

# Buněčný cytoskelet

A fluorescence micrograph of a cell. The cell is stained with green and magenta dyes, highlighting the cytoskeletal structure. The nucleus is stained blue. The cell is elongated and has several long, thin processes extending outwards. The background is black.

*Milan Bartoš*

**Přednáška Biologie 2023**

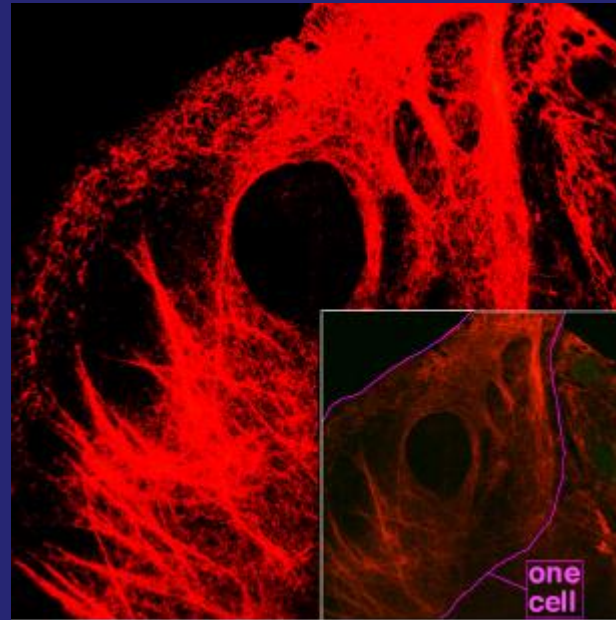
# Obsah přednášky

- 1. Chemická a fyzikální struktura buněčného skeletu**
- 2. Střední filamenta, mikrotubuly, centrozóm, aktiniová vlákna**
- 3. Samosestavování a dynamická struktura cytoskeletárních filament**
- 4. Regulace tvorby cytoskeletárních struktur**
- 5. Molekulární motory**

# *Přínos brněnských vědců*



prof. MUDr. Oldřich Nečas, DrSc.



Nečas, O et al.: Cytoskelet. Academia, 1991

# *Cytoskelet – fibrilární struktury*

## Cytoskelet

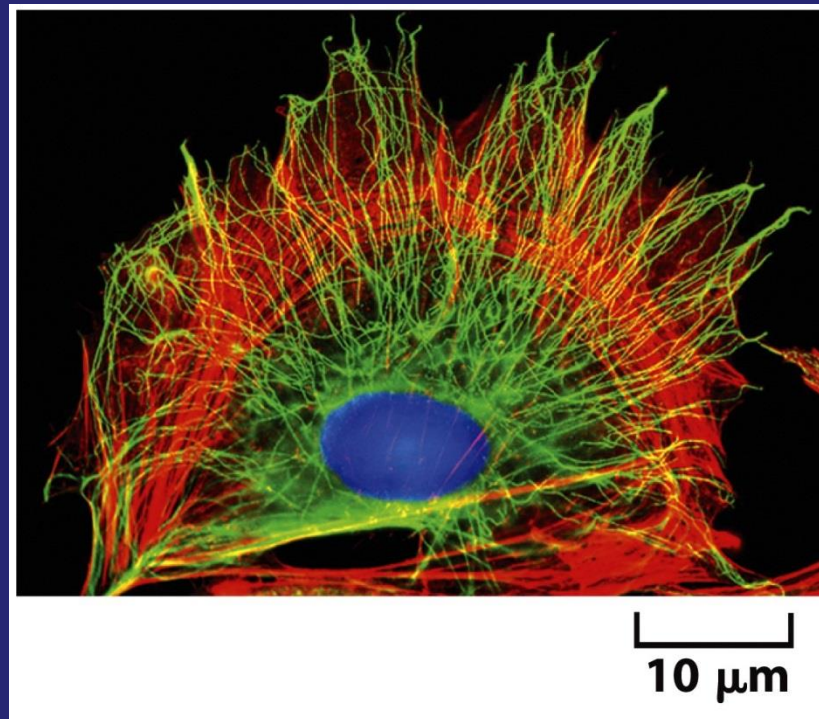
je dynamický systém proteinových vláken a tubulů, jejichž hlavní funkcí je transport látek a buněčných komponent, opora buňky a účast na jejím dělení

Je to soustava vláken situovaná  
v **cytoplasmě** a **jádře**

# *Pohled na fibrilární struktury*

Zafixovaná a značená buňka z buněčné kultury

Mikrotubuly  
(zeleně)



Aktinová  
filamenta  
(červeně)

DNA v jádře  
(modře)



# *Cytoskelet – dynamický nebo rigidní?*



?



# Cytoskelet – fibrilární struktury

## Cytoskelet

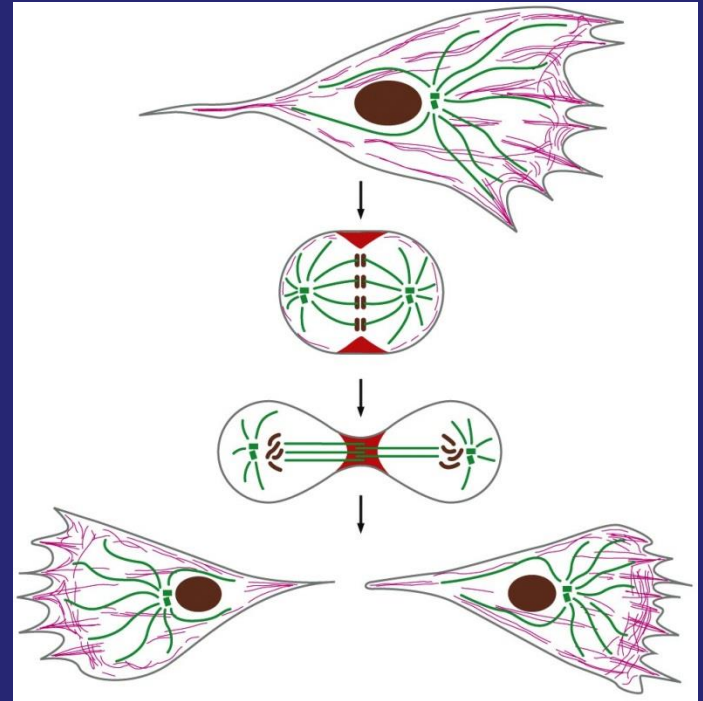
je **dynamický** systém proteinových vláken a tubulů, jejichž hlavní funkcí je transport látek a buněčných komponent, opora buňky a účast na jejím dělení.

Je to soustava vláken situovaná v **cytoplasmě** a **jádře**

# Rychlé změny cytoskeletu

## Cytoskelet

Je reorganizován v průběhu rychlých změn, např. při dělení buňky

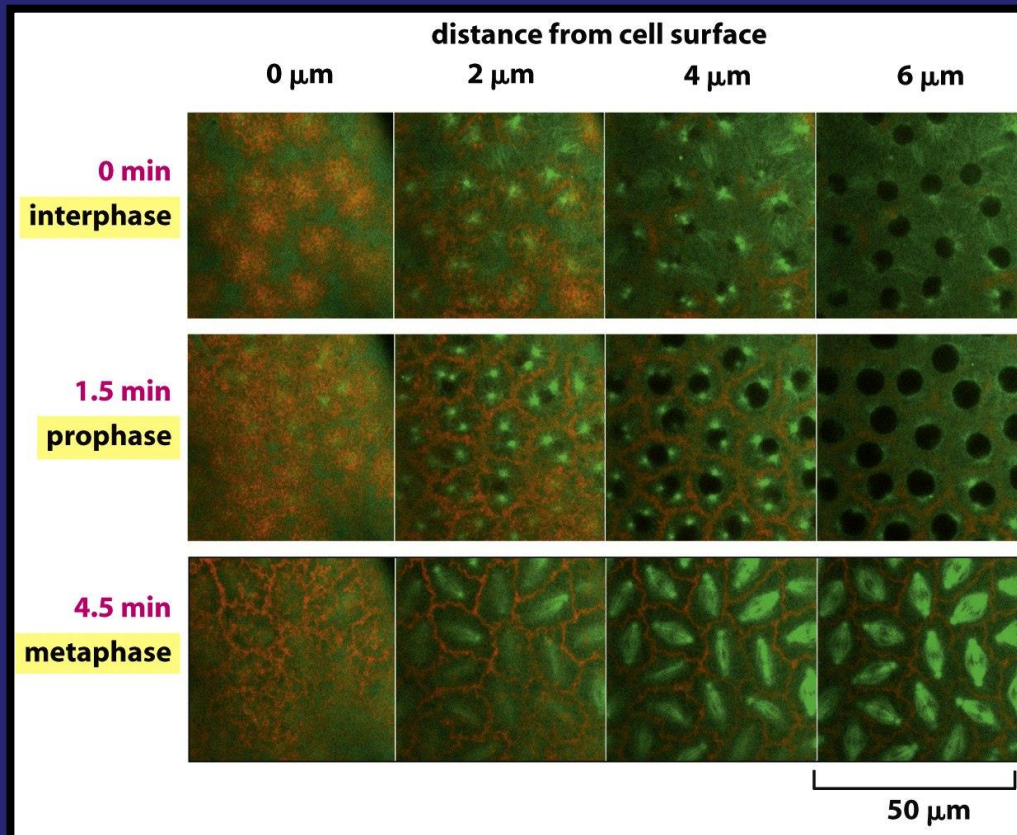


Pohybující se fibroblast s vyznačeným polarizovaným dynamickým aktinovým cytoskeletem (červeně). Polarizace je podporována mikrotubuly cytoskeletu (zeleně). Chromozómy jsou vyznačeny hnědě.



# Rychlé změny cytoskeletu

Rychlé změny ve struktuře cytoskeletu pozorované během vývoje časného embrya *Drosophila*



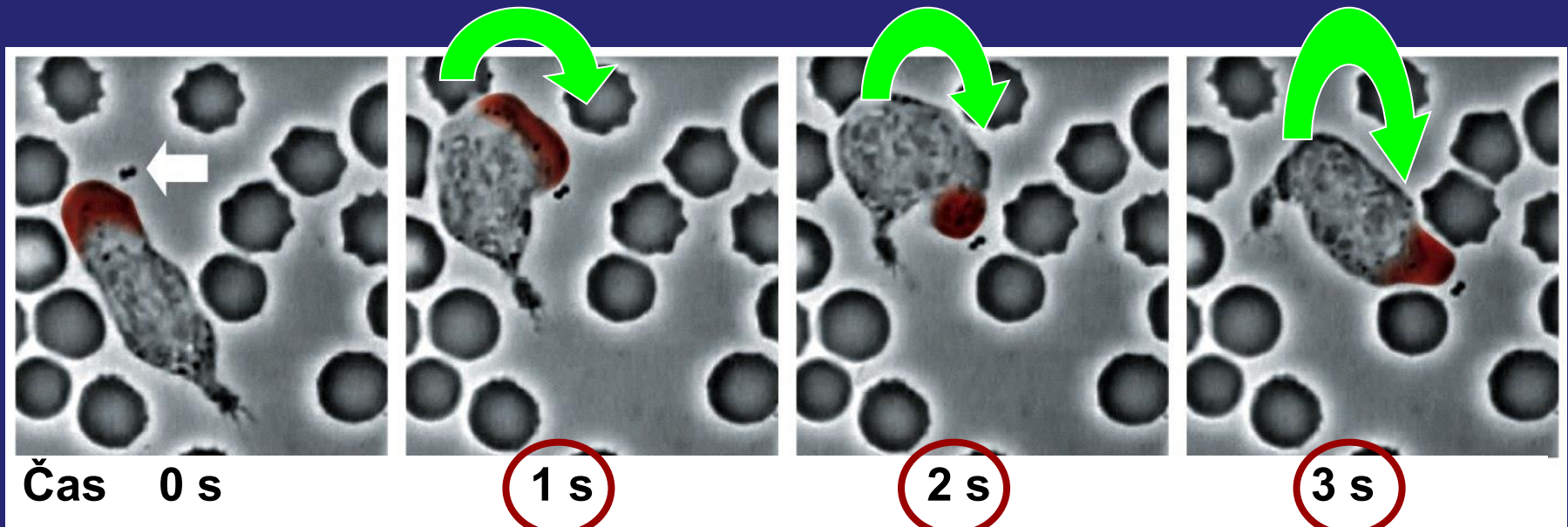
**Aktinová  
filamenta  
(červeně)**

**Mikrotubuly  
(zeleně)**

# Neutrofil pronásledující bakterie

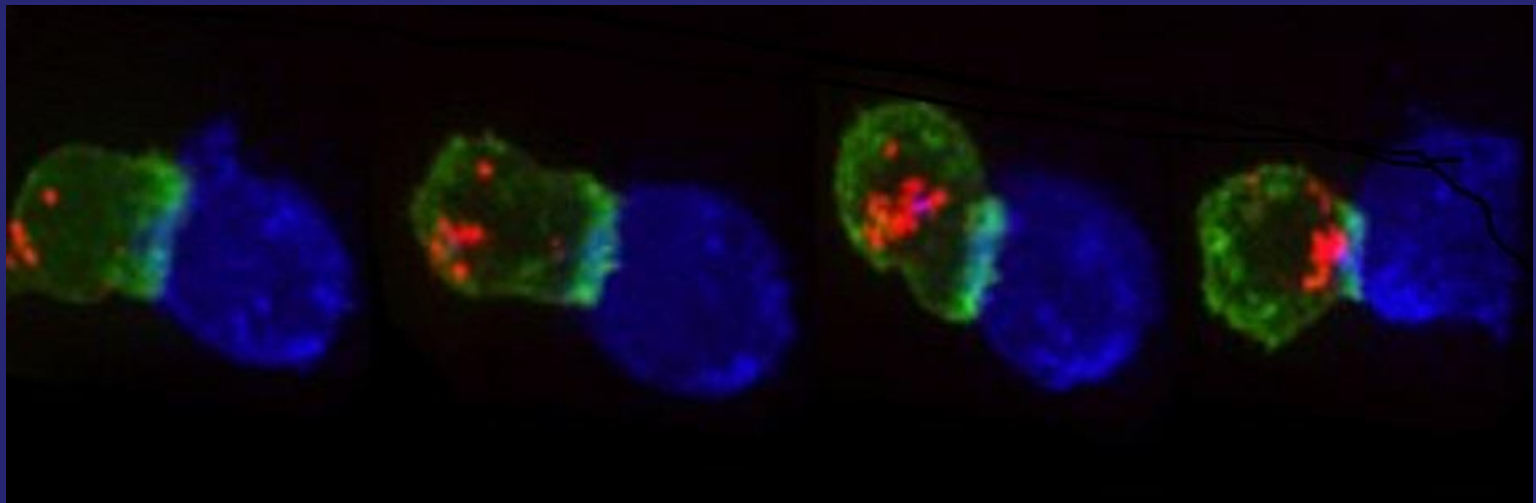
Shluk bakterií (bílá šipka) je pohlcován neutrofilem

Podle toho, jak se bakterie pohybuje, neutrofil rychle přestavuje svoji hustou **aktinovou síť** na předním okraji (**červeně**) tak, aby se mohl tlačit směrem k místu, kde se bakterie nacházejí



# *Likvidace nádorových buněk*

Sekreční granule cytotoxické T-buňky připravující smrtelnou dávku jedu (červeně). Aktinová vlákna (zeleně) je přesunují na frontovou linii, místa odkud zahájí útok na modře zbarvenou rakovinu



# *Cytoskelet tvoří také stabilní struktury*

- Stabilní struktury jsou typické pro takové buňky, které dosáhly **stabilní, diferencované** morfologie
- Typickým příkladem jsou **neurony** nebo **buňky epitelů**

Svazky aktinových vláken musí udržovat stabilní organizaci po celý život živočicha, zůstávají jednotlivá vlákna pozoruhodně dynamická, neustále se přeměňují a nahrazují průměrně každých 48 hodin

# ***Cytoskelet je zodpovědný za buněčnou polaritu***

Polarizace je druhou vlastností cytoskeletu vedle vytváření stabilních specializovaných povrchových buněčných struktur

**Polarizace umožňuje buňkách odlišit, co je**

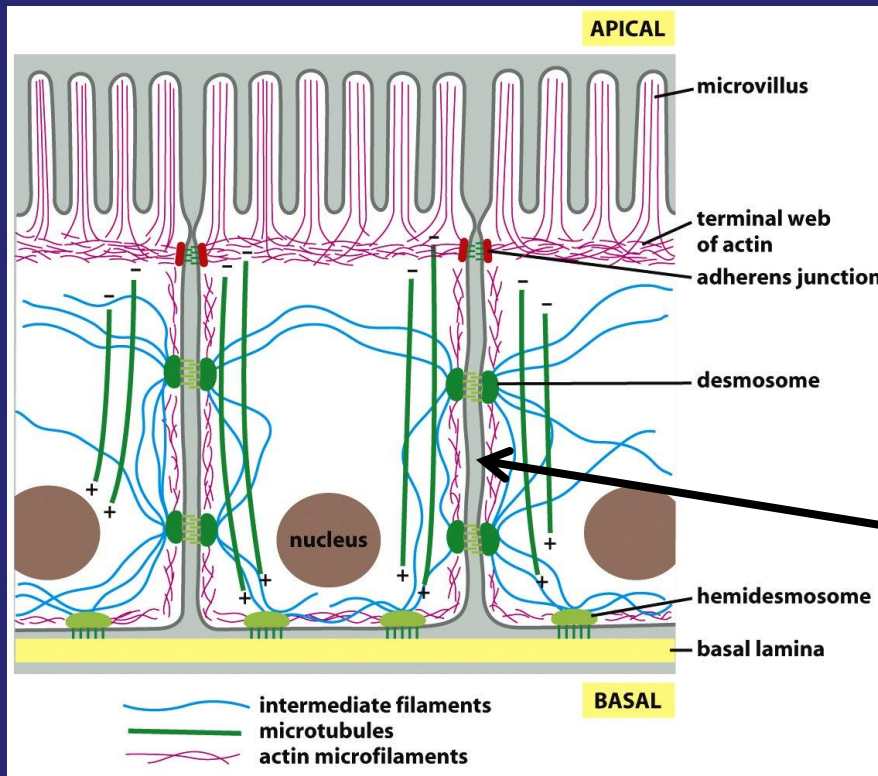
- **nahoře a dole**
- **vpředu a vzadu**

**Polarizované buňky epitelu udržují funkce mezi**

- **Apikální části povrchu = přijímá potravu**
- **Bazolaterálním povrchem = přenáší potravu přes plasmatickou membránu do krevního řečiště**



# Cytoskelet v polarizovaném epitelu



V apikální části se vytvářejí řasinky, které zvyšují buněčný povrch (tvořený aktinovými filamenti, červeně)

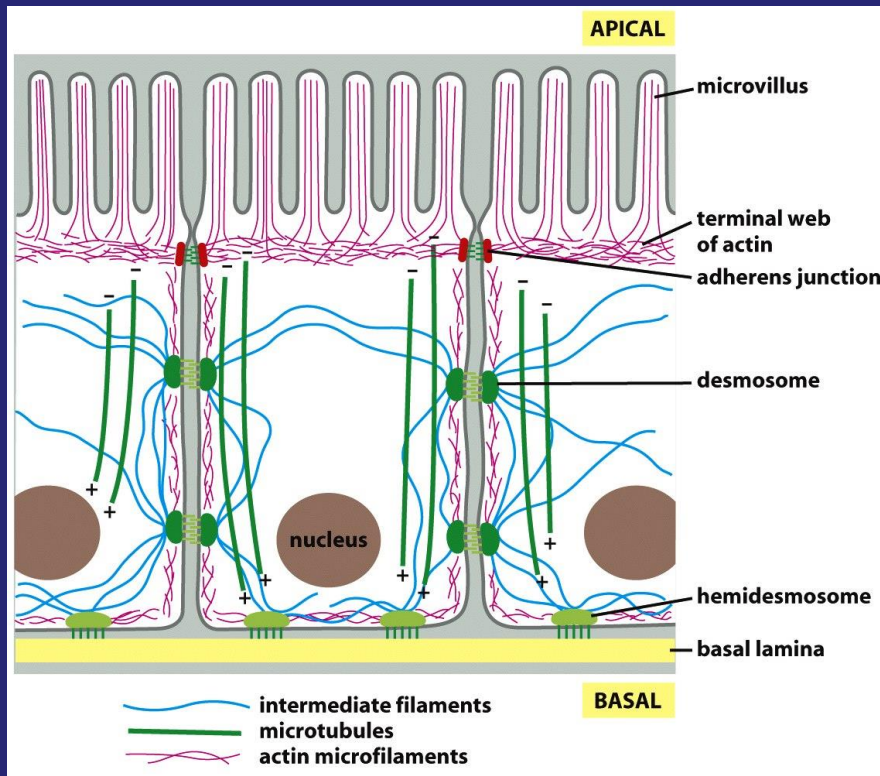
Zespodu se k řasinkách připojují aktinová filamenta vytvářející mezibuněčné spoje

Střední filamenta (modře) jsou napojena na další struktury

Všechny složky cytoskeletu kooperují a vytvářejí charakteristické tvary specializovaných buněk



# Cytoskelet v polarizovaném epitelu



V apikální části se vytvářejí řasinky, které zvyšují buněčný povrch (tvořený aktinovými filamenti, červeně)

Zespodu se k řasinkách připojují aktinová filamenta vytvářející mezibuněčné spoje

Střední filamenta (modře) jsou napojena na další struktury

Mikrotubuly (zeleně) poskytují globální koordinační systém

# ***Funkce cytoskeletu***

## **Strukturní opora eukaryotické buňky**

- **mechanickou pevnost buňky**
- **tvár buňky**
- **vnitřní uspořádání organel**

**Zajišťuje pohyb buňky**

**Reguluje pohyb buňky**

# *Kde se nachází cytoskelet?*

- 1) Složky cytoskeletu se nacházejí v buňce **volně**
- 2) Tvoří ale i **organely** nebo alespoň jejich části
- 3) Podílí se i na stavbě eukaryotického **bičíku**, centriol, dělicího vřeténka aj.
- 4) Mikrotubuly volně **prostupují celou buňku**
- 5) Mikrofilamenta tvoří **hustou síť těsně pod povrchem**

# ***Hlavní typy struktur v cytoskeletu***

## **Mikrotubuly**

(určují pozici membránou ohraničených organel a řídí transport v jádře)

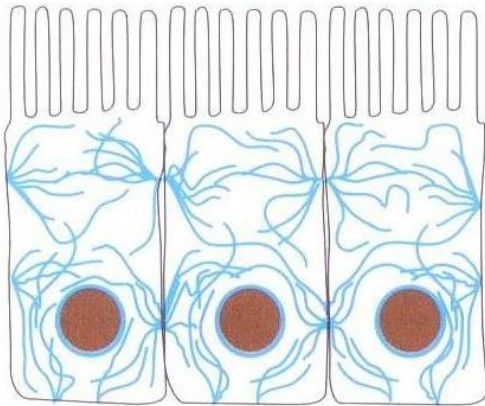
## **Mikrofilamenta, aktinová filamenta**

(určují tvar buněčných povrchů a pohyb buňky)

## **Střední, intermediární filamenta**

(poskytují mechanickou oporu)

# Topografie filament

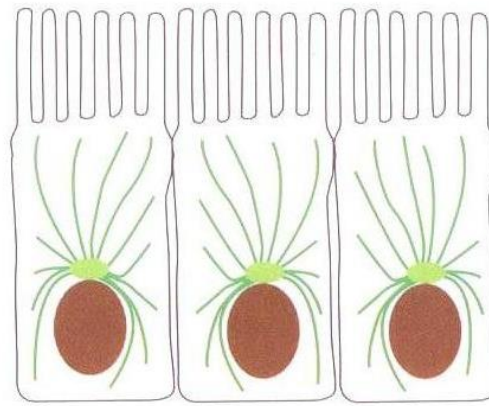


25 μm

střední filamenta

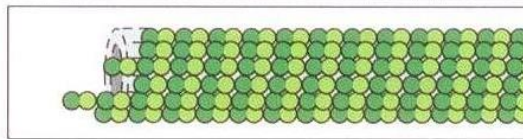


25 nm

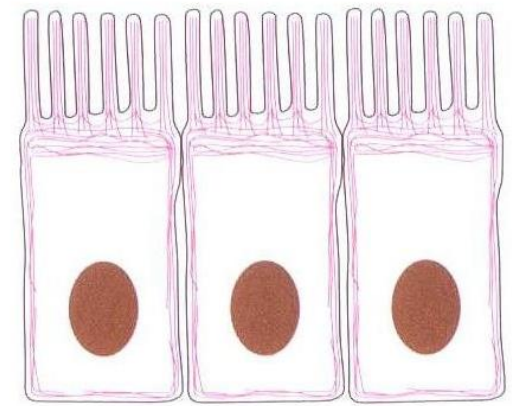


25 μm

mikrotubuly

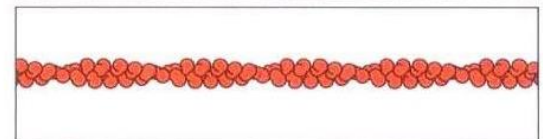


25 nm



25 μm

mikrofilamenta



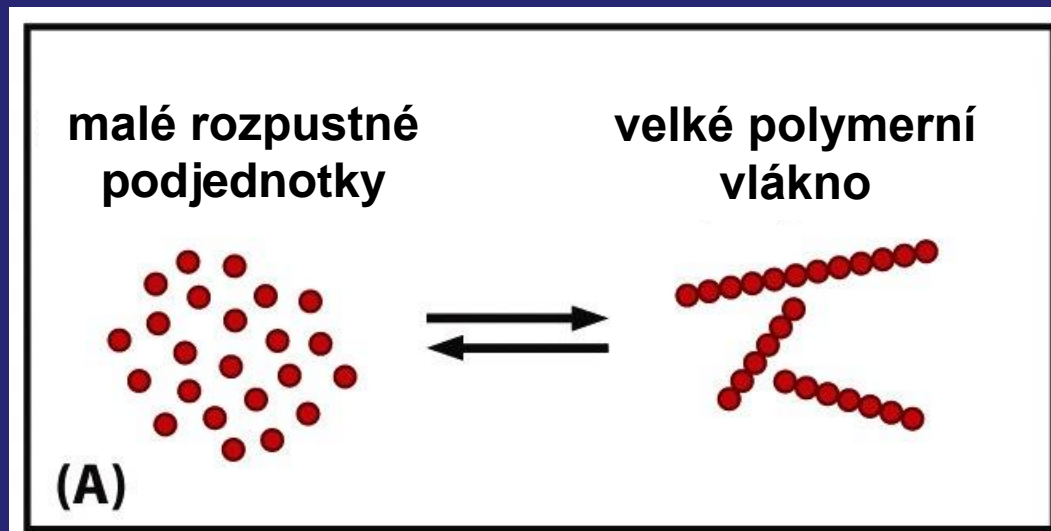
25 nm

***Struktury cytoskeletu se vytvářejí  
z menších proteinových podjednotek***



# Cytoskelet během změn

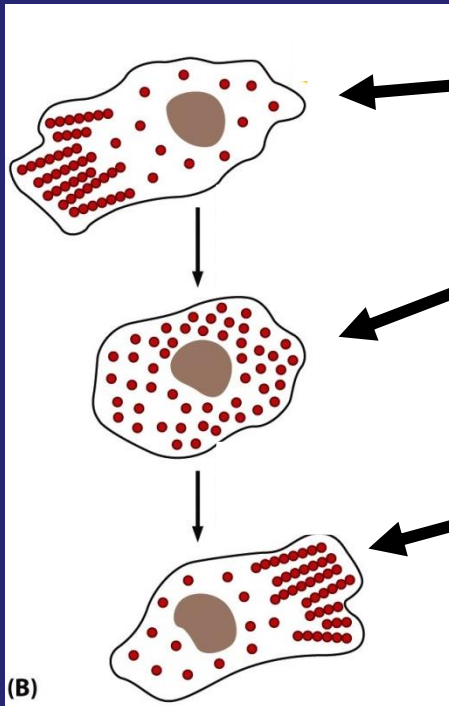
Vytváření proteinových vláken z mnohem menších podjednotek umožňuje regulovat skládání a rozpad vláken za účelem přestavby cytoskeletu



Vytváření filament z malých proteinových podjednotek

# Reorganizace cytoskeletu

Rychlé reorganizace cytoskeletu v buňce jako odpověď na vnější signál



Signál, např. zdroj potravy

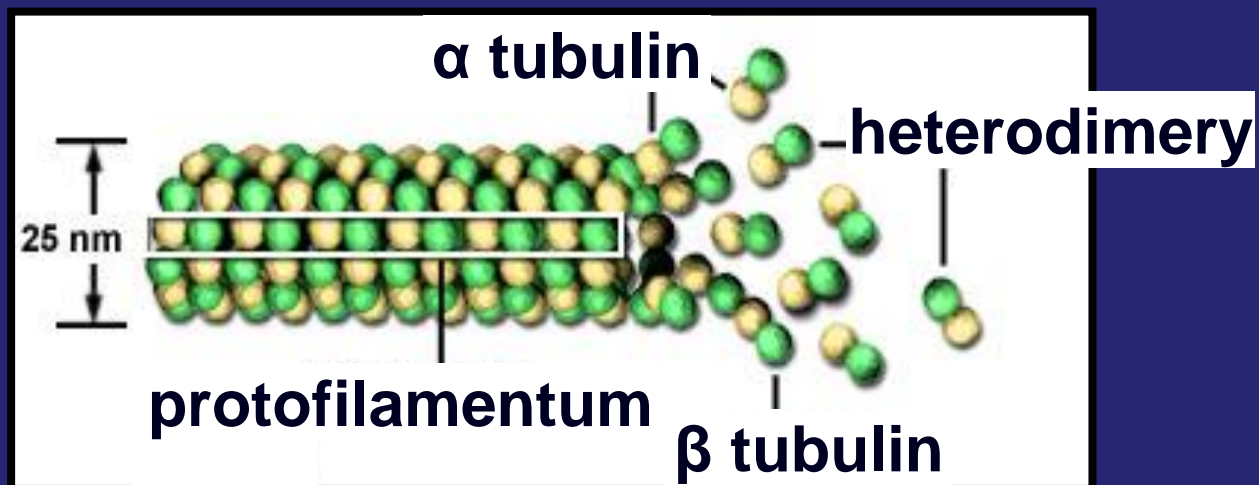
Rozložení filament a rychlá difúze podjednotek

Znovusložení filament v novém místě

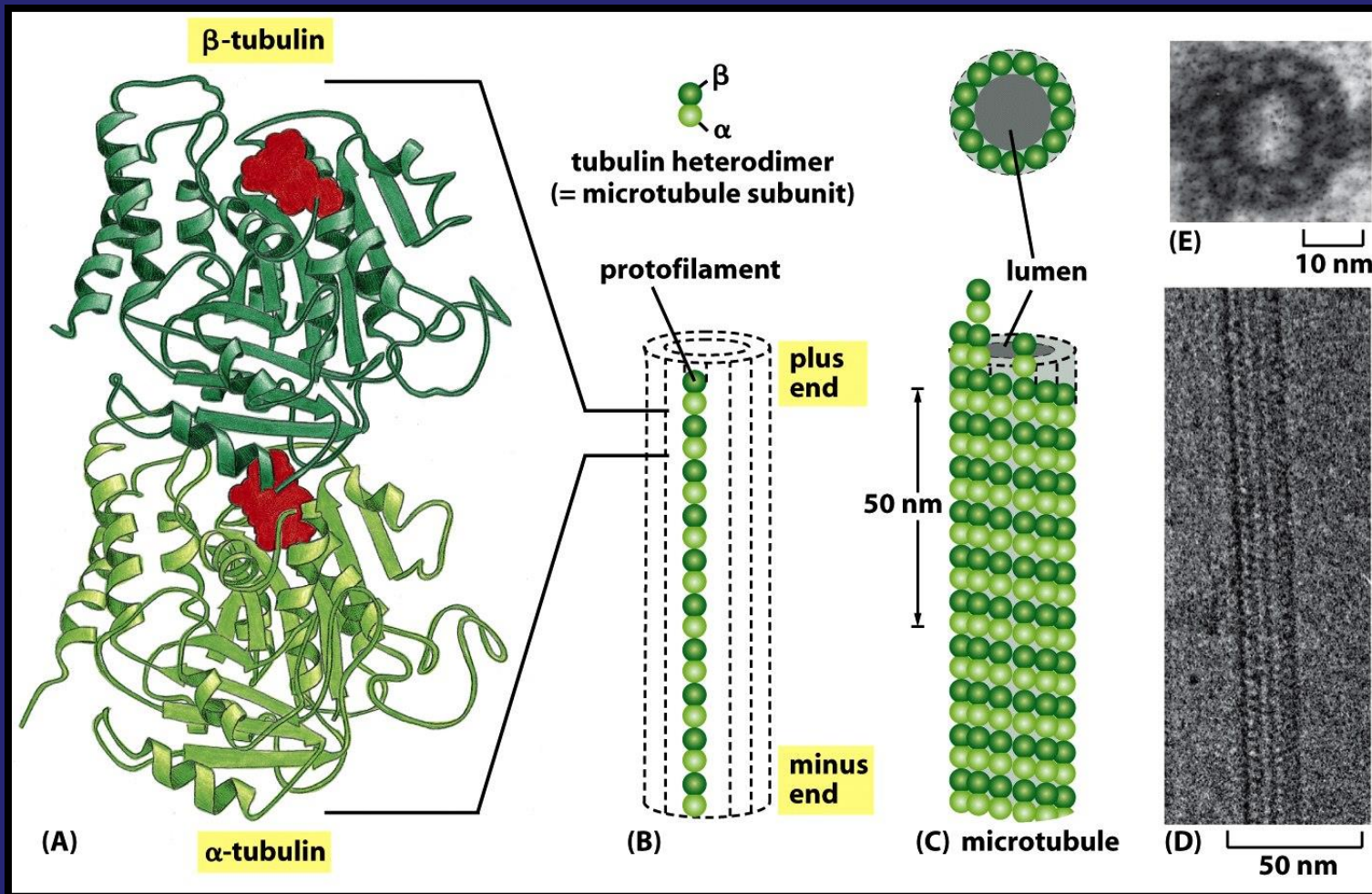
# Mikrotubuly

- dlouhé duté trubičky o průměru 25 nm tvořené proteinem tubulinem  $\alpha$  a  $\beta$
- tubulin  $\alpha$  a  $\beta$  se skládá do heterodimerů, z nichž se skládají protofilamenta
- v každé trubičce je 13 souběžných protofilament

## Helikální struktura mikrotubulu



# Struktura mikrotubulů

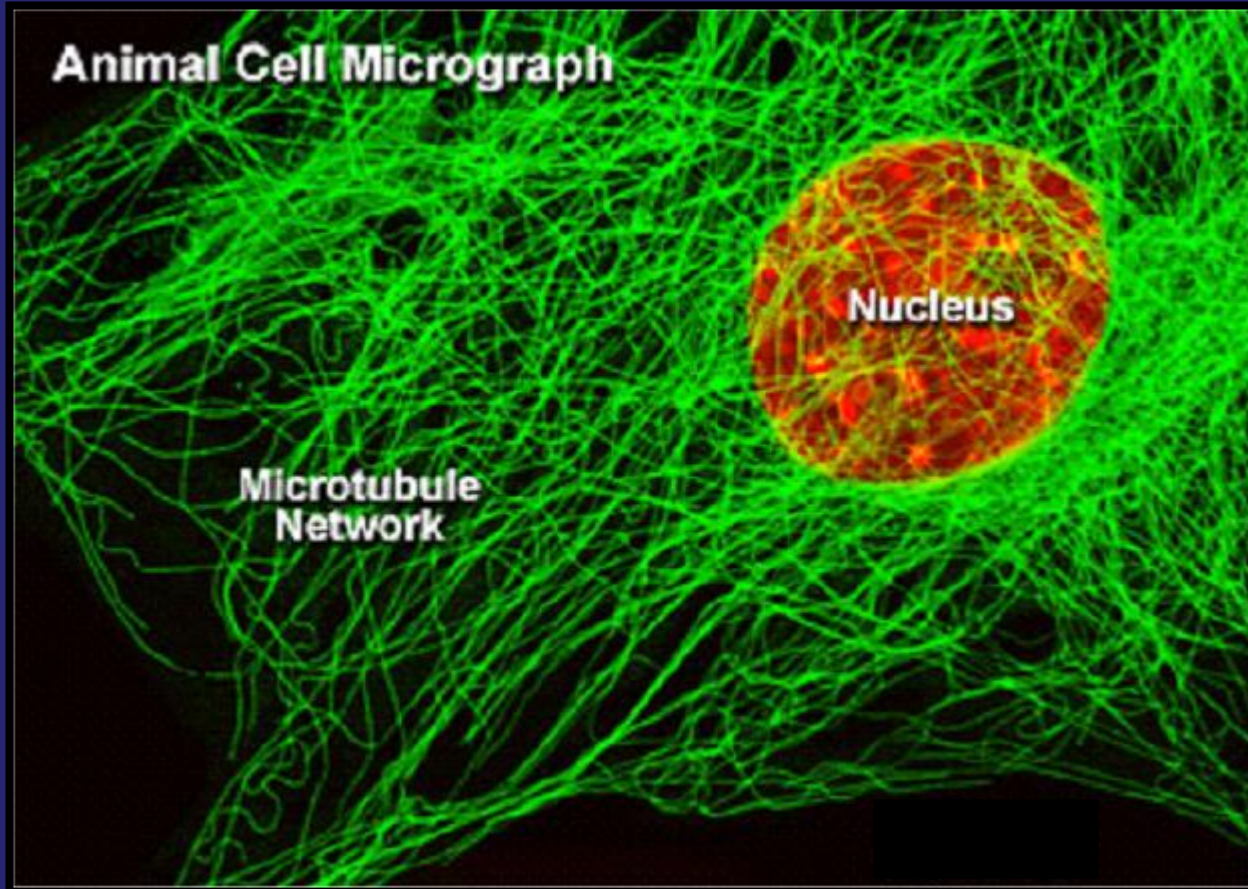


# ***Funkce mikrotubulů***

- mikrotubuly jsou dlouhé a rovné
- mají jeden z konců připojený k tzv. centrozómu
- orientovány do centrozómu (mínus konec), vybíhají k buněčnému povrchu (plus konec)
- zajišťují pohyb organel a určují polohu membránou obklopených organel
- řídí jaderný transport
- napomáhají formování tvaru buňky a slouží jako podpůrná kostra buňky

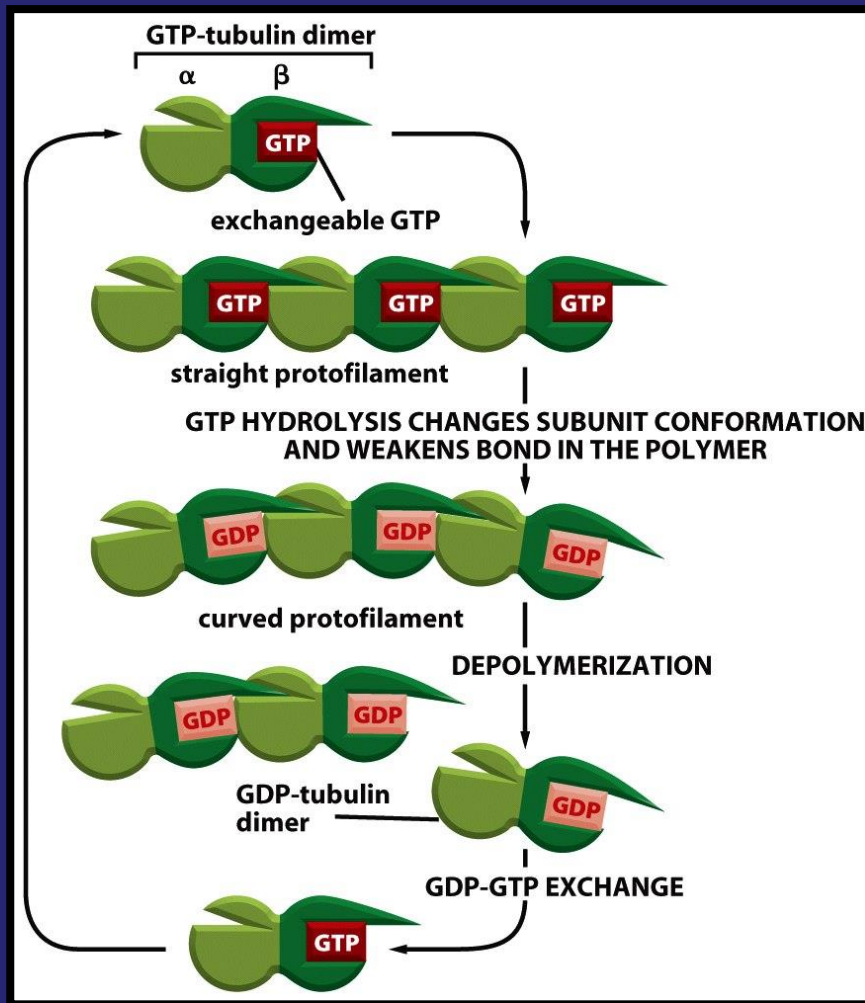


# *Mikroskopie mikrotubulů*





# Růst a rozpad mikrotubulů



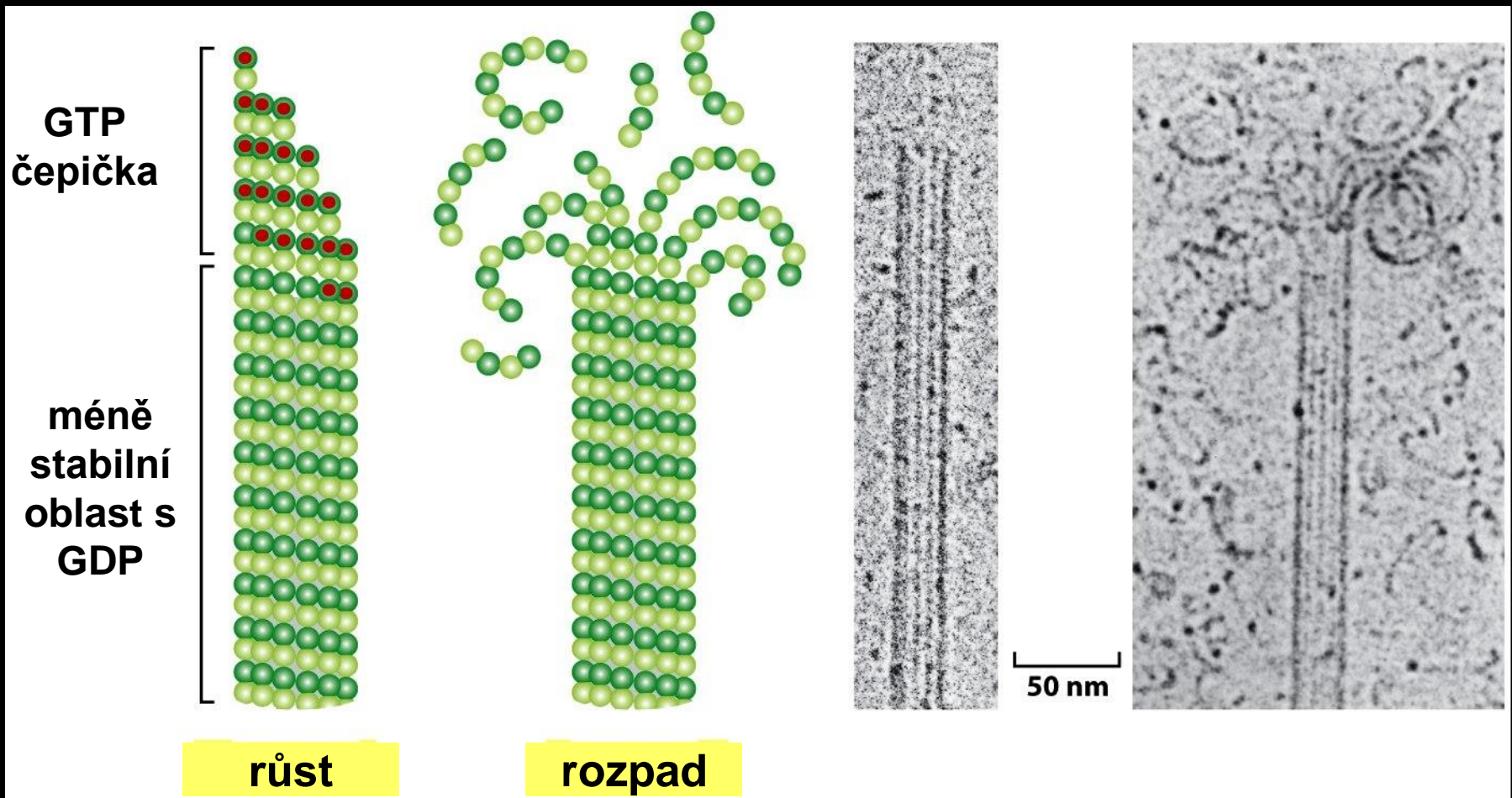
Dimery nesoucí GTP se váží pevněji

Hydrolýza GTP v oblasti čepičky snižuje stabilitu polymeru

Dimery s GDP mohou být rychle uvolňovány a mikrotubulus se zkracuje

# *Růst a rozpad mikrotubulů*

Je regulován hydrolyzou GTP



# Mikrotubuly a kolchicin

➤ **kolchicin** je tzv. „mitotický jed“

1) **Inhibuje polymeraci** tubulinových protomerů

→ brání vzniku mitotického vřeténka

→ zastavuje mitózu v metafázi

2) Zastavuje buněčné pohyby → zpomaluje pohyb lymfocytů → léčení akutních záchvatů dny

➤ **Podobně působí** vinblastin a vinkristin z *Vinca rosea* (barvínek)

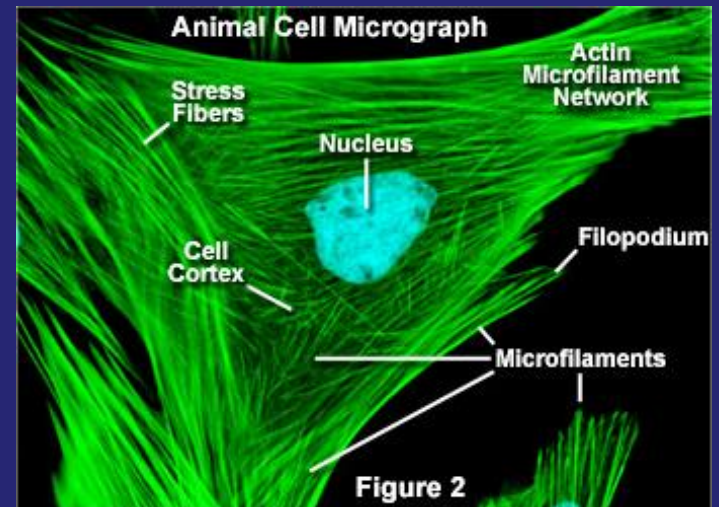
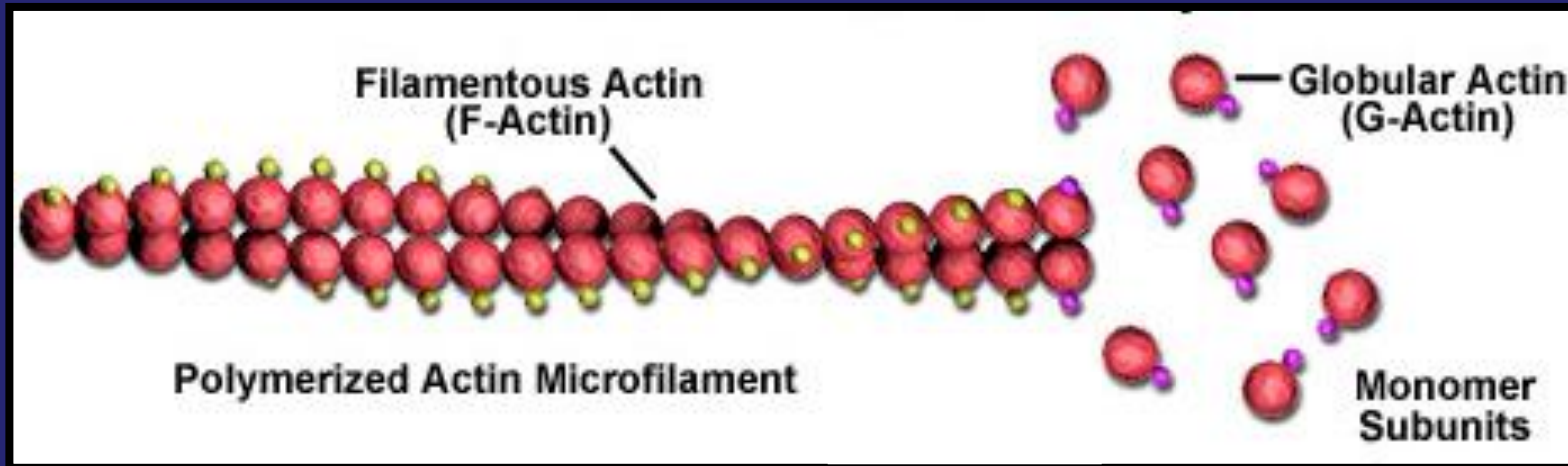
➤ **Naproti tomu** taxany z *Taxus brefifolia* (tis) urychlují tvorbu tubulů, stabilizují je a brání depolymerizaci



# *Aktinová filamenta*

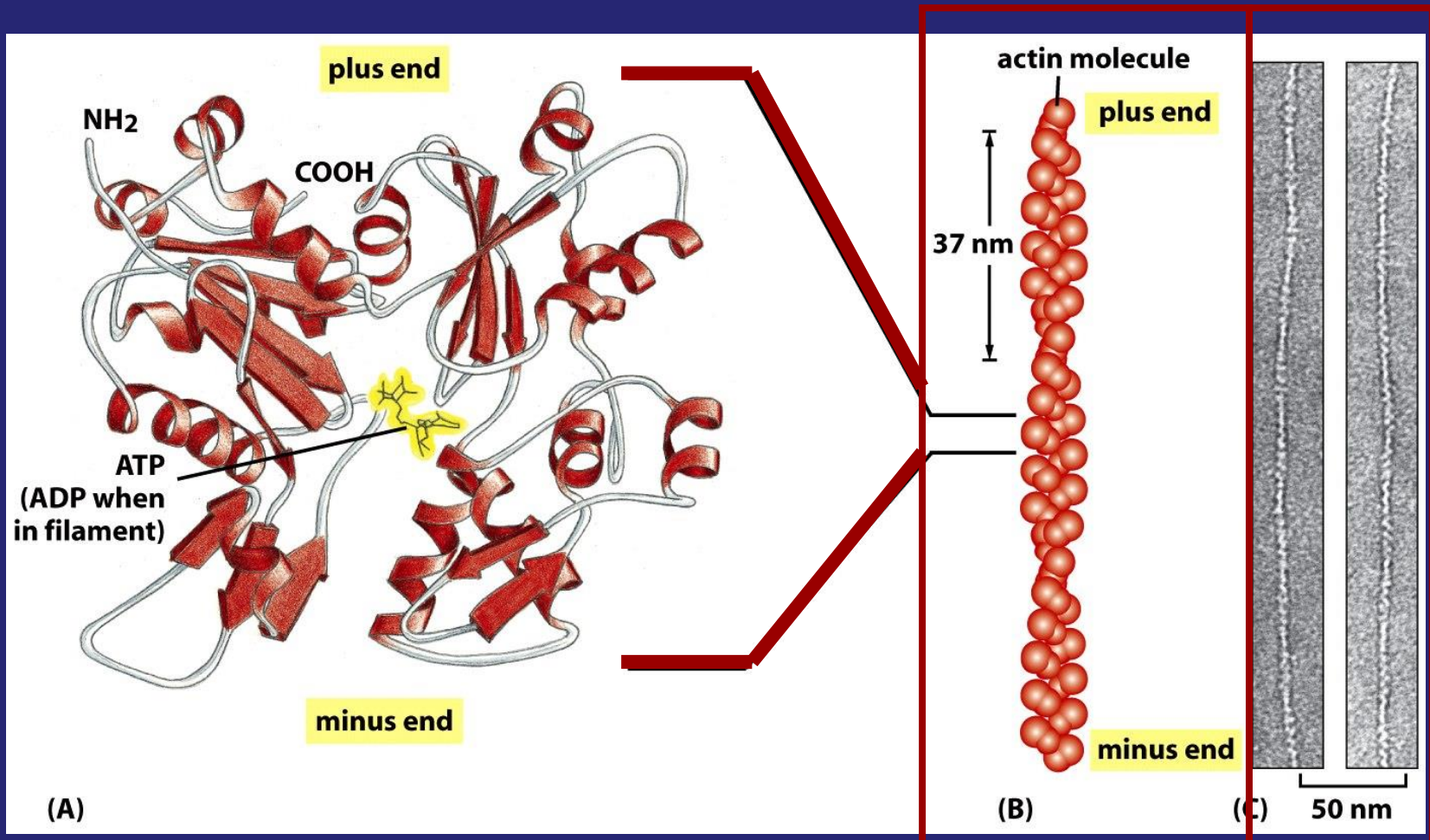
- vlákna o průměru cca 7-9 nm
- tvořené aktinem
  
- mechanicky podpůrná funkce
- spolu s myosinem tvoří kontraktilní aparát
- zodpovědný za mnoho typů vnitrobuněčných pohybů
  - proudění cytoplasmy
  - tvorba buněčných výběžků a invaginací buňky
- na vyšší úrovni organizace jsou aktin a myosin složky svalových buněk

# Struktura aktinových filament





# Struktura aktinových filament



(A)

(B)

(C)

50 nm



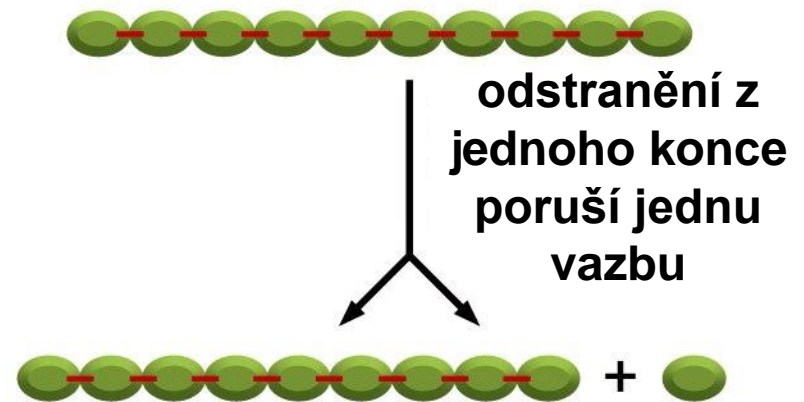
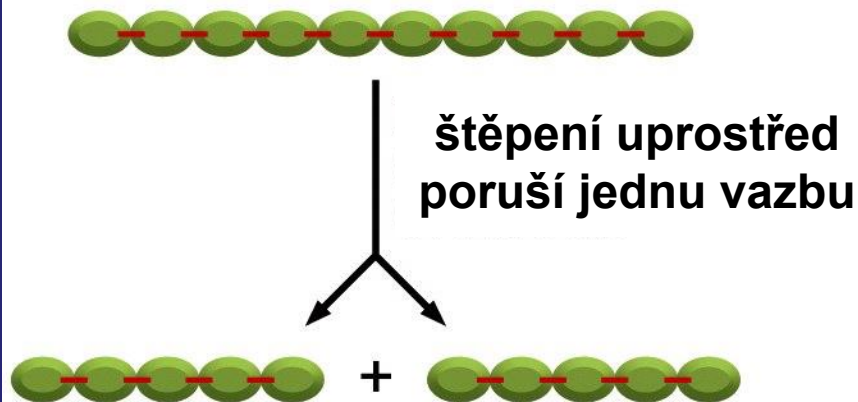
# *Filamenta odolávají teplotnímu poškození*

Jednotlivé protofilamentum je teplotně  
nestabilní



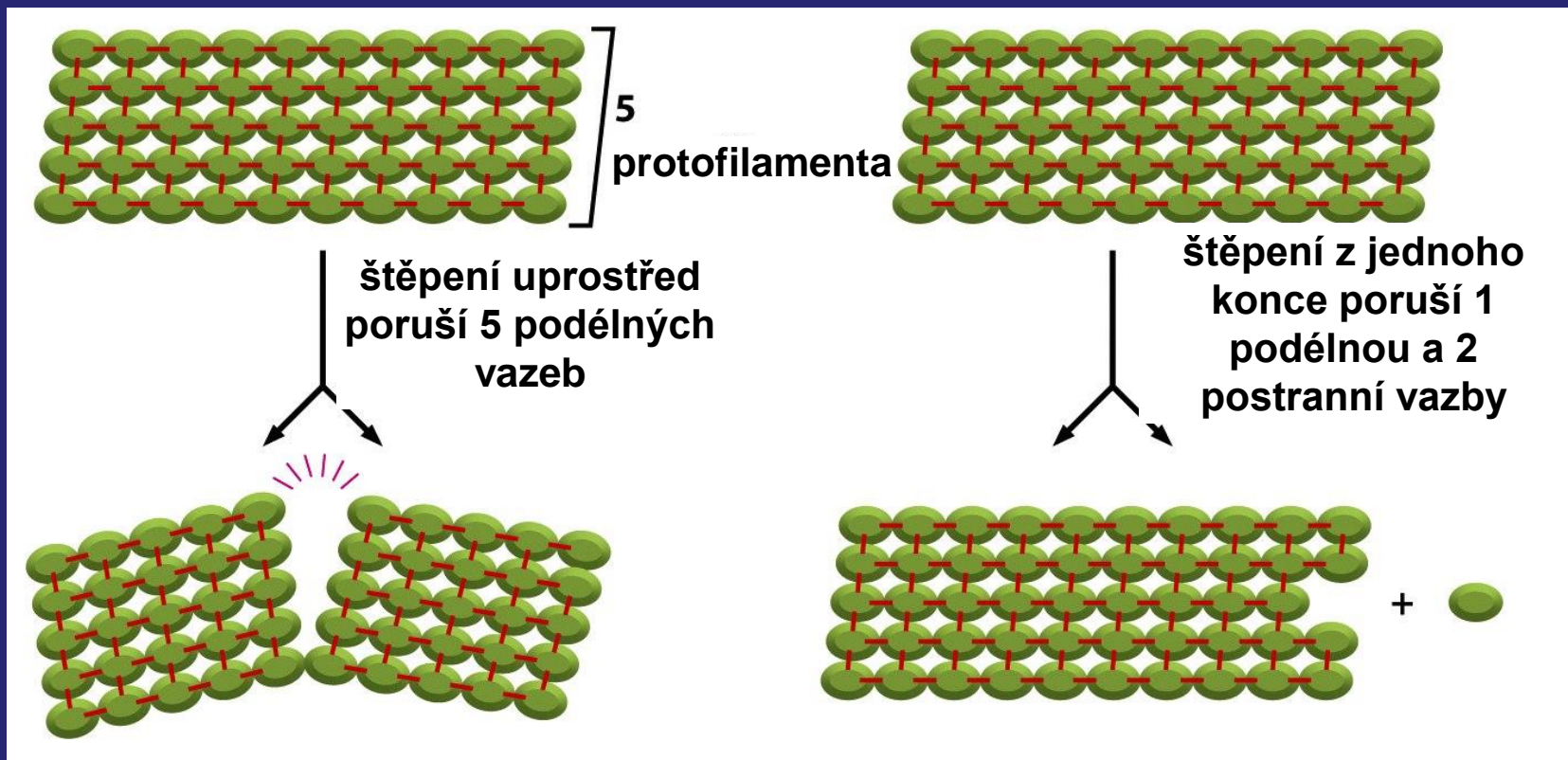
# *Filamenta odolávají teplotnímu poškození*

Jednotlivé protofilamentum je teplotně nestabilní



# Filamenta odolávají teplotnímu poškození

Více protofilament pohromadě je teplotně stabilní





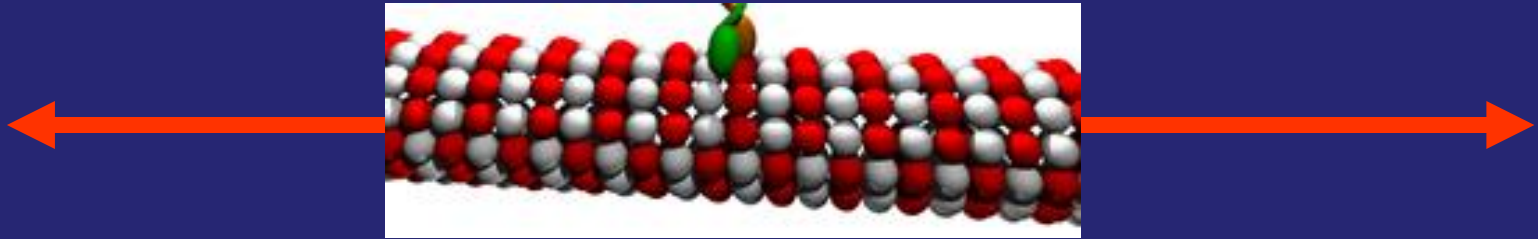
# ***Molekulární motory***

- **transportují náklady podél mikrotubulů**
- **řídí pohyb organel, váčků**
- **funkce spojena s hydrolýzou ATP**
- **kinesiny a cytoplasmatické dyneiny**

# *Kineziny a dineiny*

## Kinezin

Pohyb směrem k plus konci mikrotubulu, tj. od centrosomu k periferii buňky

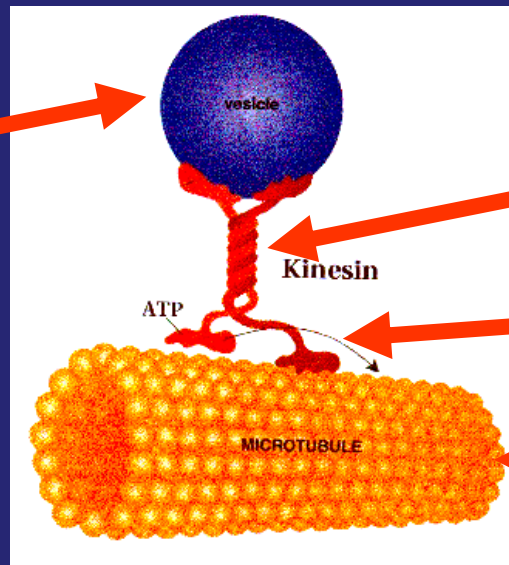


## Dinein

Pohyb směrem k minus mikrotubulu, tj. k centrozómu

# *Kineziny*

organela



Kinezin (dimer)

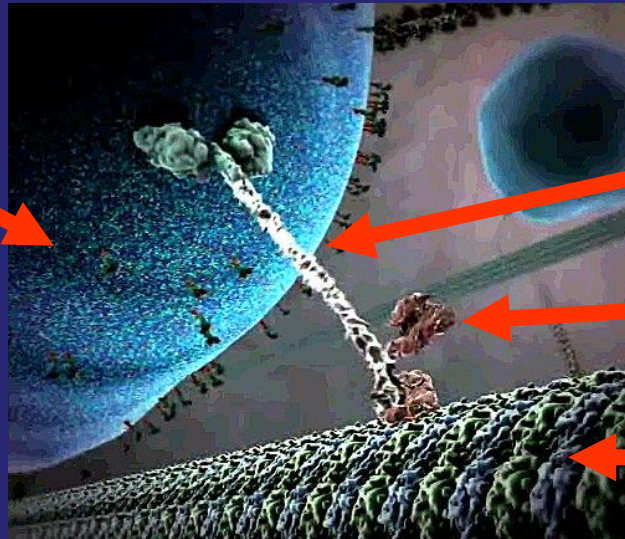
ATP

mikrotubulus



# *Kineziny*

organela

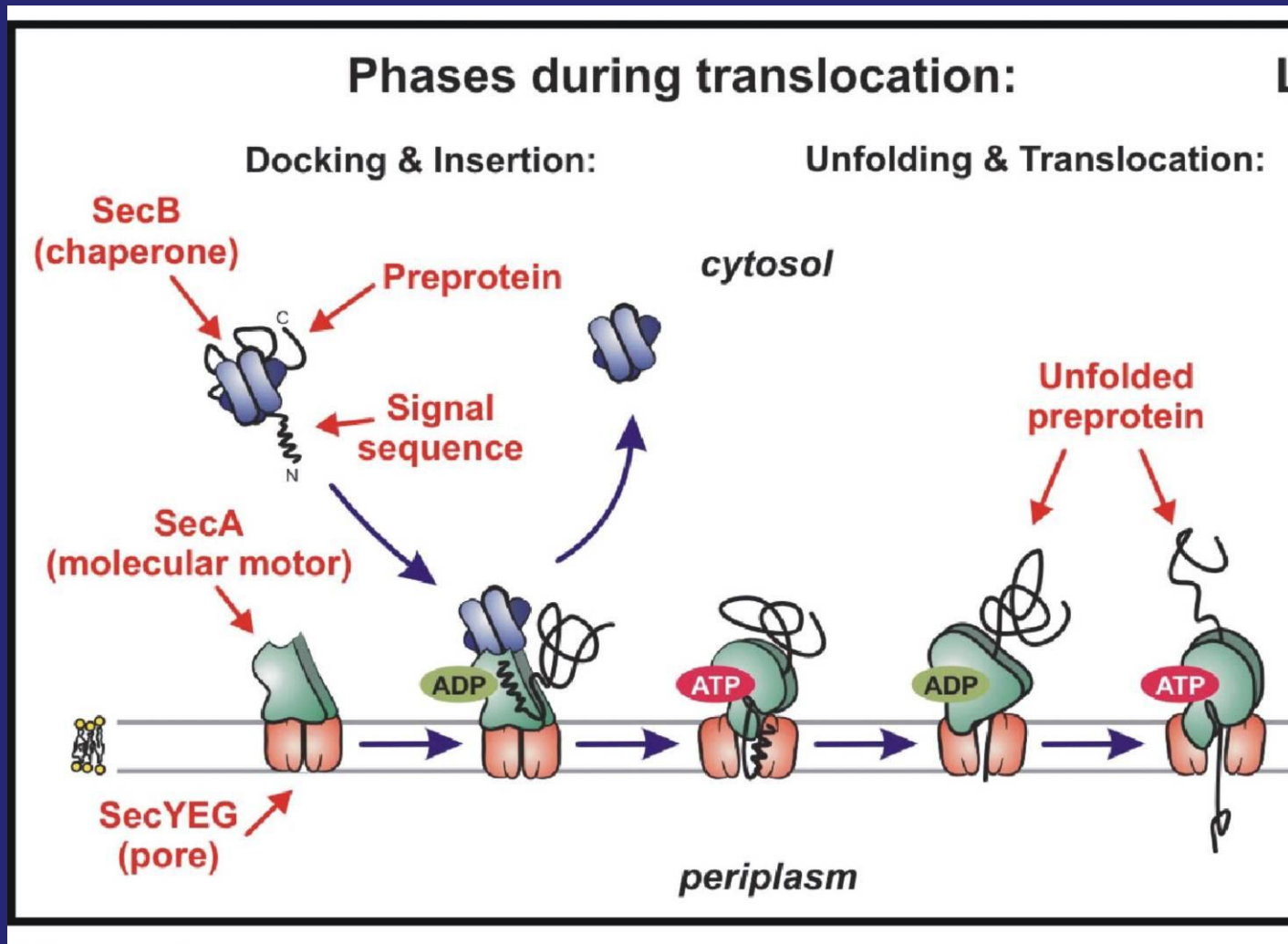


Kinezin (dimer)

ATP

mikrotubulus

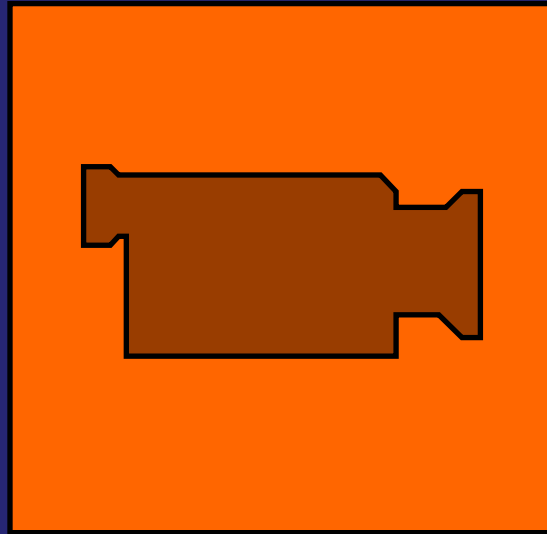
# Fáze translokace



# *Animace*

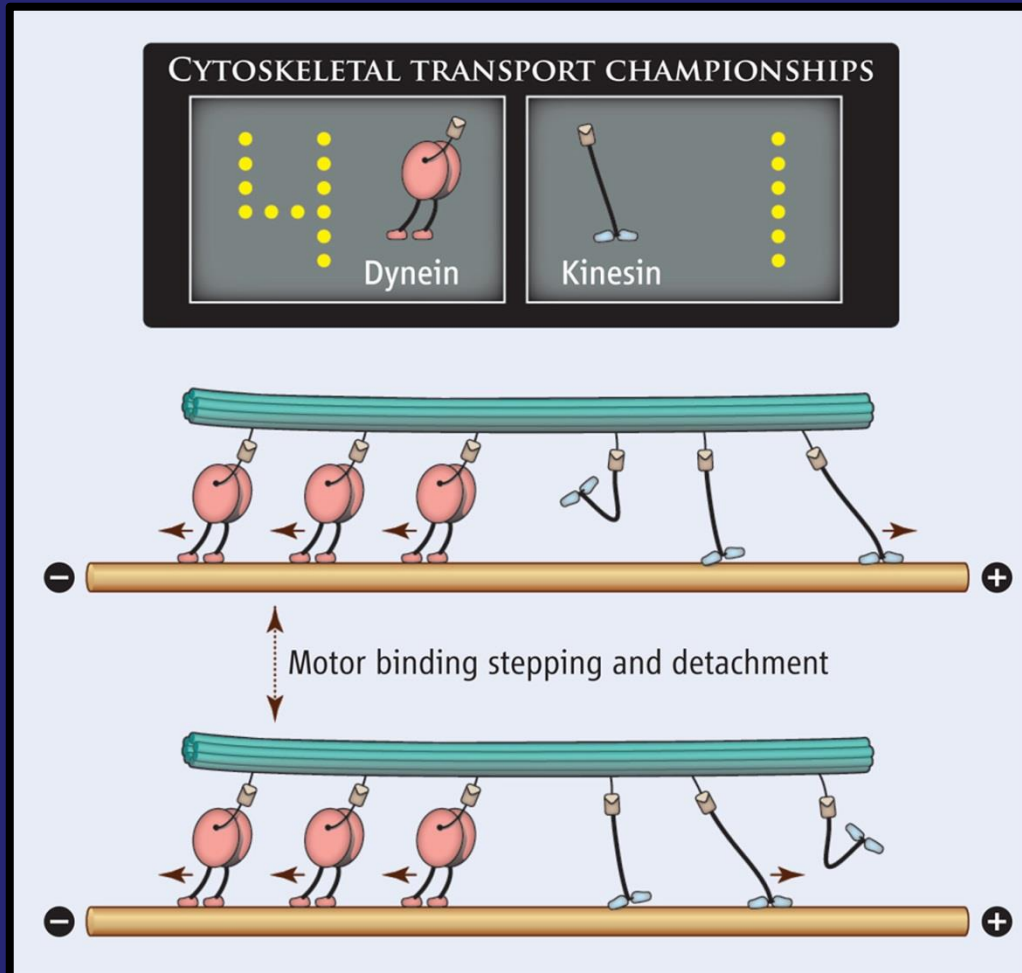
## Kinesin Explanation

<http://www.youtube.com/watch?v=ILxIBB9ZBj4>



Kinesin.avi + 16.7 Kinesin.mov

# Kdo je silnější?



- Jeden kinezin (tygr) působí silou 7pN, jeden dynein (lev) jen 6 pN
- Kineziny ale svoji činnost koordinují méně než dyneiny, respektive dyneiny mají vyšší afinitu k cílovým sekvencím

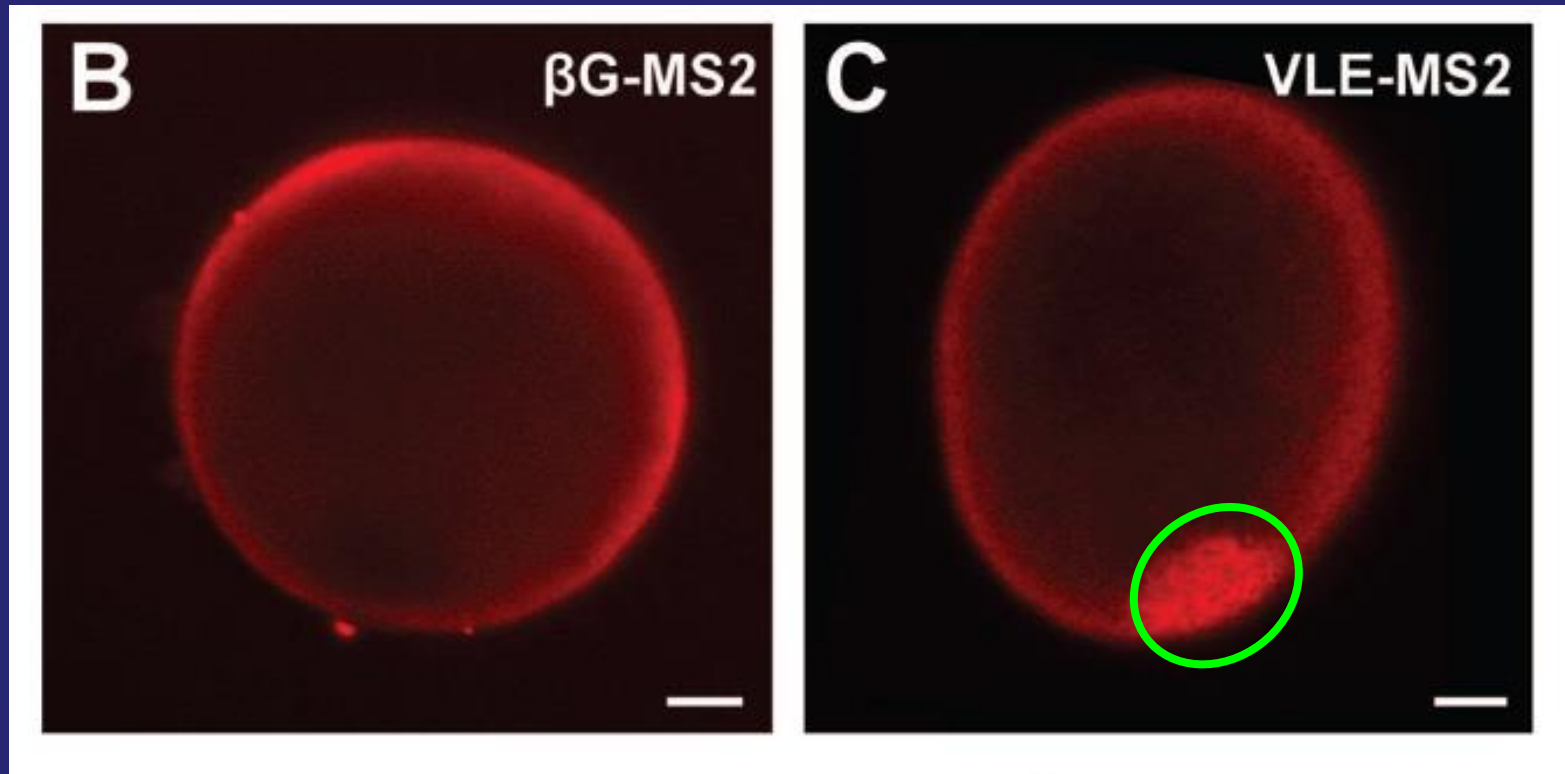
Diehl, M.R. (2012): Science 338: 626-627

# *Dyneiny a kineziny transportují RNA*

- Lokalizace RNA v cytoplasmě rozhoduje o polarizaci buňky a následně i tkání, protože ...
  - ... RNA reguluje genovou expresi, a to znamená, že ...
  - ... nerovnoměrná distribuce RNA vede k prostorově závislé expresi genů
- Dyneiny zajišťují jednosměrný transport RNA k cílovým oblastem
- Kineziny transportují RNA oběma směry v blízkosti místa účinku
- Studováno na oocytech žab

Gagnon et al. (2013): Directional Transport Is Mediated by a Dynein-Dependent Step in an RNA Localization Pathway, PLOS Biology 11(4): e1001551

# *Ukázka lokalizace regulační RNA*



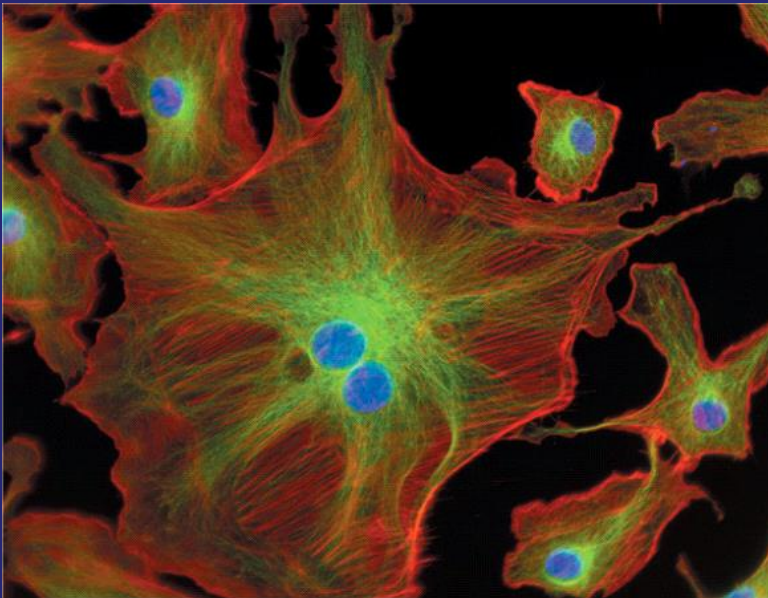
rovnoměrná exprese  
 $\beta$ -globinu

nerovnoměrná exprese  
VLE RNA



# *Střední filamenta*

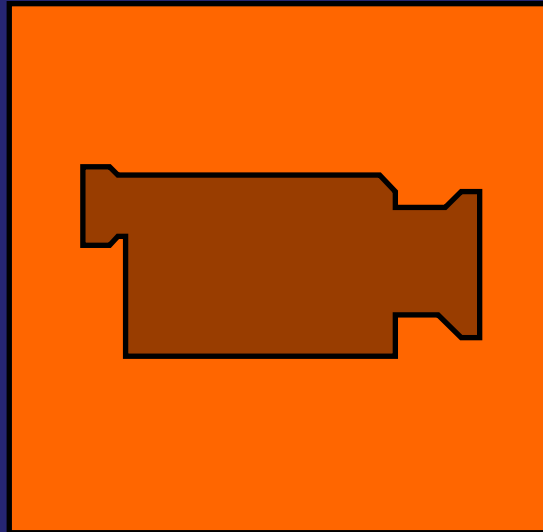
- vlákna lanového charakteru o průměru 10-15 nm
- tvořená multimery fibrilárních proteinů
- velikost a složení odlišná u různých typů buněk i mezi stejnými typy buněk u různých organismů



- přítomny v místech, kde buňka odolává tlaku (axony nervových buněk, kožní buňky)
- cytoplasmatická síť obklopující jádro
- pod jadernou membránou – zesílení jádra

# *Animace*

## Struktura středních filament



# ***Typy středních filament***

**Dělí se podle základní proteinové podjednotky**

- 1) Vismetin – pojivové tkáně, svaly, fibroblasty a epitely (cévy)**
- 2) Desmin – svalové buňky**
- 3) Neurofilamenta – axony neuronů**
- 4) Gliové fibrilární kyselé proteiny – gliové buňky**
- 5) Keratiny (cytokeratiny) – epitely, 30 podtypů (vlasy, peří, drápy, kůže, střevní výstelka)**

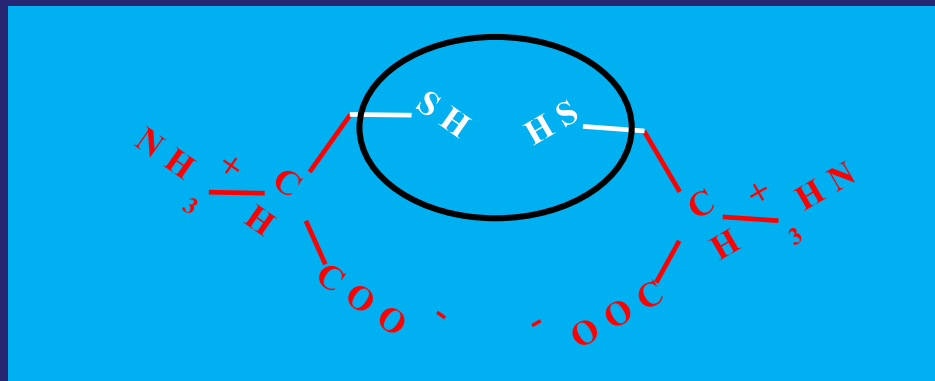
# *Střední filamenta a travičství*

## Příběh arsenu



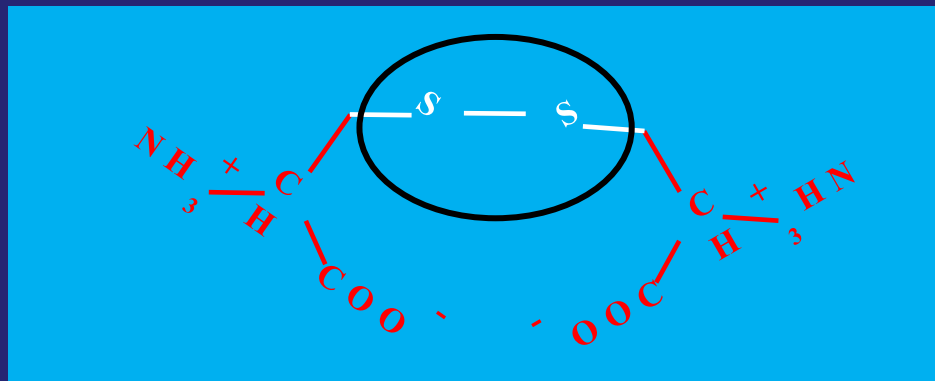
# Keratin, cytoskelet a arsen I

- Keratin je nerozpustný ve vodě a má vláknitou strukturu, jednotlivé monomery mívají délku 400–644 aminokyselin, ale větví se do polymerů o velkých rozměrech.
- Konečný tvar molekuly - terciární strukturu - zajišťují disulfidické můstky. Lidské vlasy obsahují přibližně 14% cysteinů.



# Keratin, cytoskelet a arsen I

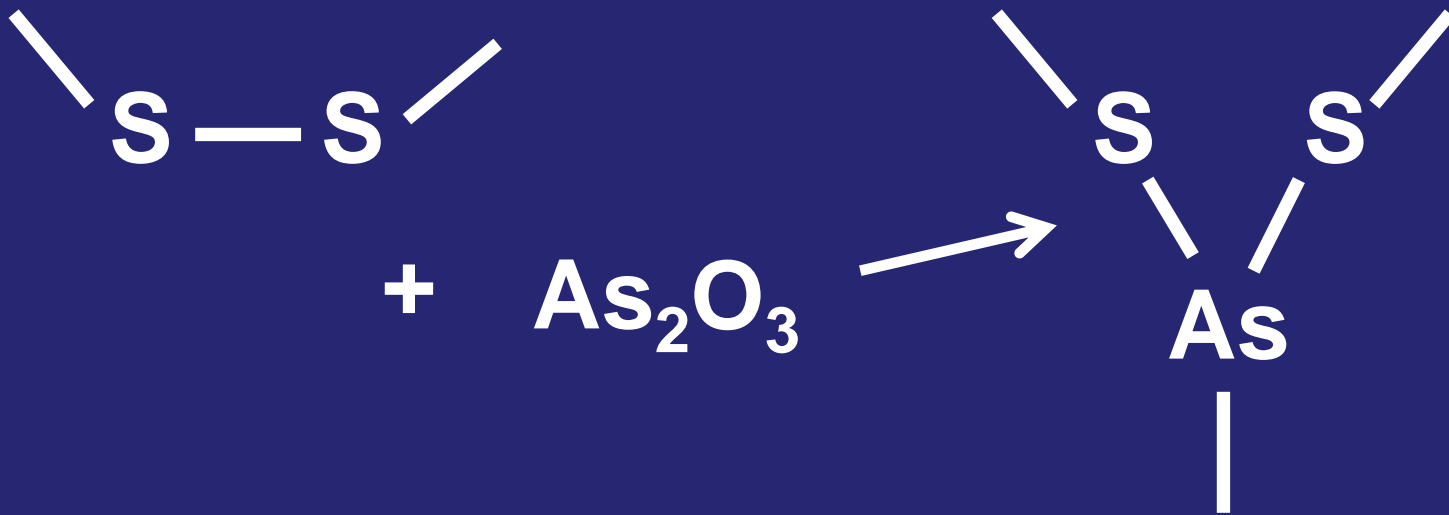
- Keratin je nerozpustný ve vodě a má vláknitou strukturu, jednotlivé monomery mívají délku 400–644 aminokyselin, ale větví se do polymerů o velkých rozměrech.
- Konečný tvar molekuly - terciární strukturu - zajišťují disulfidické můstky. Lidské vlasy obsahují přibližně 14% cysteinů.





# *Keratin, cytoskelet a arsen II*

- Arsen  $\text{As}^{\text{III}}$  má vysokou afinitu k atomům síry a váže se pevně k disulfidickým můstkům



- Arsen ve vlasech nebo nehtech můžeme nalézt i po velmi dlouhé době

# *Dynamika arsenu ve vlasech*

- Oxid arsenitý  $\text{As}_2\text{O}_3$  při otravě cirkuluje v krvi a ukládá se ve vlasovém folikulu, odkud je „vychytáván“ vlasovým folikulem
- Jak se mění koncentrace  $\text{As}^{\text{III}}$  v krvi, mění se i jeho ukládání ve vlasech/nehtech
- Průměrná doba života vlasu činí 900 dní, tedy 2,5 roku; rychlost růstu vlasu je 1 cm/měsíc
- Rentgenově fluorescenční analýza umožňuje rozlišit méně než 1 mm
- Vývoj otravy lze sledovat s přesností na dny (kdy a kolik jedu bylo podáno)

**Znáte příklady  
travičských afér  
z historie?**



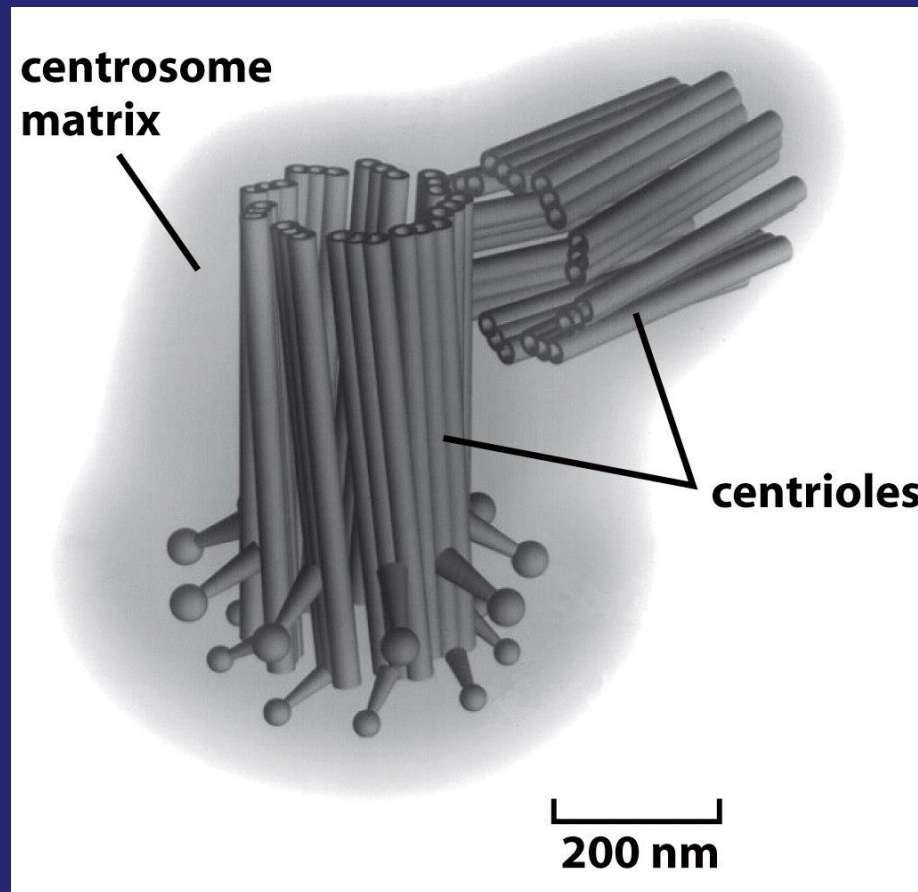
Více si přečtete v knize  
Petr Klusoň: Jedová  
stopa, Academia  
Praha, 2015





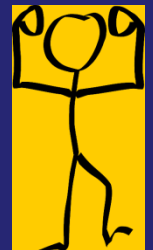


# *Centrozóm – dělicí (mitotické) tělísko*



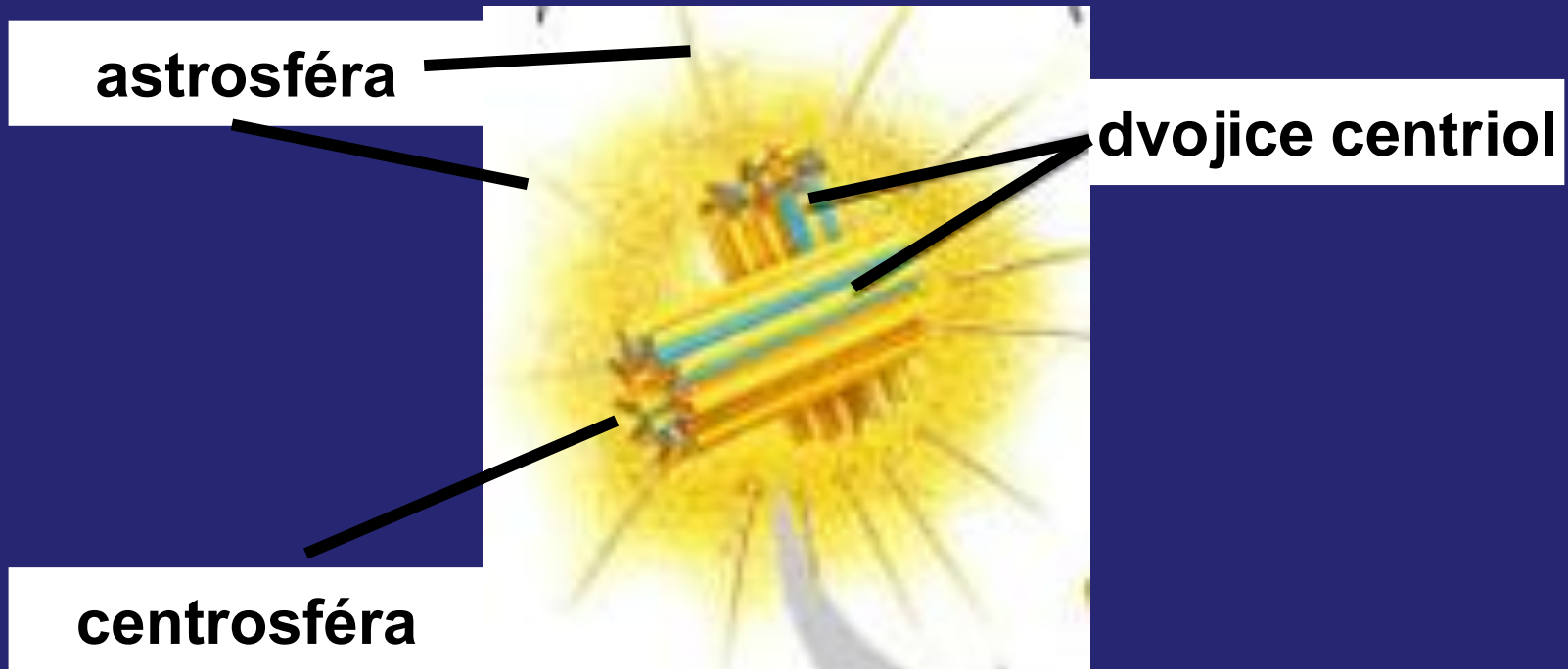
# Co je centrozóm

- **organela živočišných buněk a buněk nižších rostlin**
- **vyskytuje se v blízkosti jádra**
- **seskupení mikrotubulů a asociovaných proteinů**
- **účastní se separace chromozómů při dělení jádra**
- **podmiňuje orientaci chromozómů a pohyb jejich rozdělených částí k pólům dělicího vřeténka**
- **při zrání vaječné buňky zaniká**
- **do zygoty je centrozóm přenášen spermií**

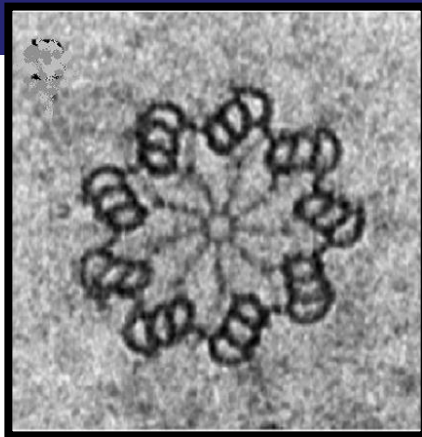


# ***Struktura centrozómu***

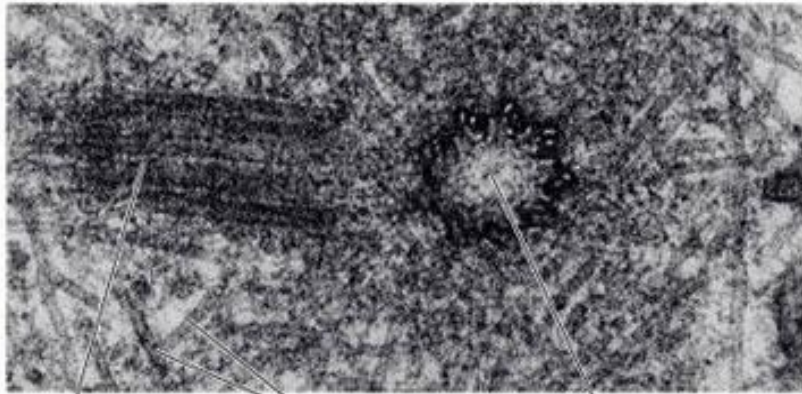
- **centriola** - středové tělísko
- **centrosféra** - hustá bezstrukturní síť kolem centrioly
- **astrosféra** - řídká vlákna cytoplazmy vybíhající z centrosféry



# Detaily struktury centrozómu



0.25  $\mu\text{m}$



Longitudinal section  
of centriole

Microtubules

Cross section  
of centriole

centrozóm

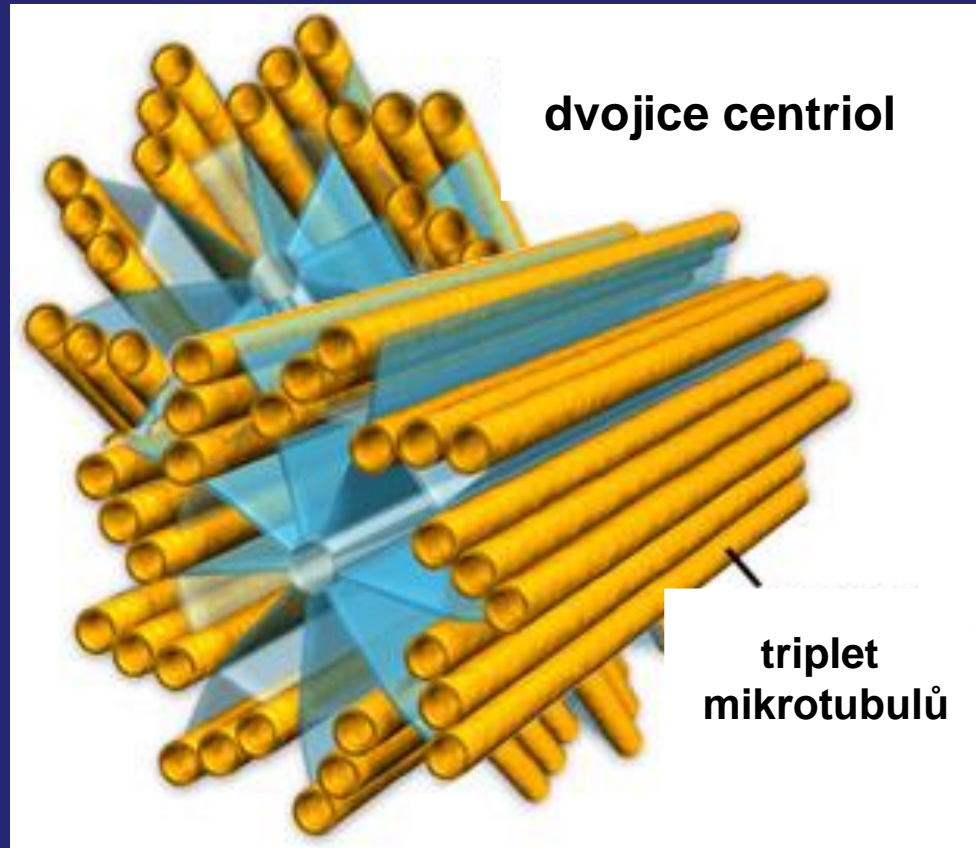
dvojice  
centriol

mikrotubuly

centrioly

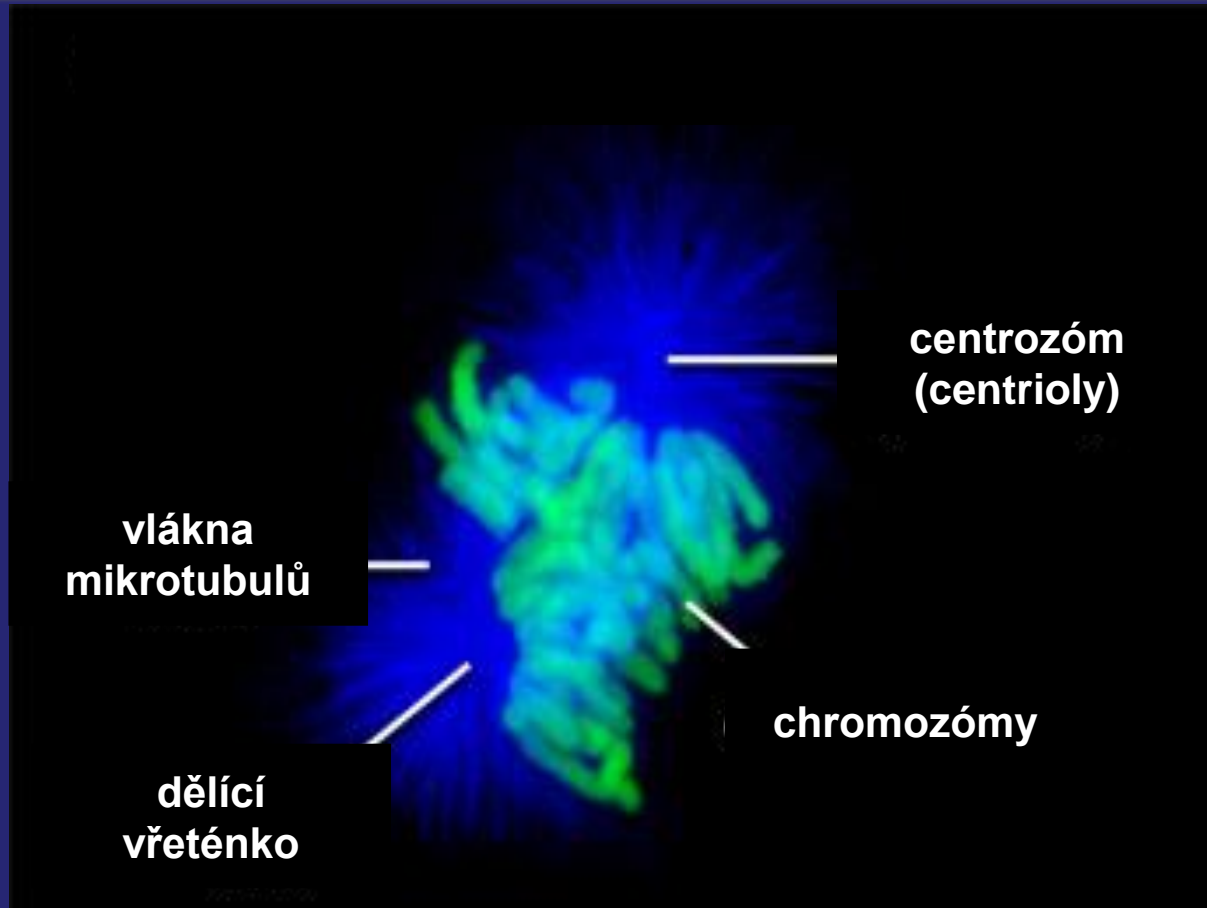
9 sad trojic mikrotubulů

# *Struktura centrioly*



**V každé centriole je 9 mikrotubulárních tripletů**

# *Centriola při mitóze*



**Další informace na**

[http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n9/slideshow/nrm0901\\_688a\\_F1.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n9/slideshow/nrm0901_688a_F1.html)



# ***Jsou centrioly nositeli informace?***

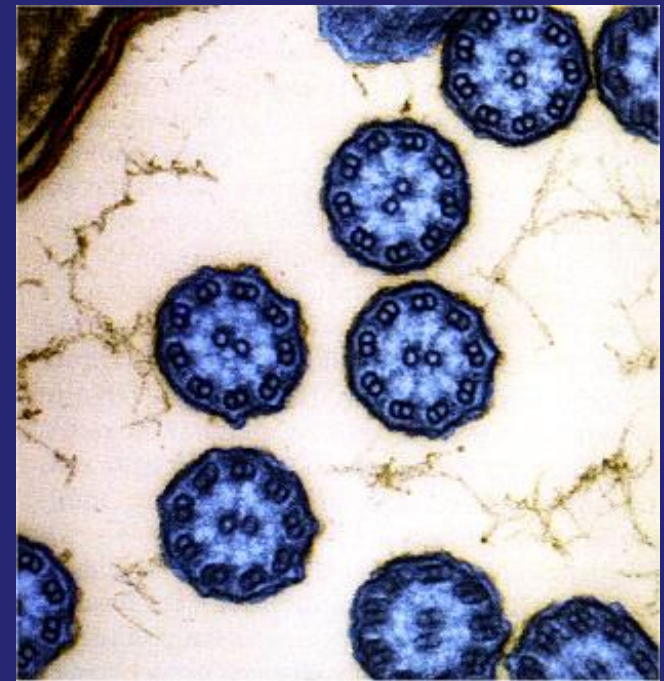
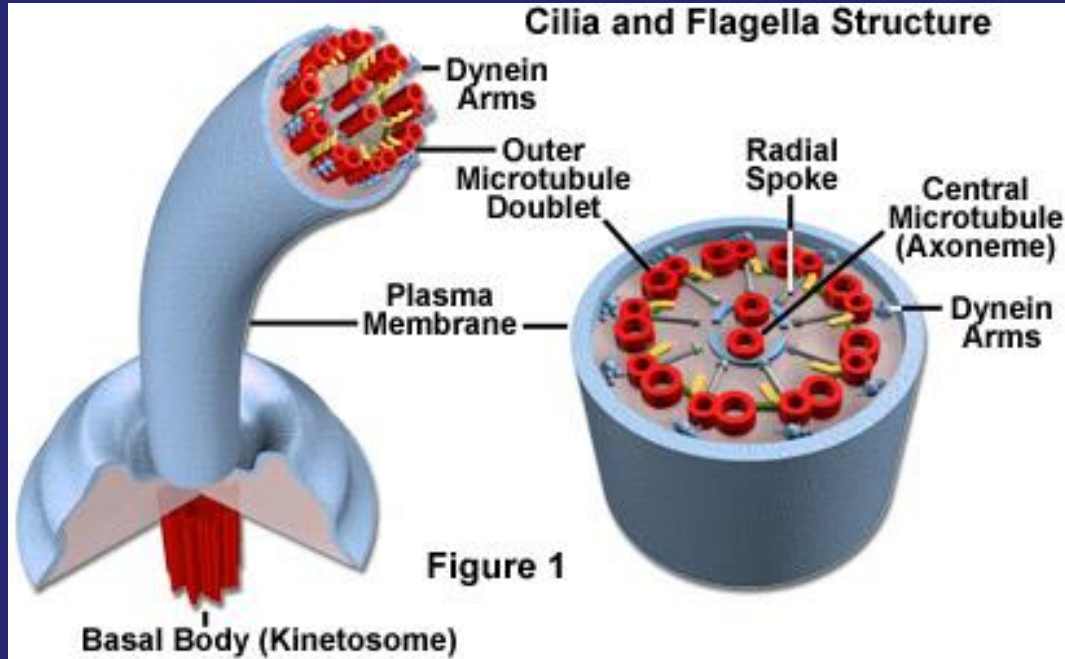
<http://www.osel.cz/8311-jsou-centrioly-nositelkami-informace.html>

Původní článek

**Balestra FR, von Tobel L, Gonczy P. Paternally contributed centrioles exhibit exceptional persistence in *C. elegans* embryos. Cell Research 24 April 2015. DOI: 10.1038/cr.2015.49**

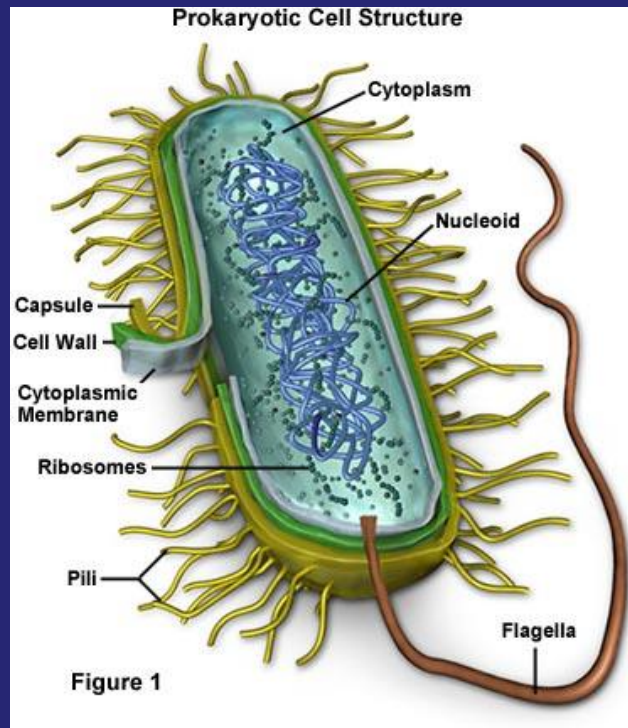


# *Bičík eukaryotické buňky*



**9 párů mikrotubulů (protein tubulin)  
+ protein dynein**

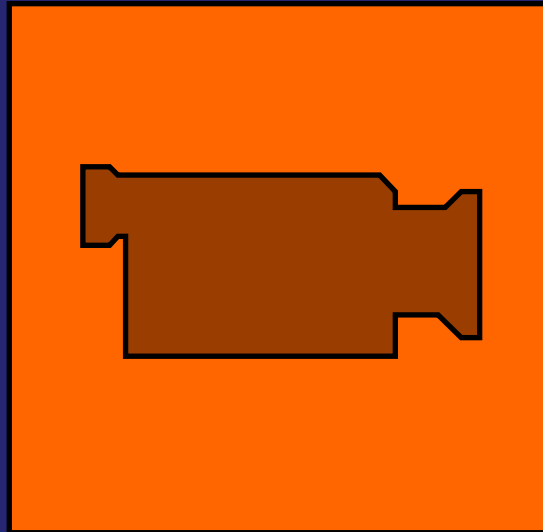
# *Pohybový aparát prokaryot*



*Mikrotubuly*

# ***Animace***

## **Bakteriální bičík**



# ***Mají prokaryota cytoskelet?***

- cytoskelet byl považován za výsadu eukaryotických buněk
- ani elektronovým mikroskopem nebylo možno nic najít



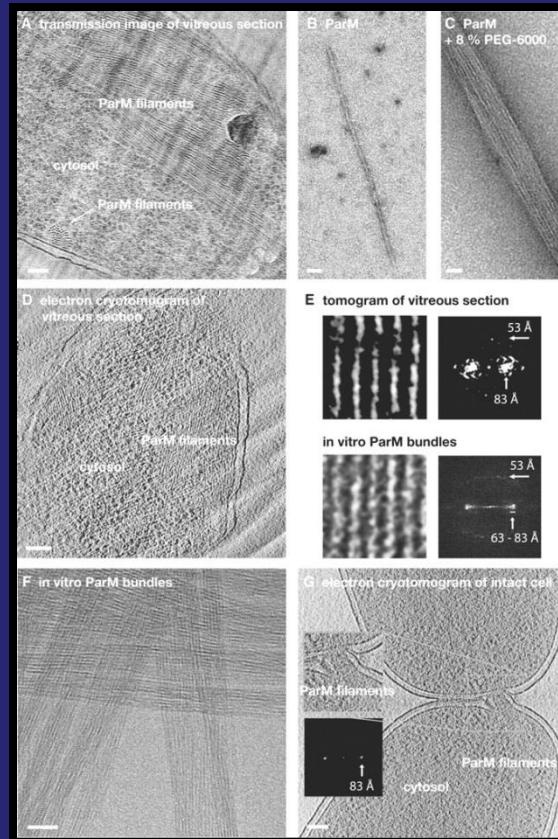
**LEDEN 2009**



**Salje et al. objevili filamenta bakteriálního cytoskeletu  
odpovědná za segregaci DNA**

**Použili metodu kryo-elektronové mikroskopie**

# Přímé pozorování svazků filament u *E. coli*



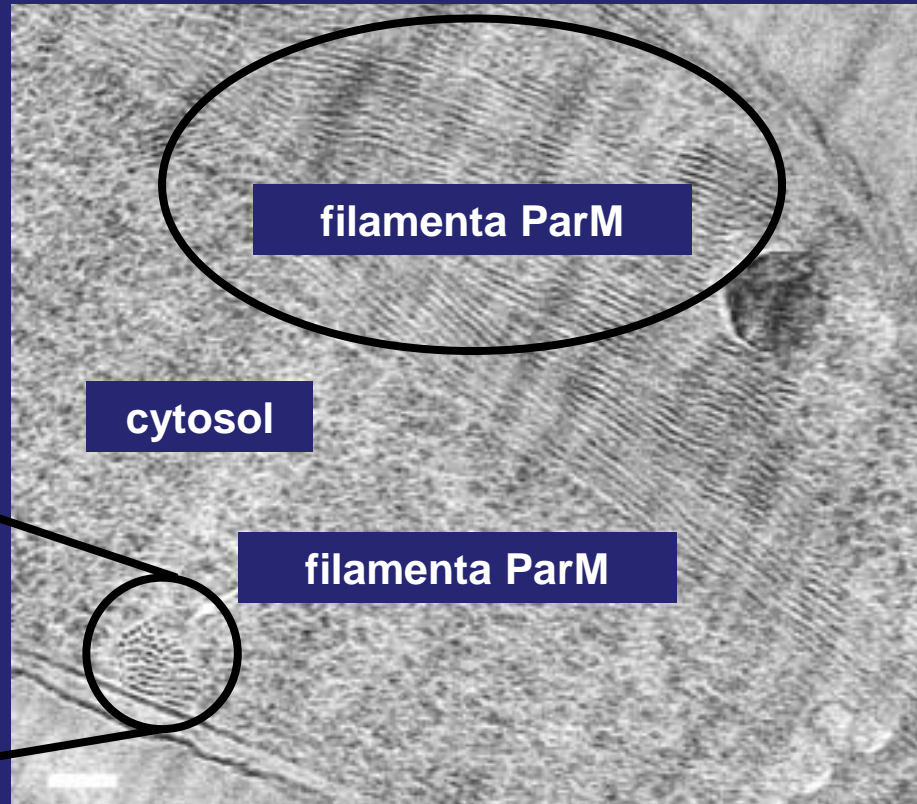
J. Salje et al., Science 323, 509-512 (2009)



# Fotografie průhledných struktur

Fotografie průhledných struktur  
transmisním EM

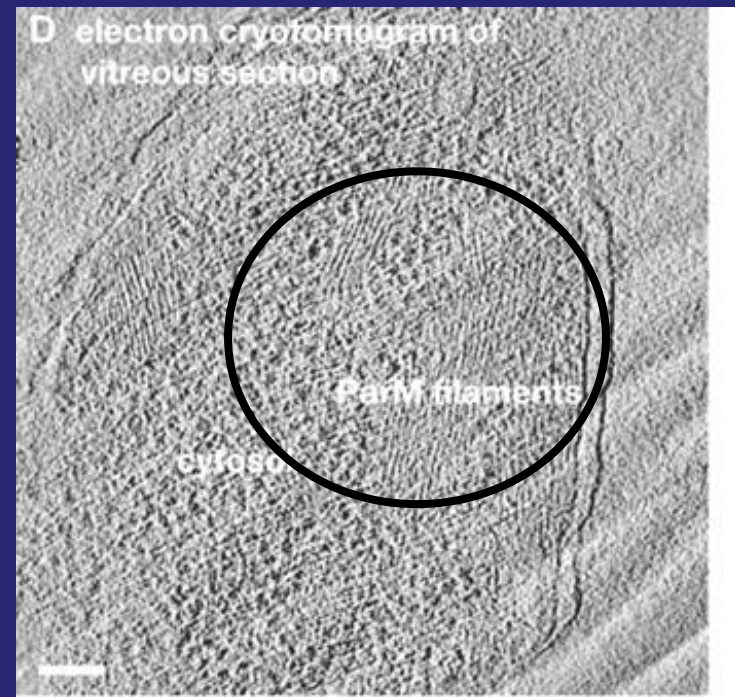
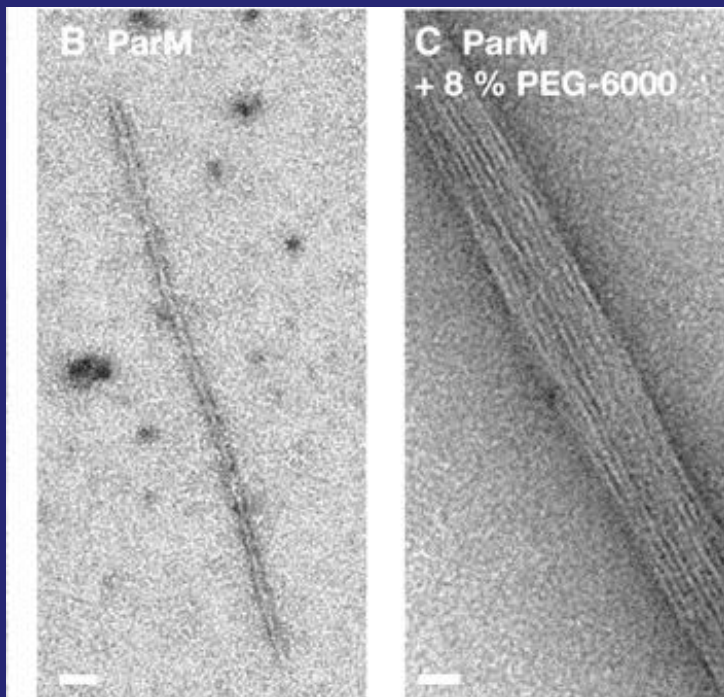
pohled podél  
podélné osy



# Detaily 1/2

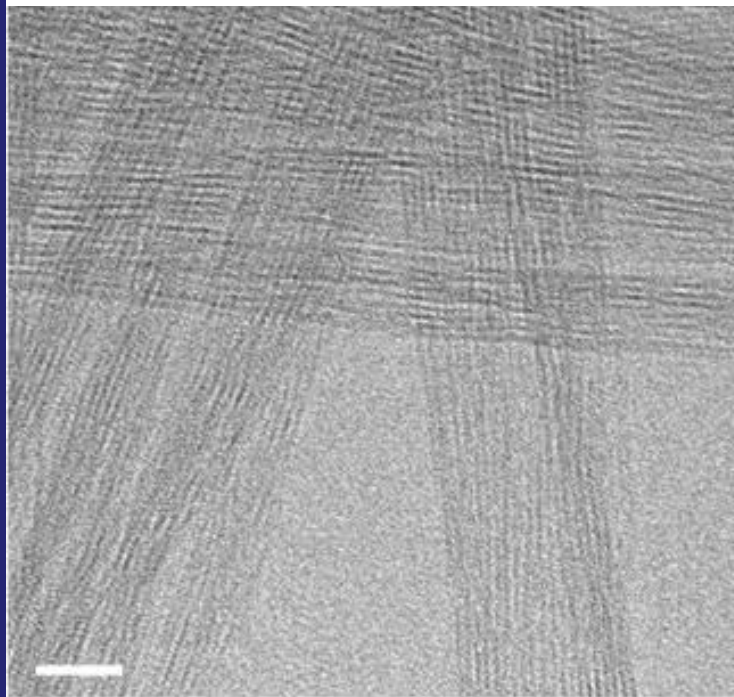
detail filamenta

kryotomogram

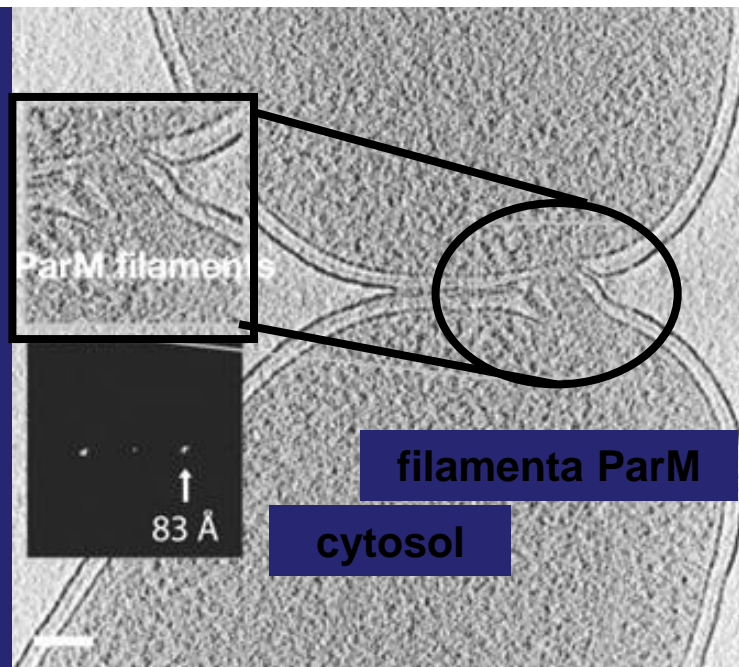


# Detaily 2/2

filamentum v *in vitro*  
systému







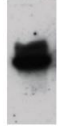
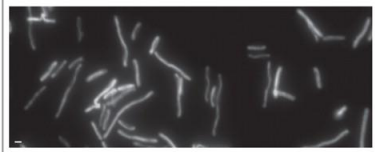


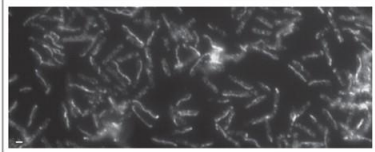
kryotomogram intaktní  
buňky

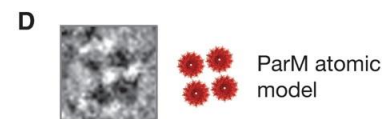
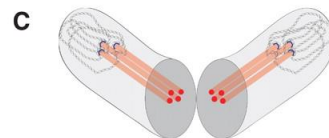
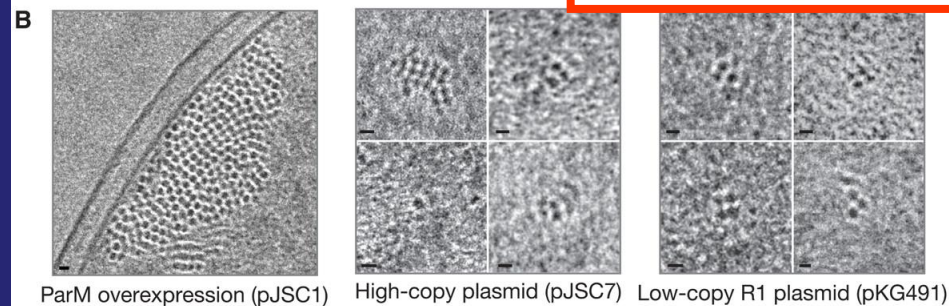




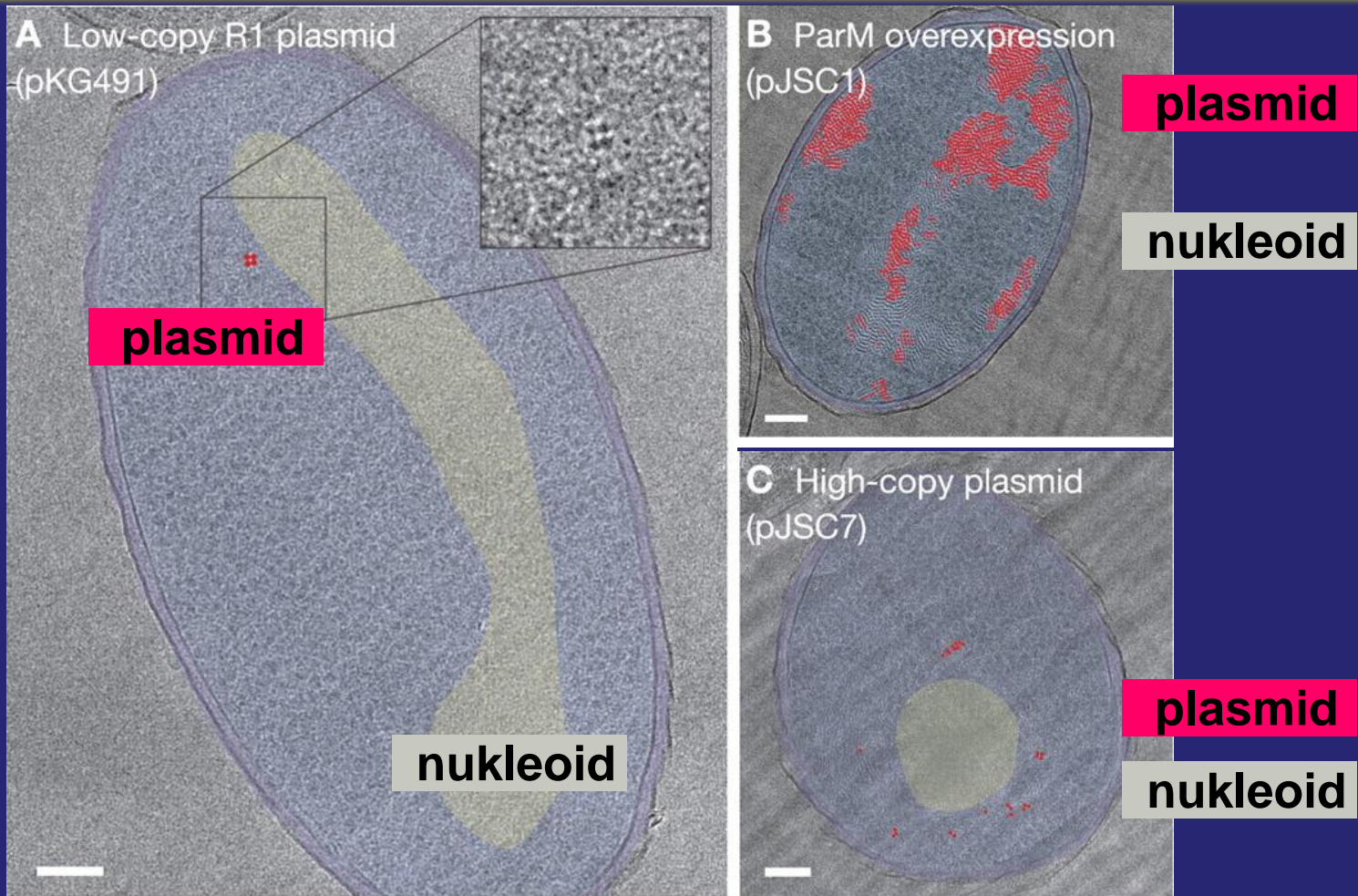
# Filamenta v procesu segregace plasmidové DNA

**A**

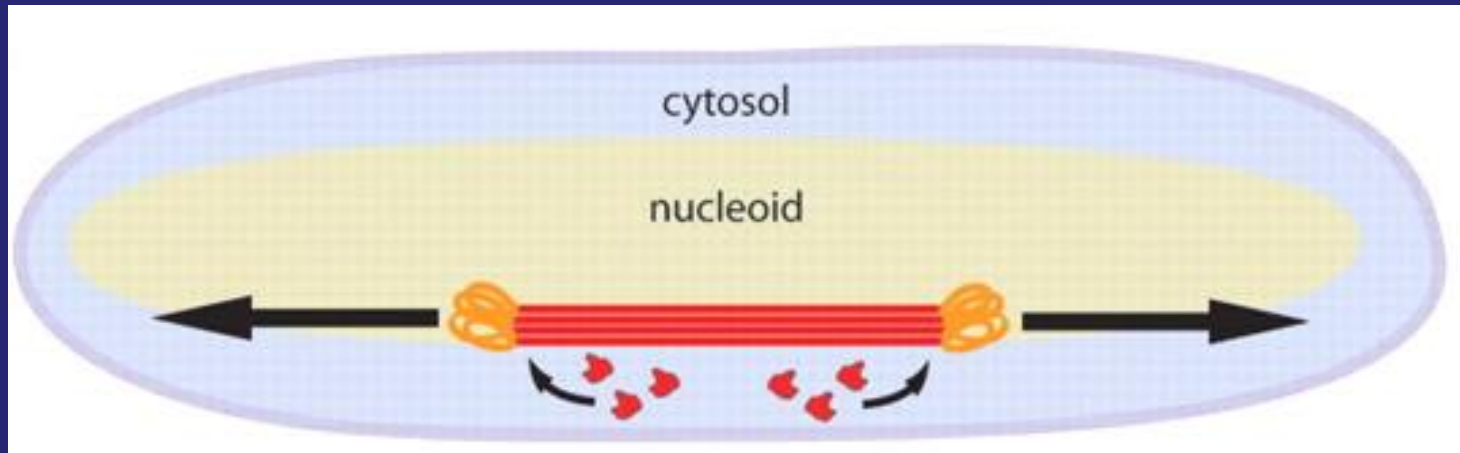
| Description   | Schematic  | Immunoblot   | Immunofluorescence microscopy   |
|---|--|--|---|
| ParM overexpression (pJSC1)                             |  <p>High-copy plasmid (pBR322 replicon)<br/>T7 promoter overexpression</p>    |  |  |
| High-copy plasmid with ParMRC system (pJSC7)            |  <p>High-copy plasmid (pBR322)<br/>Native promoter<br/>3 copies of ParMRC</p> |  |  |
| Low-copy R1 derived plasmid with ParMRC system (pKG491) |  <p>Low-copy plasmid (R1 replicon)<br/>Native promoter</p>                    |  |  |



# Filamenta leží na periferii nukleoidu



# Model segregace plasmidové DNA

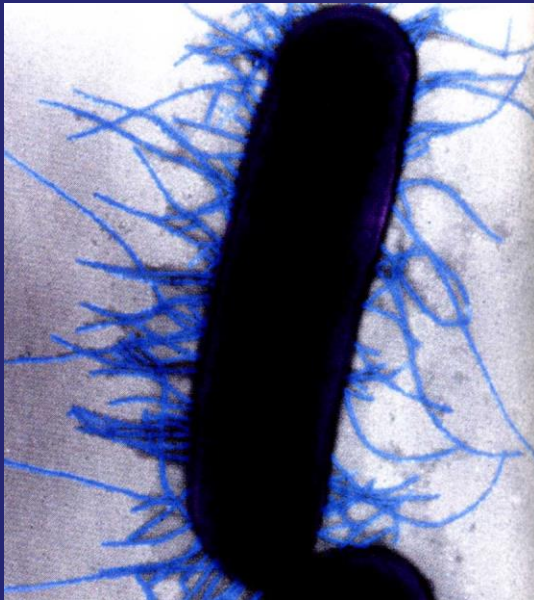


- svazky filament ParM, které zajišťují rozchod plasmidu leží na periferii nukleoidu
- zde jsou molekuly plasmidu zachyceny a následně rozdělovány do dceřiných buněk

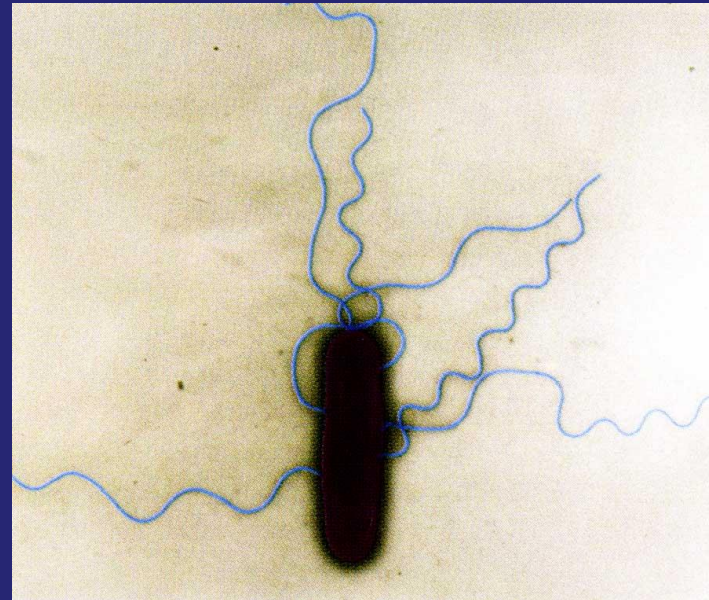


# Mikrotubuly prokaryot

→ pili (fimbrie), flagela (bičíky)



pili u *E. coli*



flagela u r. *Salmonella*



# *Rychlost pohybu organismů*

*Kdo je rychlejší – makro nebo mikroorganismus?*

| <b>Organismus</b> | <b>Km/h</b> | <b>Délek těla/s</b> |
|-------------------|-------------|---------------------|
| <b>Gepard</b>     |             |                     |
| <b>Člověk</b>     |             |                     |
| <b>Bakterie</b>   |             |                     |

# *Rychlost pohybu organismů*

*Kdo je rychlejší – makro nebo mikroorganismus?*

| <b>Organismus</b> | <b>Km/h</b>    | <b>Délek těla/s</b> |
|-------------------|----------------|---------------------|
| <b>Gepard</b>     | <b>111</b>     |                     |
| <b>Člověk</b>     | <b>37,5</b>    |                     |
| <b>Bakterie</b>   | <b>0,00015</b> |                     |

# *Rychlost pohybu organismů*

*Kdo je rychlejší – makro nebo mikroorganismus?*

| <b>Organismus</b> | <b>Km/h</b>    | <b>Délek těla/s</b> |
|-------------------|----------------|---------------------|
| <b>Gepard</b>     | <b>111</b>     | <b>25</b>           |
| <b>Člověk</b>     | <b>37,5</b>    | <b>5,4</b>          |
| <b>Bakterie</b>   | <b>0,00015</b> | <b>10</b>           |

# ***Když Bdellovibrio napadá Pseudomonas phaseolicola***

***Bdellovibrio je 1-2  $\mu\text{m}$  dlouhá bakterie, která napadá periplasmatický prostor gram<sup>-</sup> bakterií***

***Rychlost průniku do bakterie je až 100 násobkem velikosti parazita***



***Jestliže je velikost člověka 1,8 m, jakou rychlostí by se takový člověk pohyboval?***

***Bylo by to 650 km/h***

