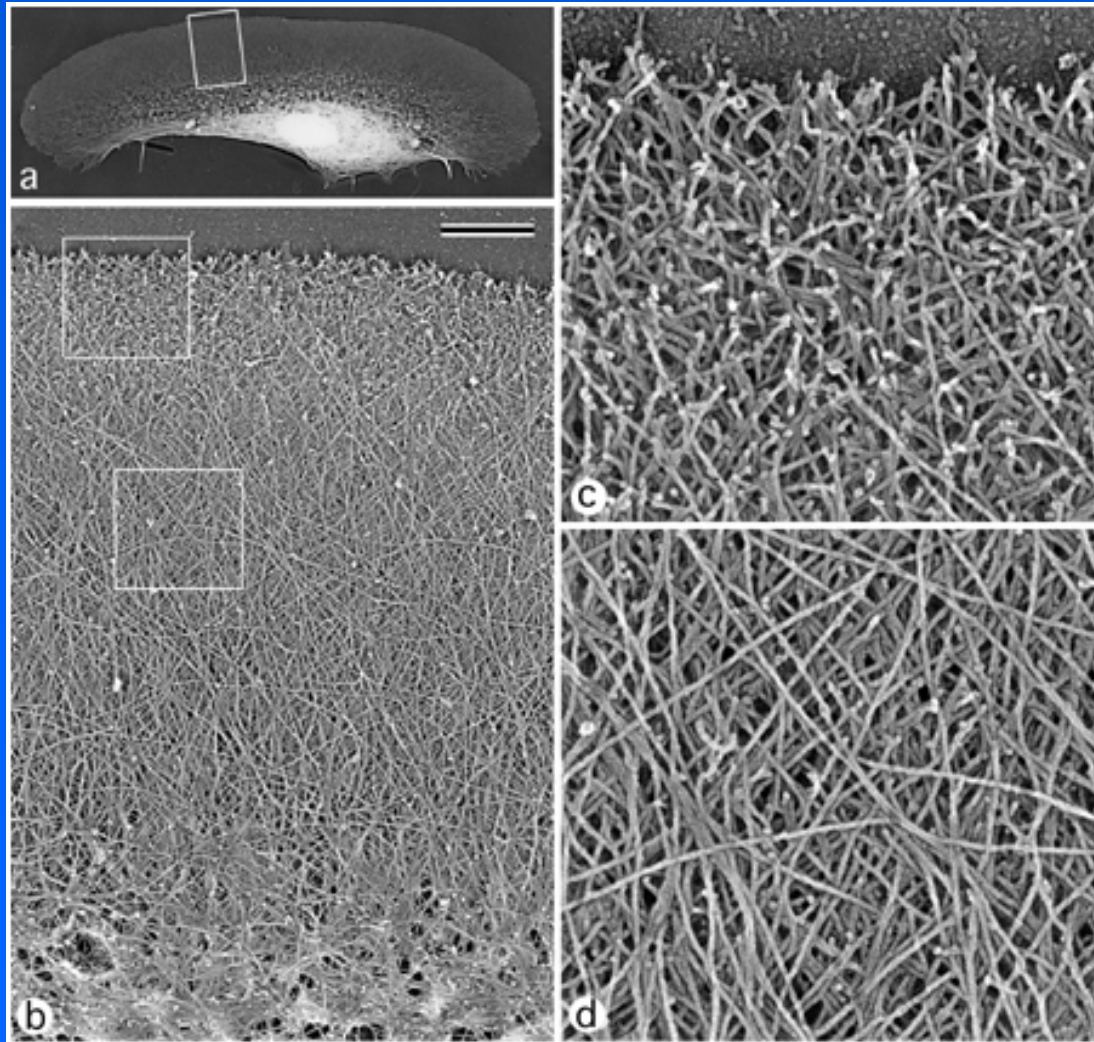
Расположение МТ и актина



Актин на ведущем крае клетки



Организация актиновых филаментов в кератоците



Актин и микрофиламенты

Актин (м.в. 42 кД) является одним из мажорных белков цитоплазмы у всех эукариот.

Актин полимеризуется за счет гидролиза АТФ.

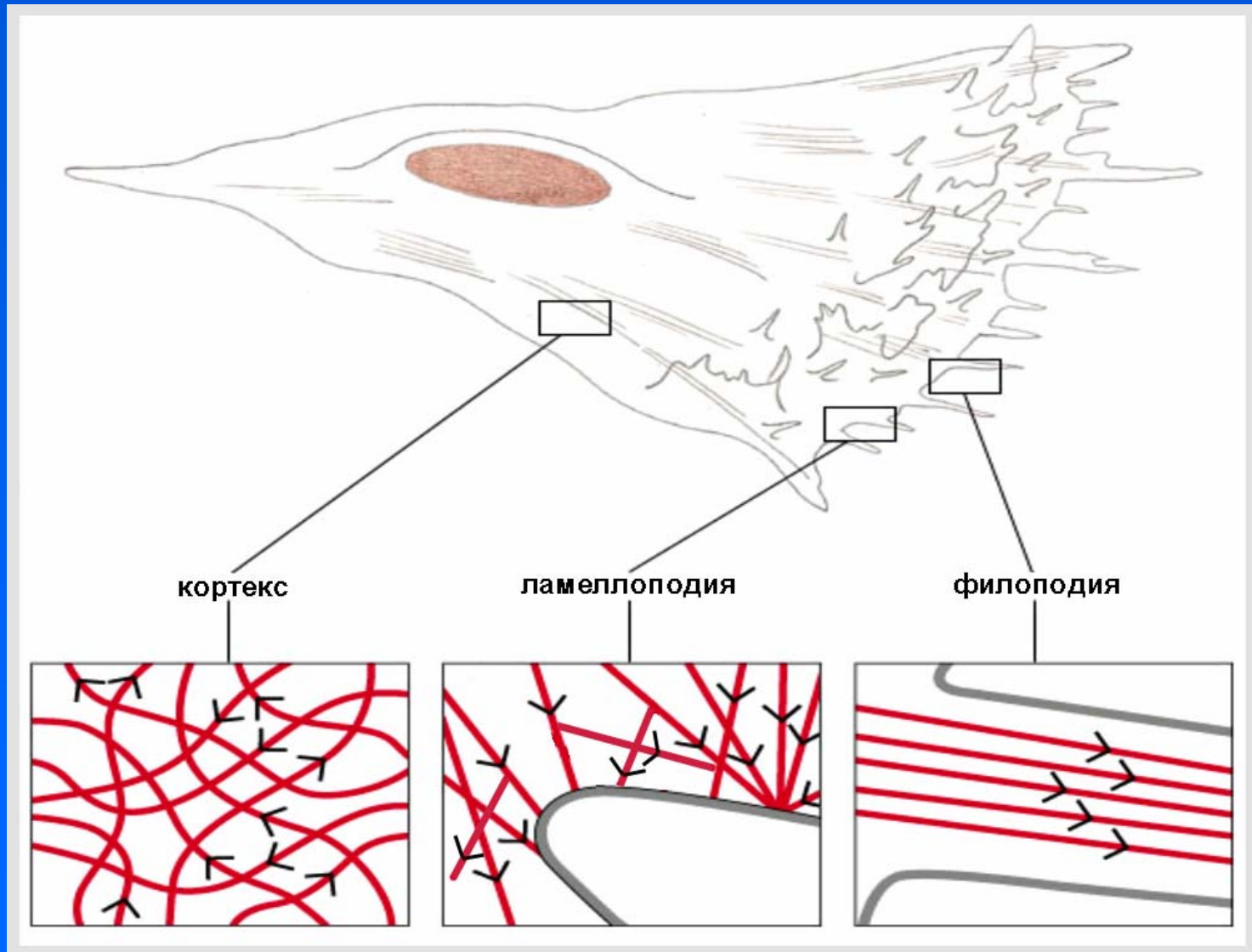
Полимер актина (F-актин) называется микрофиламент.

Микрофиламенты полярны – рост (полимеризация) происходит преимущественно на плюс-конце (barbed end).

Существует около 60 белков, специфически связывающихся с актином. Актин-связывающие белки регулируют полимеризацию актина и пространственную организацию микрофиламентов (одиночные филаменты, параллельные пучки, сеть перекрещивающихся филаментов).

Яды: сеть микрофиламентов дезорганизуется цитохалазинами В и D, микрофиламенты деполимеризуются латрункулинами А и В и стабилизируются фаллоидином.

Организация микрофиламентов в цитоплазме фибробласта



Организация актина на краю клетки

Микрофиламенты могут образовывать пучки и сеть (ветвление под углом 70°).

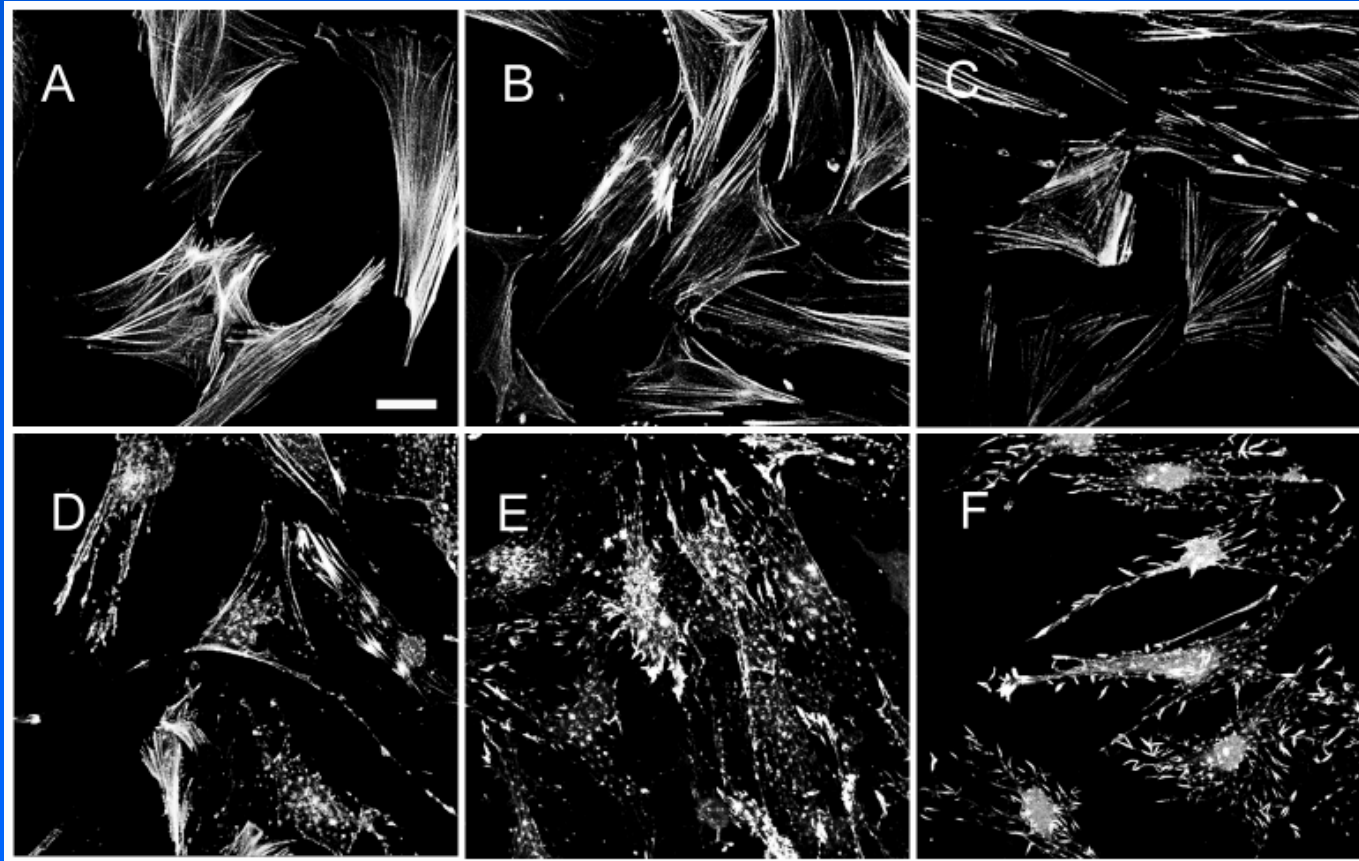
Филоподия (пучок) – диаметр около 0,1 мкм, длина достигает нескольких мкм.

Время жизни свободной филоподии – около 1 секунды; прикрепленная филоподия натягивается; свободная филоподия втягивается.

Ламеллоподия (сеть) – ширина до нескольких десятков мкм, толщина около 0,2 мкм, длина – несколько мкм.

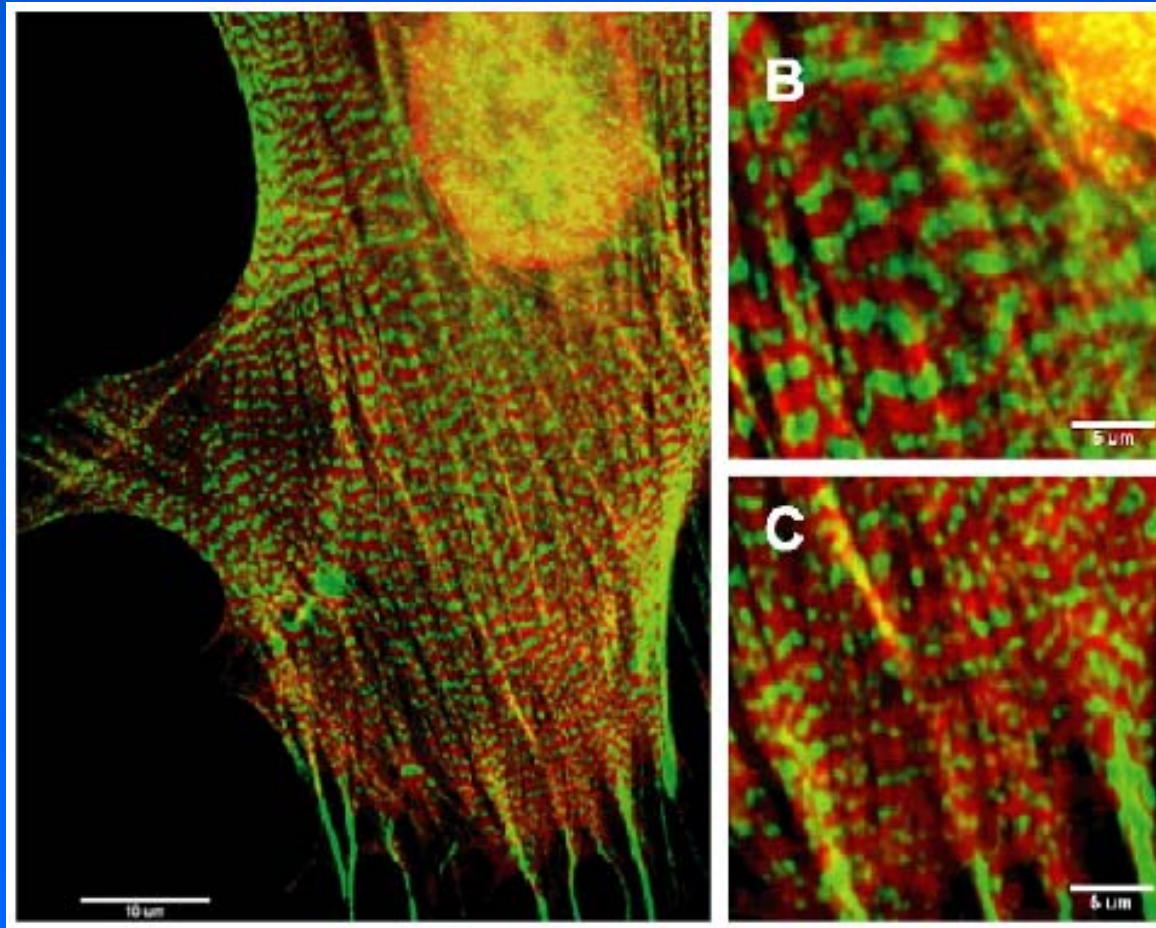
Время жизни свободной ламеллоподии – около 10 секунд; прикрепленная ламеллоподия натягивается и остаётся тонкой.

Деполимеризация микрофиламентов



Актиновые филаменты обратимо деполимеризуются в живых клетках специфическими ядами – цитохалазинами В и Д и латрукулинами А и В.

Стресс-фибриллы

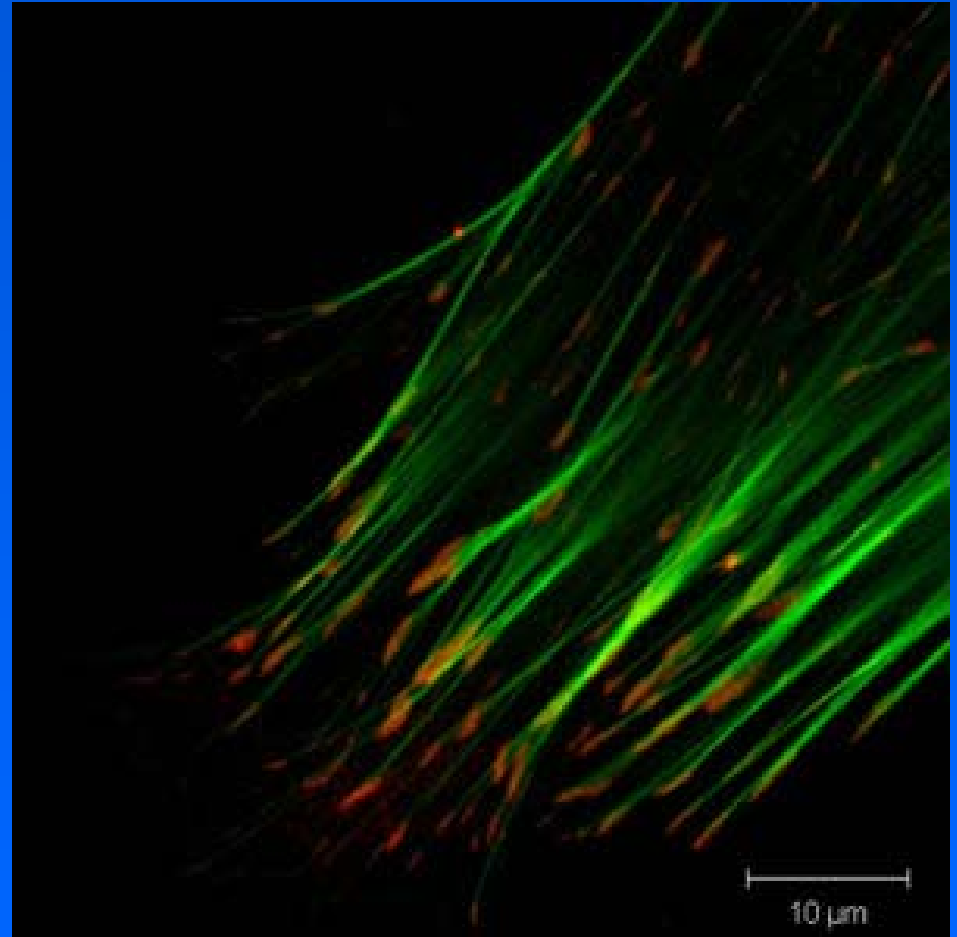


Стресс-фибриллы – параллельные пучки микрофиламентов, связанных с миозином (красный) и альфа-актенином (зеленый)

Фокальные контакты

Трансмембранные комплексы, индуцирующие рост пучков микрофиламентов (стресс-фибрилл).

Они обеспечивают заякоривание белков и механохимическое сопряжение.



Структура фокального контакта

Незрелый контакт – интегрины, талин, паксиллин.

Зрелые контакты – добавляется много белков (зиксин и др., всего более 50).

Цитоскелетная часть – актин-связывающие белки: альфа-актинин, филламин, винкулин.

Форма и размер контакта:

Первичные контакты – диаметром 0,3-0,5 мкм

Зрелые контакты – до 5 мкм в длину.

Основные функции микрофиламентов

Актиновые филаменты образуют кортекс (трехмерную сеть) под мембраной, обеспечивая механическую прочность клетки и компенсируя осмотическое давление.

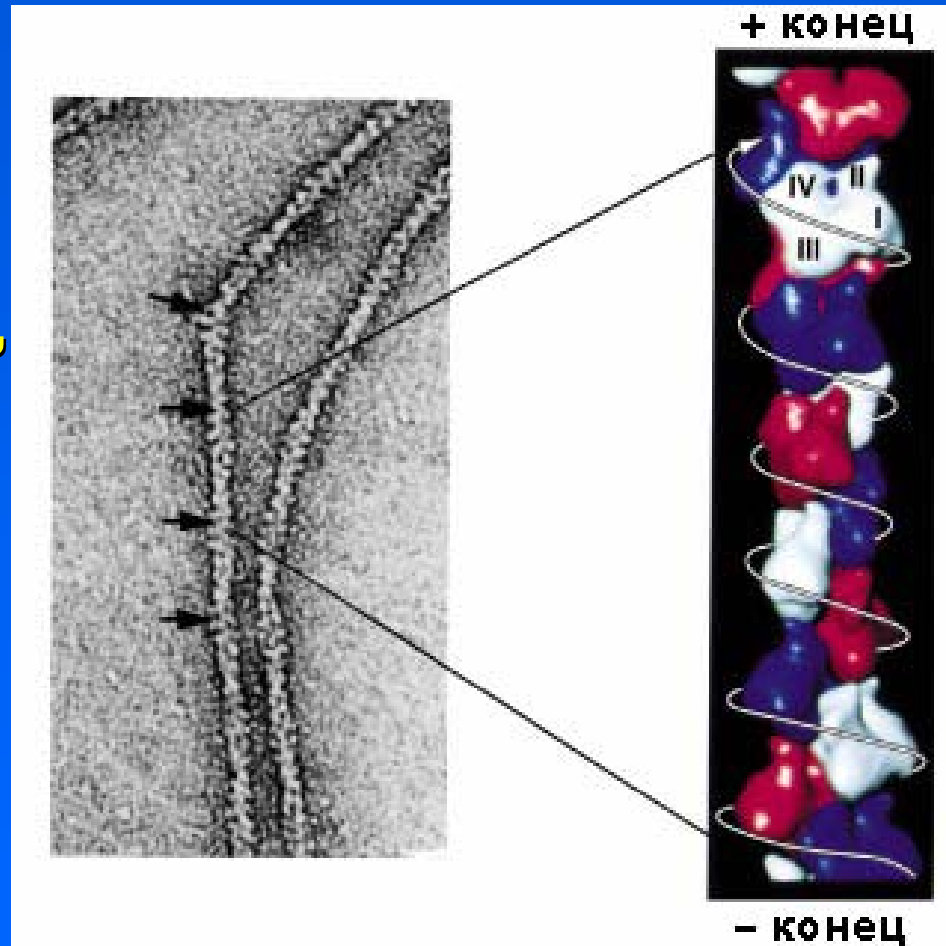
Быстрая полимеризация актина обеспечивает выдвижение переднего края клетки.

Пучки микрофиламентов заякоривают мембранные белки и формируют фокальные контакты.

Взаимодействие актина с миозином создает внутриклеточные сократимые структуры (кортекс, стресс-фибриллы) и обеспечивает транспорт вдоль микрофиламентов.

Структура микрофиламента

Электронная
микроскопия,
негативный
контраст

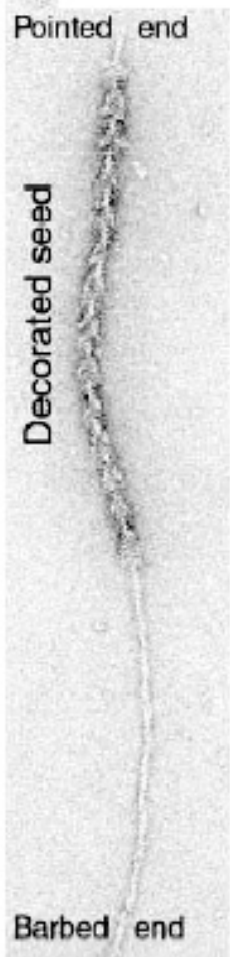


Модель



Полимеризация актина

Электронная
микроскопия



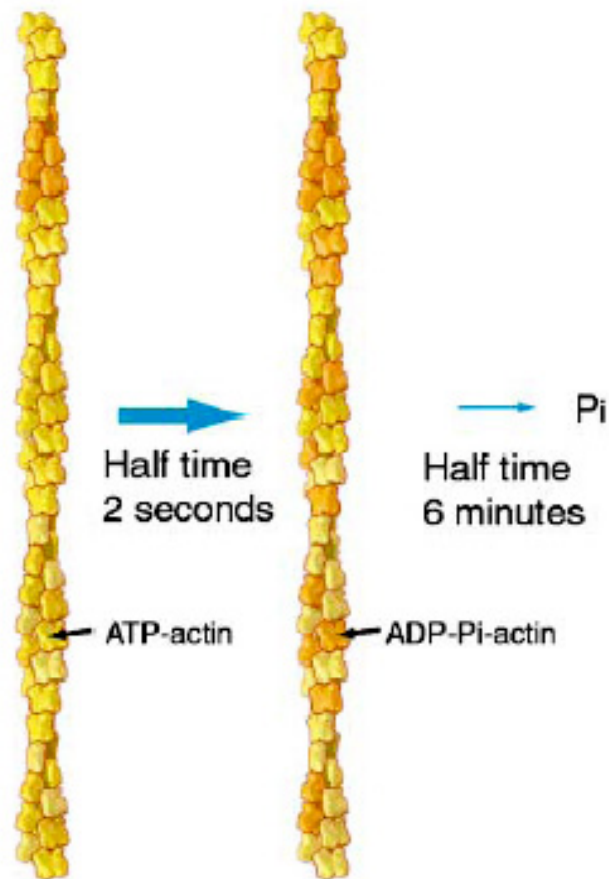
Константы скорости



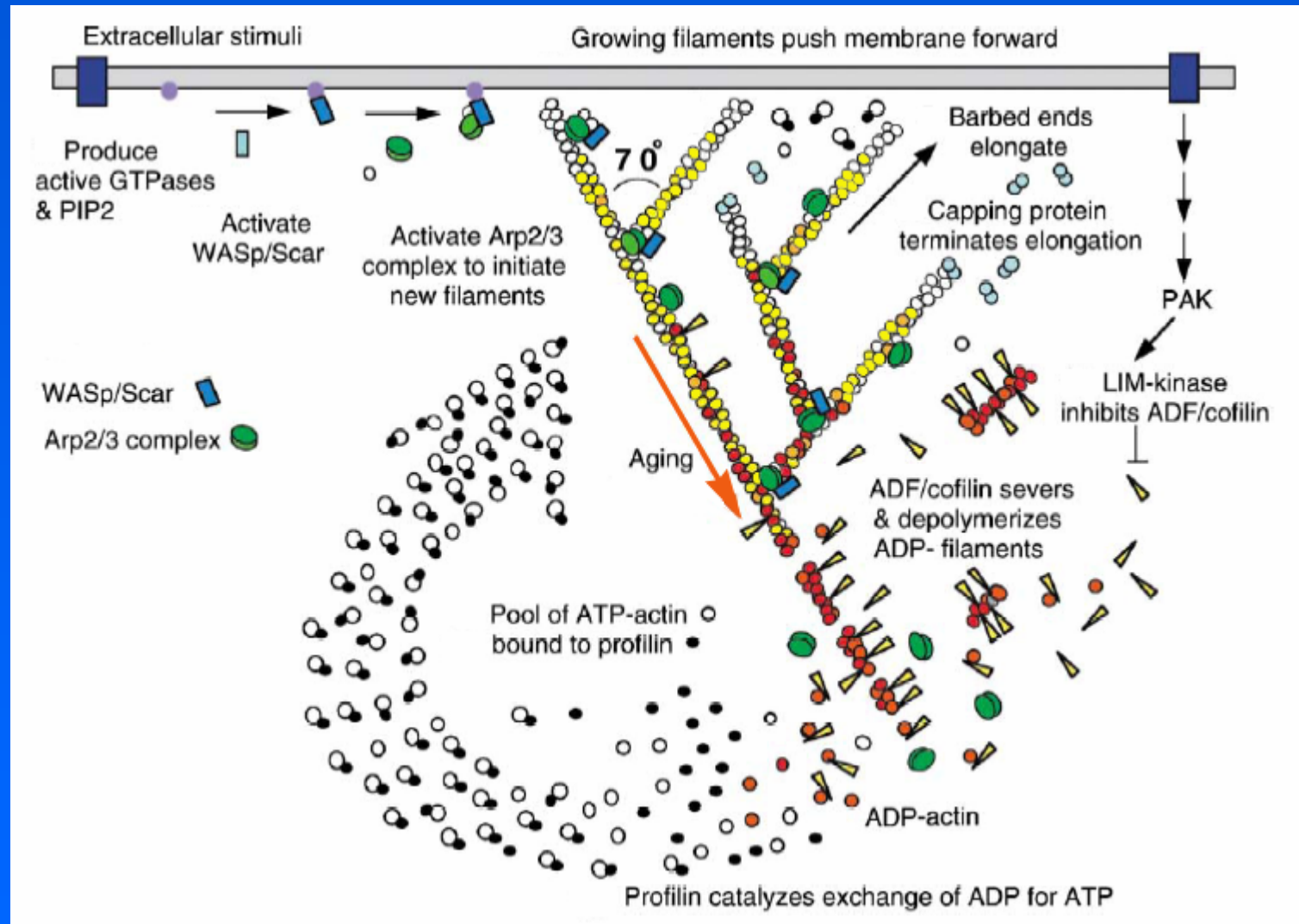
Гидролиз АТФ

Диссоциация
фосфата

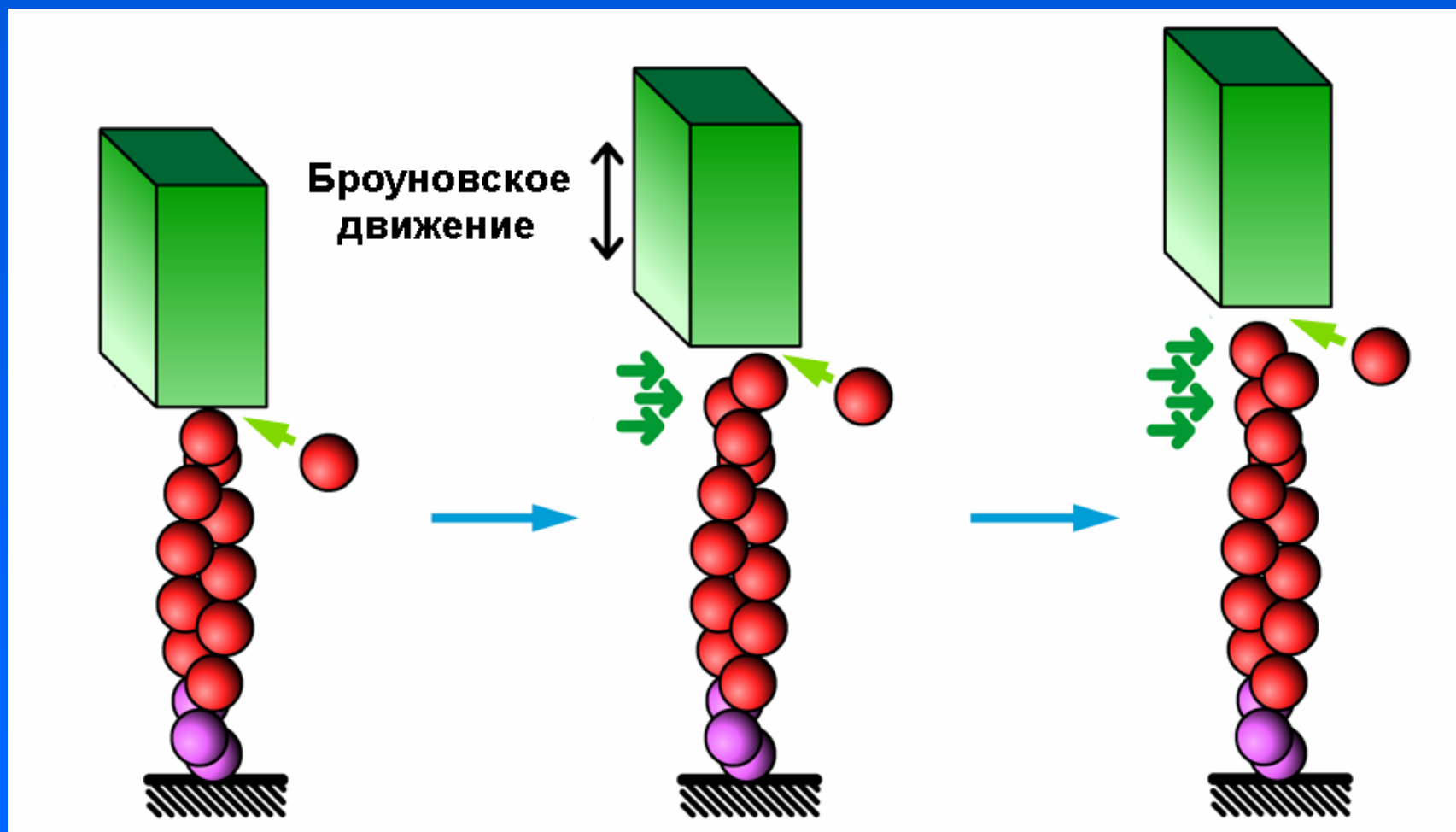
направление роста



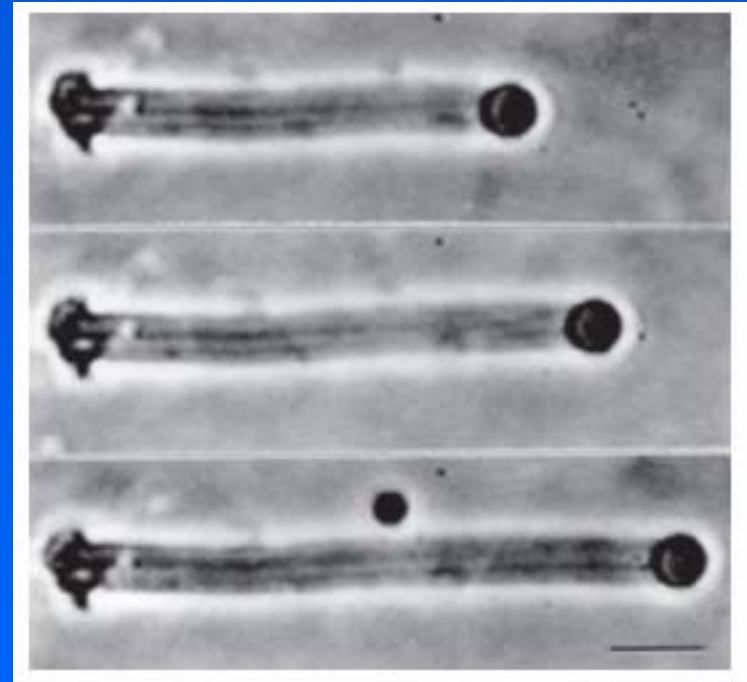
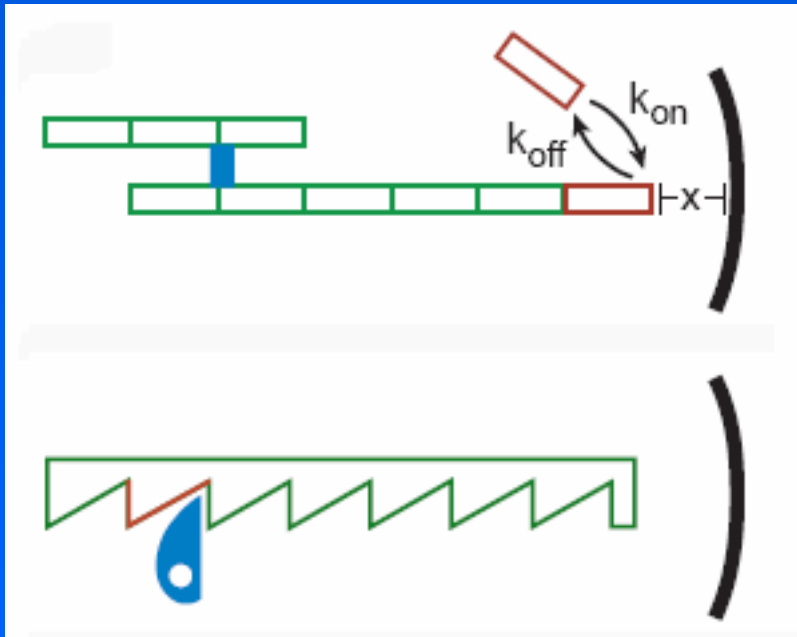
Полимеризация актина в ламелле



Броуновская трещотка - принцип



Броуновская трещотка



Храповой механизм (трещотка) поддерживается за счет энергии гидролиза АТФ

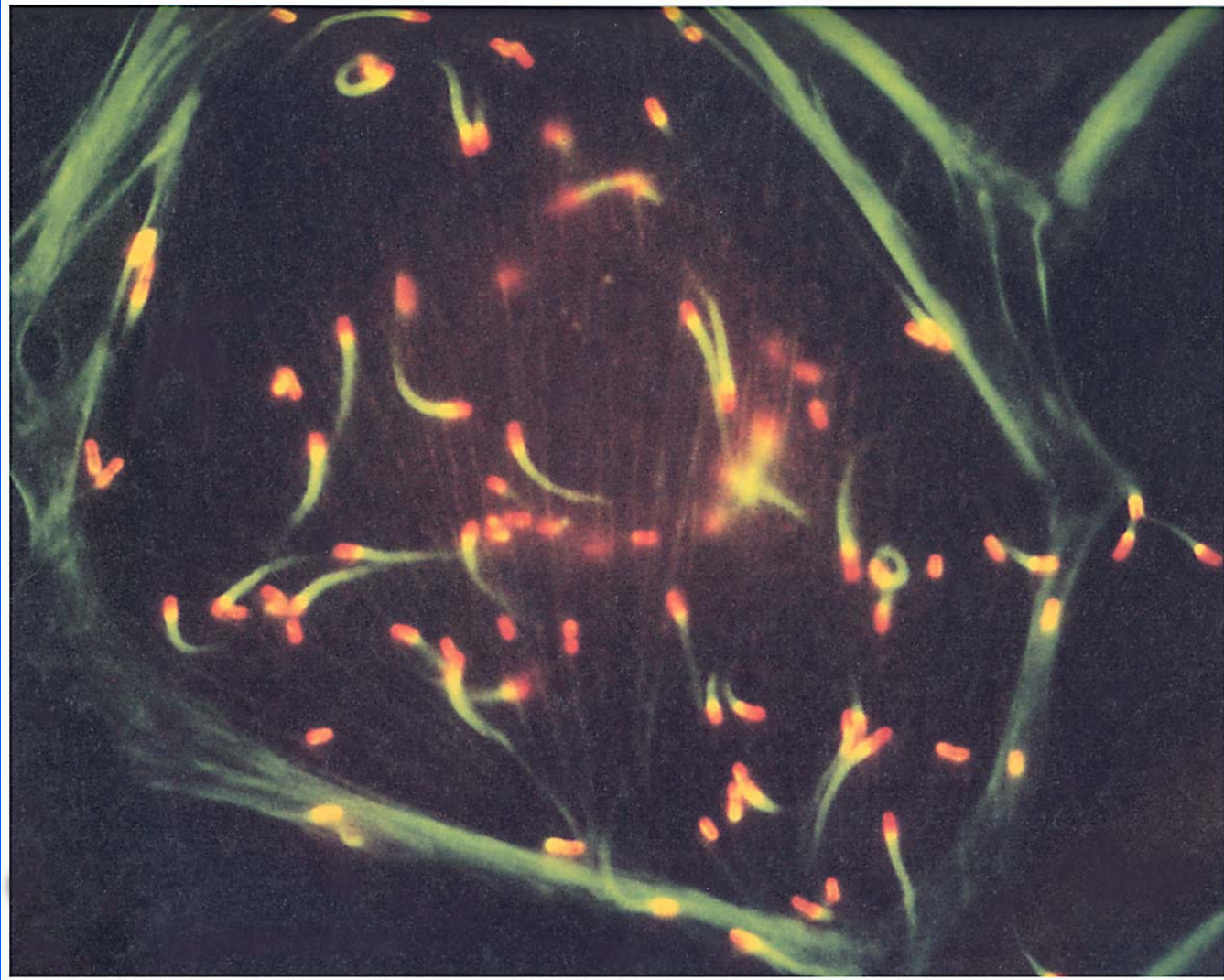
Движение за счет полимеризации актина

Асимметричная полимеризация актина (в виде пучка микрофиламентов) может создавать реактивный эффект.

Асимметрия полимеризации может возникать спонтанно, или стимулироваться белками на поверхности частицы (бактерии).

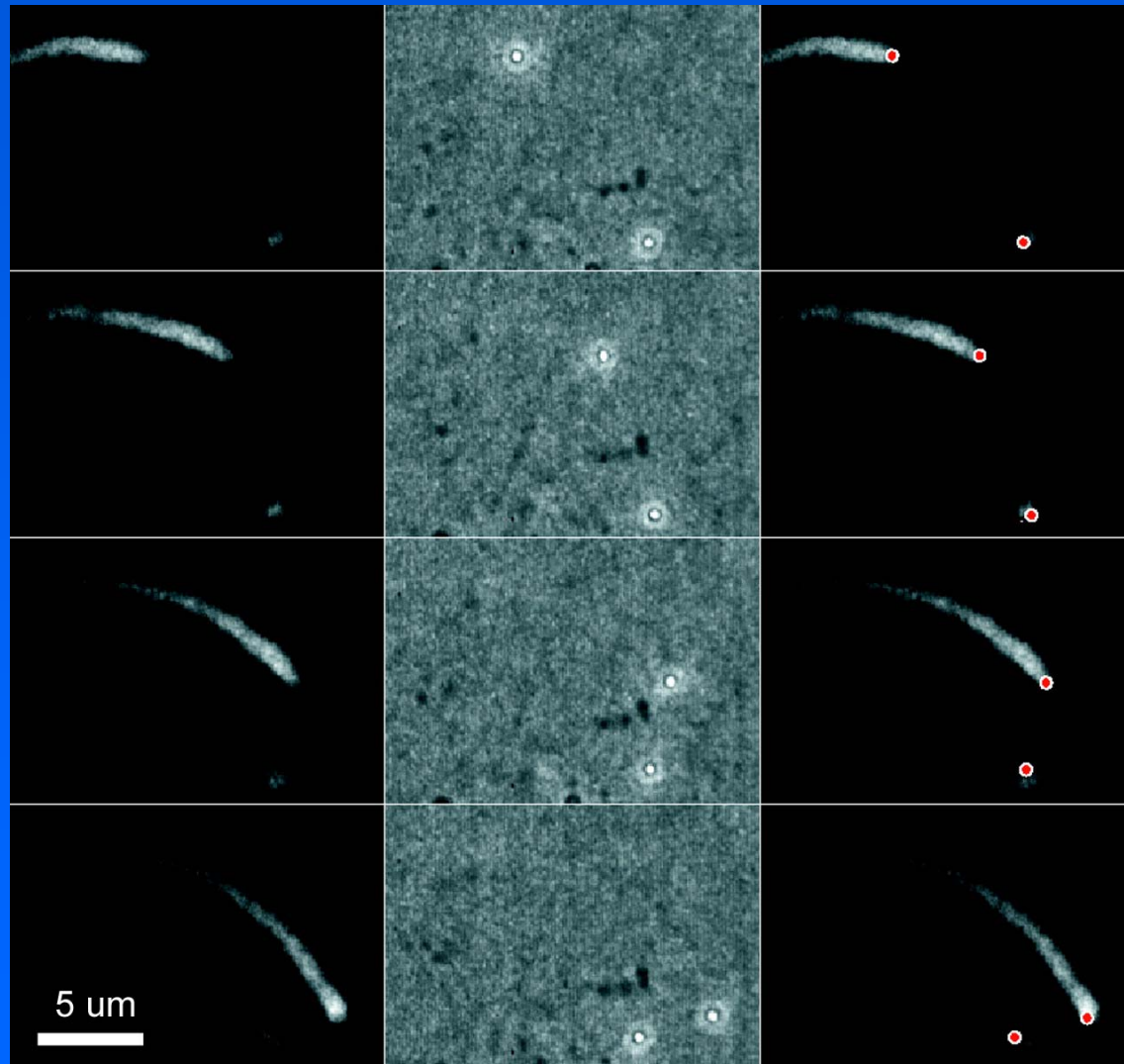
Примеры движения бактерий внутри эукариотических клеток за счет полимеризации актина – *Listeria*, *Shigella*.

Движение *Listeria* в цитоплазме



Движение частиц в бесклеточной среде

Скорость -
9 мкм/мин



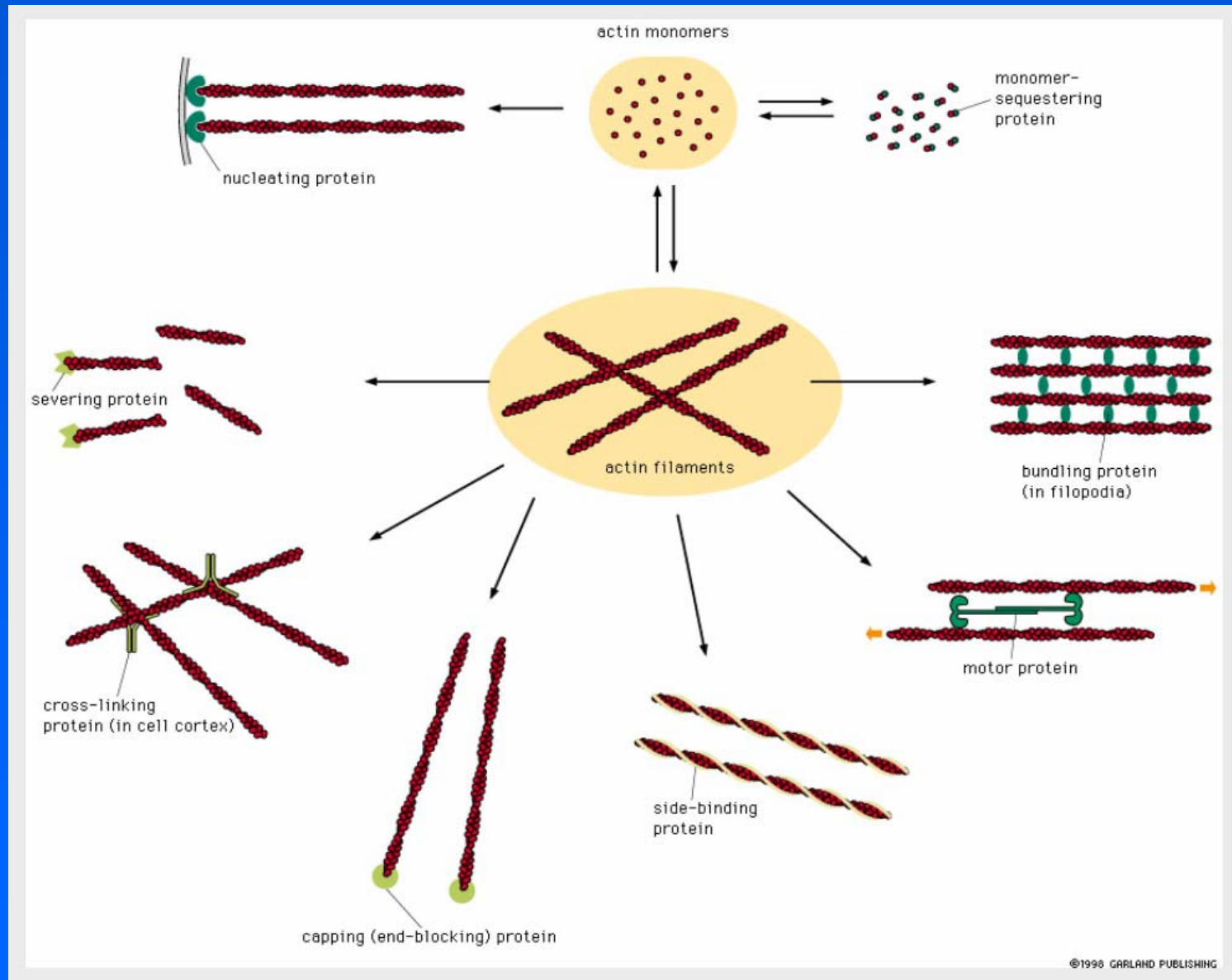
АКТИН И ОСМОС

Кортикальный актин обеспечивает форму клетки и система микрофиламентов противостоит онкотическому давлению.

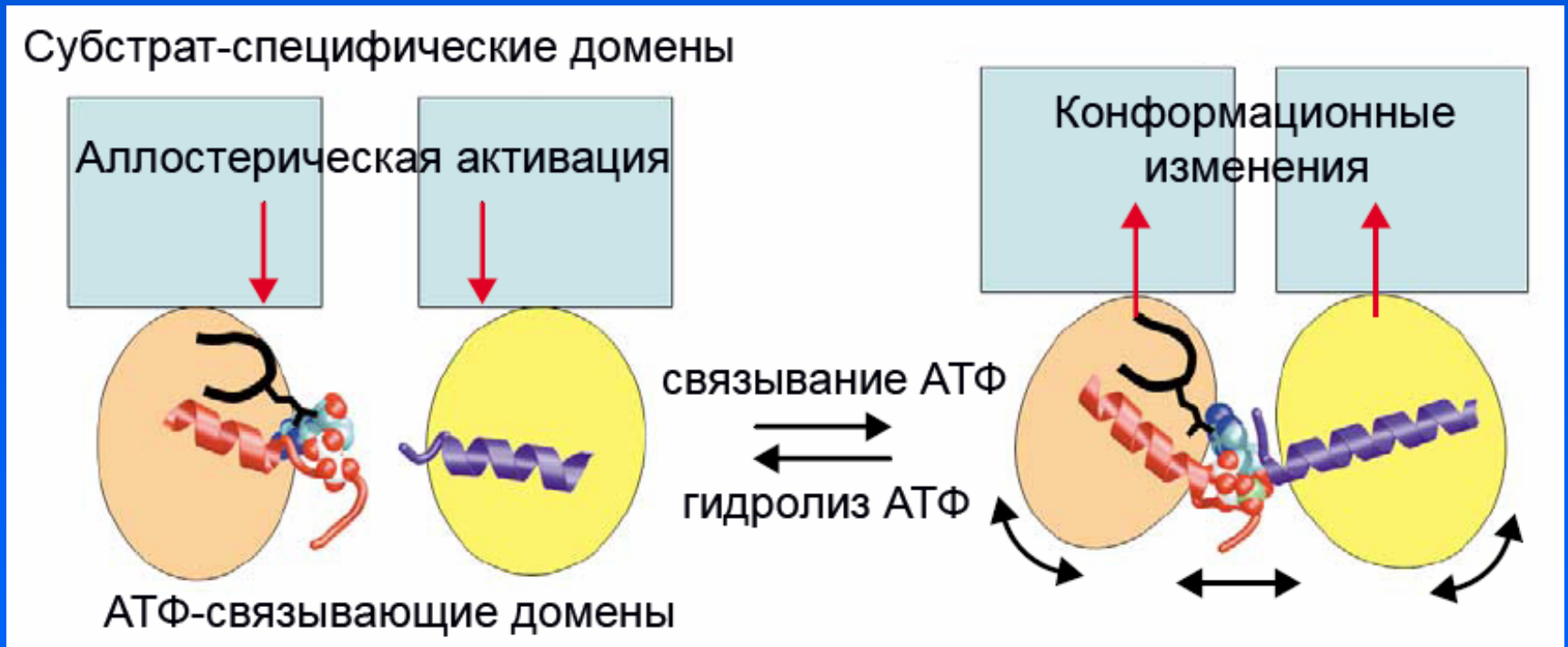
Деполимеризация микрофиламентов приводит к образованию вздутия (пузыря) на поверхности клетки.

В клетках растений осмотическому давлению противостоит целлюлозная клеточная оболочка – поверхностный слой микрофиламентов у них не развит.

Регуляция сети микрофиламентов



Механо-химический переносчик (АТФ-аза)



Связывание АТФ создает конформационные изменения внутри молекулы переносчика, достаточные для выполнения специфической функции – переноса молекулы по отношению к другим молекулам.

Процесс становится необратимым вследствие гидролиза АТФ.

МИОЗИНЫ

Структура молекулы миозина: тяжелая цепь, легкая цепь (одна или несколько).

АТФ-связывающий центр (глобулярная часть молекулы) – эволюционно консервативен.

Шейка (necklace) содержит кальмодулин-связывающий домен.

Хвост тяжелой цепи – вариабелен.

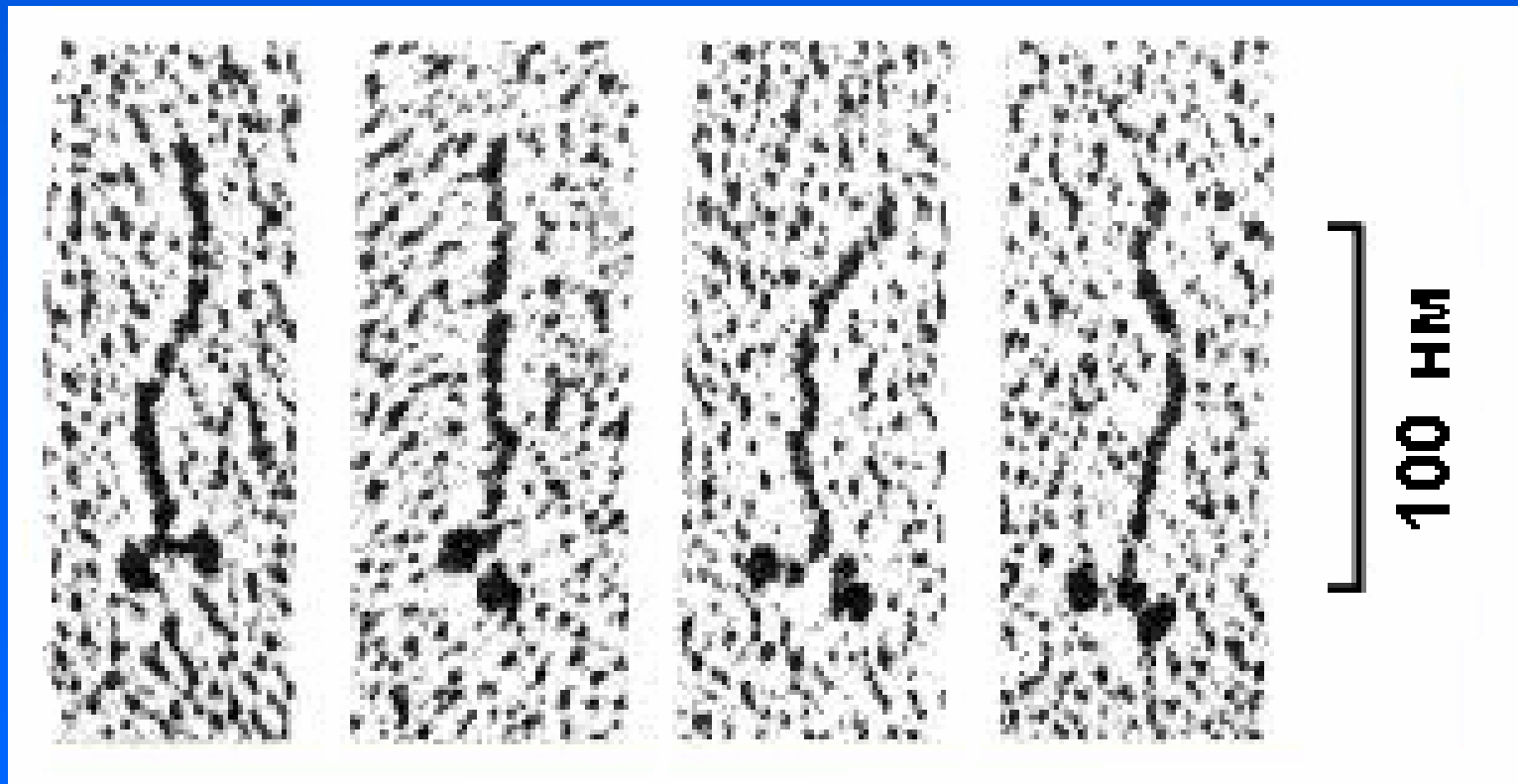
Как правило миозин образует гомодимеры.

АТФ-азная активность миозина стимулируется актином.

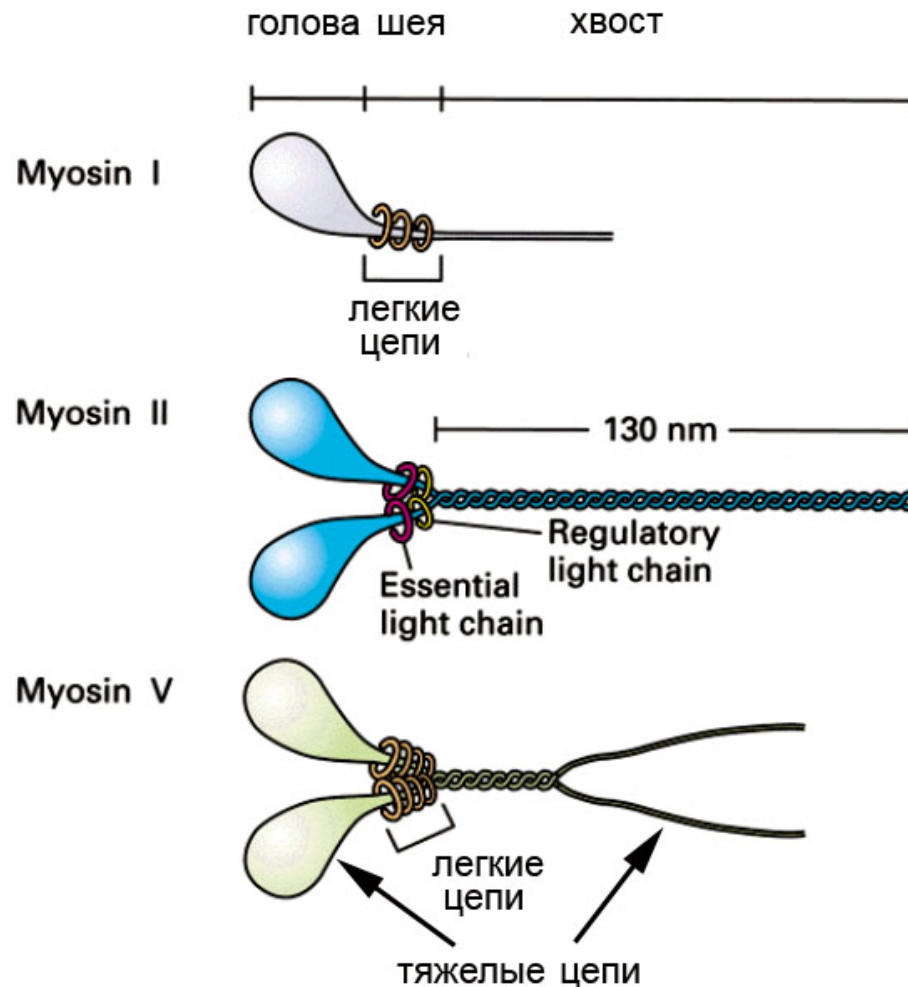
Взаимодействие с актином регулируется кальцием (через кальмодулин и аналогичные белки).

В клетке присутствуют в виде отдельных молекул (движутся вдоль актина) или образуют комплексы (стягивающие актиновые филаменты).

Молекула миозина, электронная микроскопия



Молекулы миозина



Легкие цепи миозина ассоциированы с шеей тяжелых цепей

Миозины II и V могут образовывать биполярные димеры

Миозин II - мышечный

Миозины I и V связываются хвостами с мембранами

Микроманипуляции и оптический захват (optical trap)

Мощный лазер (>100 мВт) фокусируется объективом микроскопа в диск Эри (перетяжку).

Выжигание (488 нм, 532 нм) – микродиссекция.

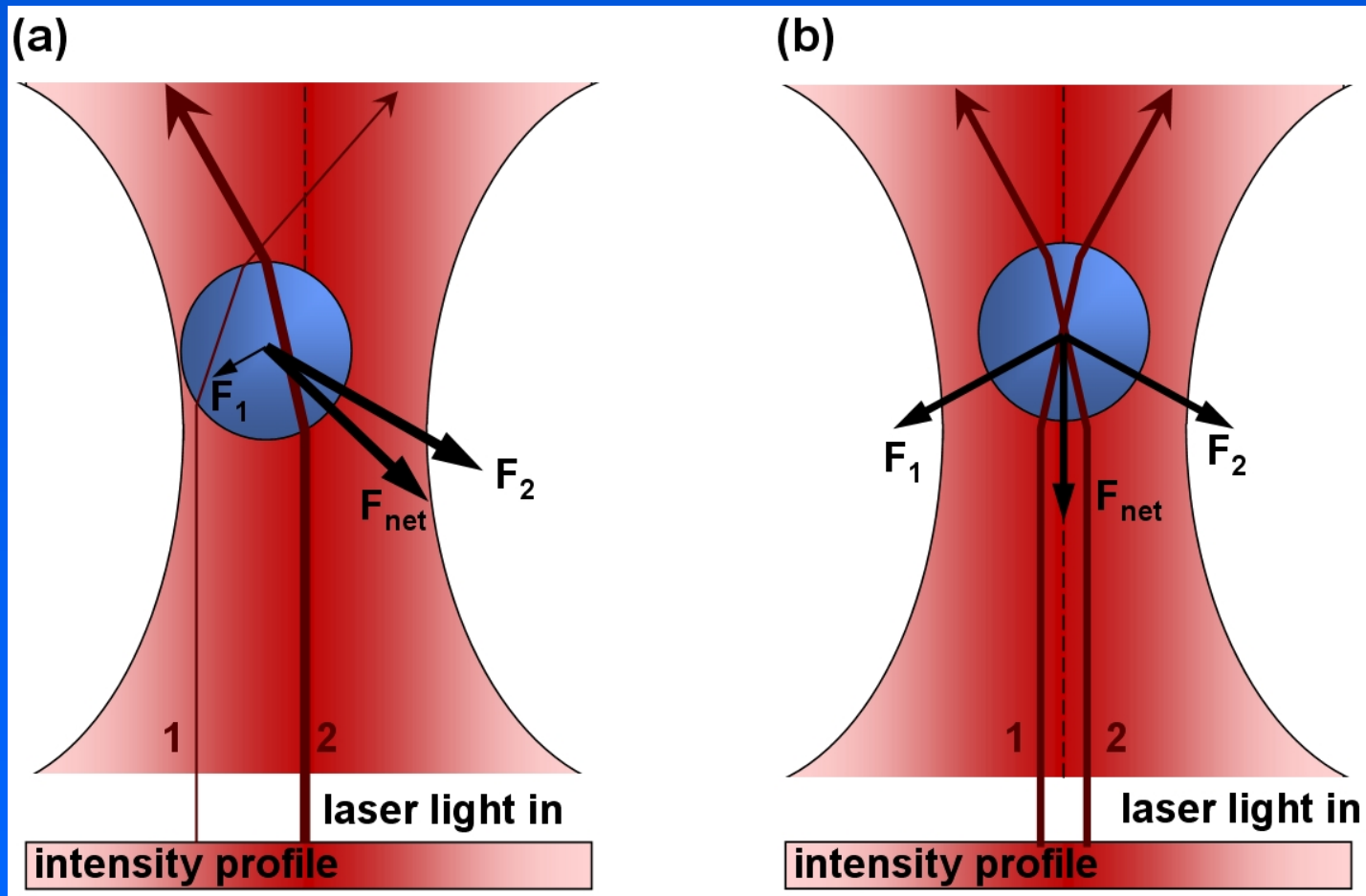
Инфракрасный лазер (700-1100 нм) – оптическая ловушка. Сила пропорциональна разнице коэффициентов преломления и объему частицы ($d < 0,25$ мкм).

Управление ловушкой – медленное перемещение столика или быстрое перемещение луча (частота более 1 МГц).

Измерения силы (пиконьютоны) производится по смещению центроида или по ускользанию из ловушки.

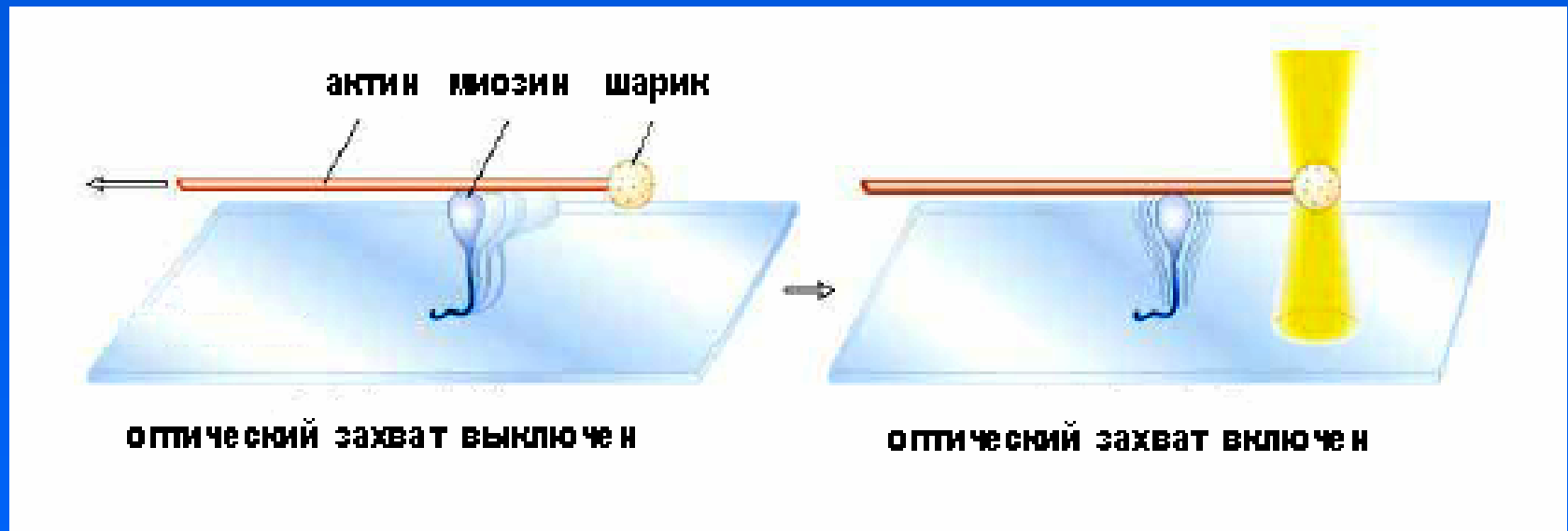
Точность определения положения – восстановление (расчет положения) центроида (<1 нм).

Оптический захват



На смещенную частицу действует сила,
направленная к оси пучка

Анализ подвижности методом оптического захвата



Два вида измерений: усилие (мощность лазера), удерживающее шарик, или смещение шарика из центра пучка при данной мощности



Миозины и движение вдоль микрофиламентов

Локомоторный цикл миозина идет с гидролизом АТФ. Шаг – 8 нм; усилие – 1-5 пН.

Движение каждого миозина однонаправленно – только к плюс или только к минус-концу микрофиламента.

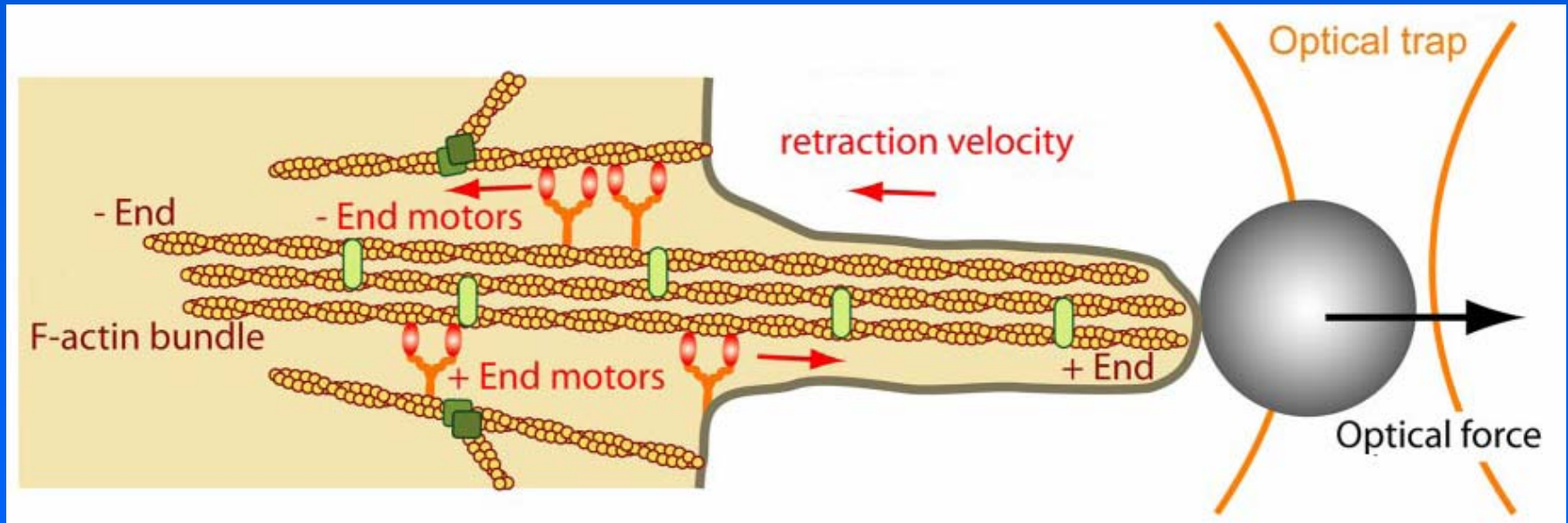
Движение малопроецессивно (у животных) – расстояние переноса вдоль актинового филамента менее 1 мкм. Скорость движения – от 0,04 мкм/с до 5 мкм/с.

Движение процессивно (у растений) – расстояние переноса составляет несколько мкм, скорость движения – 5-60 мкм/с.

Миозин может образовывать биполярные комплексы, которые обеспечивают движение микрофиламентов навстречу друг другу (мышечное сокращение, сокращение кортекса).

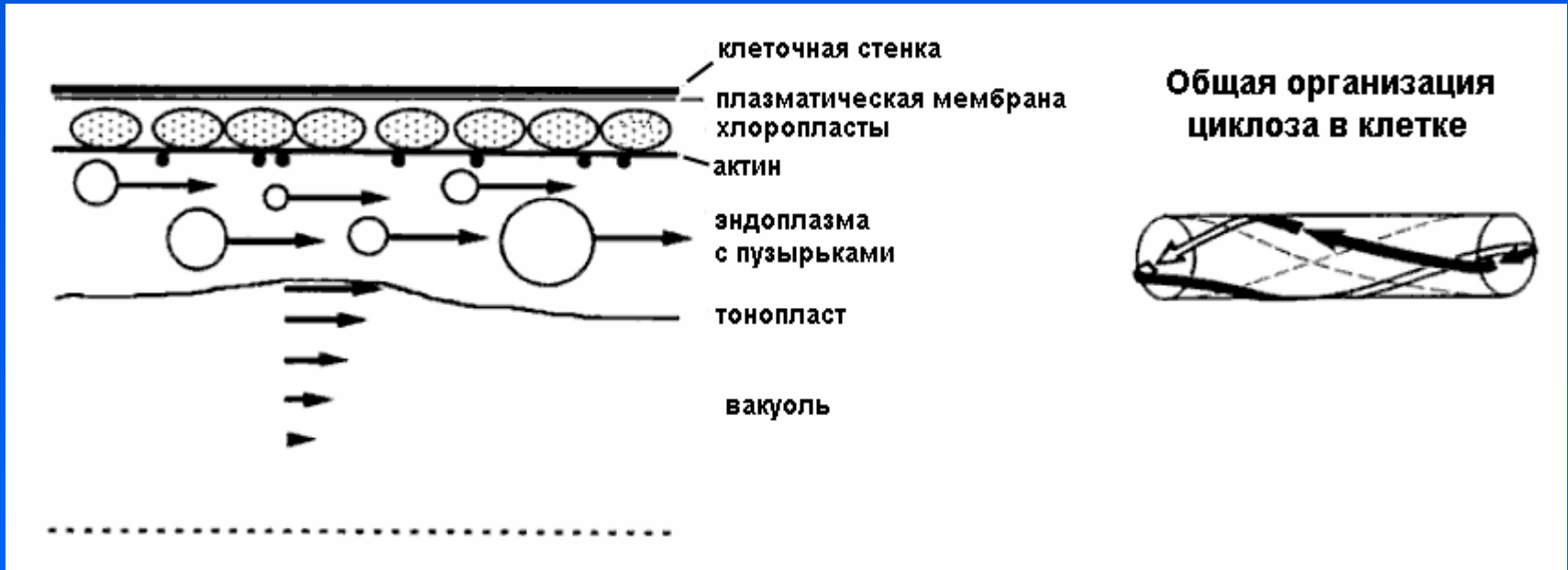
Миозины представлены семействами генов (более 15), экспрессия которых видо- и тканеспецифична.

Филоподии быстро втягиваются



Филоподии быстро полимеризуются и затем втягиваются, развивая усилие около 10 пН. Усилие обеспечивается пучком микрофиламентов и, вероятно, миозинами.

Циклоз у Chara



Под эктоплазмой с неподвижными хлоропластами располагаются пучки актина, вдоль которых с помощью миозина в эндоплазме движутся многочисленные пузырьки. Внутри вакуоли движение быстро затухает.