

# BIOLOGIJA CELICE

Zapiski s predavanj pri predmetu  
Biologija celice za študente biologije.  
Predavatelji Jezernik, Strle, Pšeničnik.  
Zadnja vsebinska revizija: februar 1998

Uredil Primož Pirih  
Društvo študentov biologije  
<http://dsb.biologija.org>  
e-mail: dsb@uni-lj.si

---

## PLAZEMSKA MEMBRANA

### 1. Splošne značilnosti:

- fizična meja med dvema prostoroma, ki pa omogoča izmenjavo snovi
- aktivnost spec. membranskih proteinov - vzpostavitev ionskega gradienta, ki omogoča:
  - =) sintezo ATP
  - =) transmembranska gibanja dol. raztopin
  - =) prenos, vzpostavljanje el. signalov
- komunikacija med dvema prostoroma - proteinski receptorji - prenos informacij
- esencialne razlike med: ekstracelularjem - citoplazmo; organelom - citoplazmo
- univerzalna struktura:
  - **lipidi** - povsod bolj ali manj identični, fluidni, predstavljajo osnovno strukturo membrane in neprepustno bariero za večino vodotopnih molekul, imajo tudi lastnost dinamičnosti, univerzalnosti
  - **proteini** - specifične karakteristike membran - transport snovi preko membrane, povezujejo membrano s citoskeletom ali ekstracelularni matrix s celico, delujejo kot receptorji, ki zaznavajo in prevajajo kemične signale.
- lipidi in proteini so med sabo povezani z nekovalentnimi vezmi.
- membrana je asimetrična - funkcija!

### 2. Lipidi

- netopni v vodi, dobro topni v organskih topilih
- amfipatične molekule - polarna glava, nepolarni rep - nasičeni ravni, nenasičeni - pojav cis vezi - koleno → lastnosti membrane se spremenijo - težje postavljanje v urejene strukture
- 50 % mase membrane
- nizke koncentracije - enosloji, večje koncentracije - dvosloji - hidrofilni deli vedno obrnjeni k vodi, hidrofobni pa stran od vode; liposomi, membrane - dvosloji

- miceli - kroglaste strukture - vnos snovi v celico npr. antibiotikov, DNA (zlije se z membrano)
- na membr. prihaja do poškodb, ki pa se zaradi narave fosfolipidov hitro popravijo

#### a) gradniki

- **fosfolipidi** - na glicerol vezani dve MK (14 - 24 C atomov) in fosfatna skupina
  - *fosfatidiletanolamin* - večinoma prisoten v cy polovici; nevtr.
  - *fosfatidilserin* - vezan serin, COO<sup>-</sup> - prispeva k naboju membrane; v cy polovici
  - *fosfatidilholin* - nevtr., predvsem na cy strani
  - *sfingomielin* - nevtr.
  - *inozitol fosfolipidi* - prisotni v manjših količinah; funkcionalno zelo pomembni - signalizacija
- **sfingolipidi** - namesto glicerola vezan sfingozin
- **glikolipidi**
  - na ceramid vezani oligosaharidi:
    - cerebrozidi - pripeta ena galaktoza,
    - gangliozidi - različni oligosaharidi - Gal, Glc, NANA
      - oligosaharidi - polarna glava.
      - vezani izključno na ekstracelularno stran
      - tvorijo mikroagregate ko se povezujejo z vodikovimi vezmi
      - sladkorne komponente - na celični površini
      - adicija sladkornih molekul v lumnu GA
      - gangliozidi - vezani ostanki salicilne kisline - neto (-) naboj; najbolj pogosti v membranah živčnih celic - sodelujejo pri prenosu signala
  - **funkcija:**
    - epitelne celice - zaščita
    - električni efekti (gangliozidi) - vplivajo na el. polje preko membrane in na konc. Ca<sup>2+</sup>- prenos dražljajev v nevronih, v mielinskih ovojnica delujejo kot izolator
    - celična komunikacija - prepoznavanje
    - receptorji za ekstracelularne molekule
    - želodec - plašč glikolipidov ustvarja zaščito pred nizkim pH

#### b) gibanja

- **lateralna difuzija:** nek. molekule se lahko premikajo v okviru enega sloja
- **flip - flop:** preskok iz ene plasti v drugo - katalizira *fosfolipidni translokator* (prenese fosfolipid iz cy strani, kjer je nastal (v ER), na zunanjo stran membrane) - membrana je zato asimetrična - fosfatidilserin le na cy strani!
- **rotacija molekul:** hitro gibanje okrog svoje osi

#### c) sinteza

- membrana gladkega ER - osnova glicerol + 2 MK, ki prihajata iz citosola → diacilglicerol, ki se nato modificira (sinteza se torej prične že v cy)
- lumen ER - pripenjanje etanolamina in serina
- fosfatidilholin ostaja na cy strani, ostali se lahko premeščajo s pomočjo flip - flopa

#### d) raznolikost sestave endomembran (glede na vsebnost FL - vzroki)

- polarne glave fosfolipidov se biokem. spreminjajo - modifikacije
- brstenje membran - brstenje veziklov iz ER → prehod v GA - modifikacija; različni vezikli - selekcija pri oblikovanju veziklov
- pos. proteini, ki kot škarje zgrabijo pos fosfolipid in ga prenesejo drugam (*fosfolipidni zamanjevalni protein*) - zato različna zgradba endomembran - asimetrija

- **Pch** - količina od mesta sinteze - ER do plazmaleme upada
- **PS** - manjša vsebnost od Pch, količina se proti plazmalemi povečuje - kritična koncentracija, da lahko potekajo določene reakcije; Ima negativen naboj. Mol, ki je nujno potrebna za delovanje *protein kinaze C* (aktivacija na odgovor ekstracelularnih signalov)
- **SM** - količina od ER do plazmaleme narašča
- **PIP<sub>2</sub>** (*fosfatidilinozitolbifosfat*) - vezan na cy strani - delovanje fosfolipaze C - dobimo 2 molekuli, ki se vključujeta v signaliziranje - *diacilglicerol* - sekundarni obveščevalec, pripet na notr. stran dvosloja; aktivira protein kinaze, ki sodelujejo pri signaliziranju - vključevanje fosfatnih skupin, *inozitol 3P (iP3)*
- **holesterol** - 3C<sub>6</sub> + C<sub>5</sub> obroč s kratkim repom in nabito -OH → vezan blizu polarnih glav fosfolipidov → polarnost; amfipatičen, organizira se v dvosloj. Vsebnost je značilna za določen tip celic. Hol. interreagira s fosfolipidnimi molekulami - tvori estre z glicerolom - večja vsebnost v membrani, manjša fluidnost membrane, preprečuje pa da bi CH verige prišle skupaj in kristalizirale - inhibicija fazne tranzicije.
- stopnjuje permeabilnostno barierno značilnosti membran - rigidni steroidni obroči so v interakciji in delno imobilizirajo regije ogljikovodikovih verig, ki so pripete na polarne glave. Zniževanje mobilnosti prvih nekaj CH<sub>2</sub> skupin - lipidni dvosloj se težje deformira - permeabilnost za vodotopne molekule je zmanjšana

#### e) fluidnost

- odvisna predvsem od zgradbe membrane
- pri telesni temperaturi so membrane fluidne - normalno funkcioniranje, lateralna difuzija; če temp. pade postanejo rigidne
- prehodna kritična temperatura - *meja faznega prehoda*; različna, odvisna od:
- vrste fosfolipidov
- nasičenosti
- vsebnosti holesterola - manjša fluidnost pri večji konc. holesterola
- večanje št C - ↑ tal.
- večanje št. = vezi ↓ tal
- prilagajanje okolju:
  - sinteza večje količine nenasičenih maščob - fluidnost pri nizkih temperaturah (pom pri poikilotermnih organizmih)
  - vgrajevanje holesterolnih molekul
- če je membrana fluidna
  - možna lat. difuzija.
  - Poskus: celico označimo z markerjem - povežejo se glikoproteini, ki so bili prej narazen

#### f) asimetričnost lipidnega dvosloja

- fosfatidilholin in sfingomielin - na zunanji strani dvosloja - tam so vse molekule, ki vsebujejo terminalno amino skupino
- fosfatidiletanolamin in fosfatidilserin (-) → na notranji strani; diferenca v naboju notranjosti in zunanosti

### 3. Proteini

#### a) splošne značilnosti

- odgovorni za specifično membran; osnovne funkcije
- 25% (schwanove celice) - 75% (notr. membr. My) sestavin v membrani; norm 50%
- sodelujejo pri biokemijskih procesih
- *periferni* - slabše pripeti - povezani z enoslojem ali nanj pripeti
- *integralni* - razlika v strukturi, lokaciji in funkciji - prebadajo celotno membrano, odstranimo jih lahko samo z razbitjem membrane

b) pripenjanje

- dvosloj predirajo v obliki  $\alpha$  - heliksa, nazunaj in navznoter pa so različne oblike
- predel v fosfolipidnem dvosloju je hidrofoben, izven dvosloja hidrofilen (str. 486)
- vezani preko MK
- **transmembranski prot.** lahko predirajo dvosloj enkrat ali večkrat (do 20x) - več zank vsidranih v dvosloj - gre za proteine, ki so soudeleženi pri transportih raznih molekul (prot., ki izloča iz celice antibiotik, Cl; lahko kovalentno povezani z MK v repih fosfolipidnih molekul (str. 486), večina je glikoziliranih v GA lumnih
- **periferni prot** - šibko vezani preko MK - lahko vezani posredno preko oligosaharidne verige - kovalentne ali nekovalentne povezave (*amidna, tioesterska vez*)
- AK, ki se nahajajo v dvosloju - Gly, Phe, Ile, Ala, Ser - same hidrofobne - tvorba vezi z MK (npr. vodikove)
- ekstracelularno - oligosaharidi, S-S vezi - intracelularno jih ni - prisotne skupine (reducirajoče okolje), ki preprečujejo povezavo cisteinskih ostankov v S-S mostičke. V ekstracelularju pa S-S mostički stabilizirajo polipeptidne strukture v povezavi z drugimi. Oligosaharidov ni, ker so prisotne glikoziltransferaze)
- orientacija - zunaj NH<sub>2</sub> skupina, znotraj COOH - če je drugače je prot. modificiran - znotraj odrezan C, zunaj N konec
- navznotraj je membrana pripeta na citoskelet (prenašanje informacij) - ni je mogoče razmejiti - integralna struktura

- slika 10-13 - povezava membranskih proteinov z lipidnim dvoslojem

- 1) enojni  $\alpha$  heliks
  - 2) multipli  $\alpha$  heliks
  - 3) nekateri od teh proteinov so kovalentno pritrjeni na verigo MK na cy strani;
  - 4) prot. pripeti preko kovalentno vezanega lipida, MK; lahko pritrjeni preko prenilne skupine
  - 5) nek. prot. so pritrjeni preko oligosaharida na fosfolipid, fosfatidilinositol - necitoplazmatska stran
  - 6) povezava na membrano preko drugih membranskih proteinov - nekovalentno
- mesta zlivanja membran** -(oploditev, delitev celice, sekrecija,..) pojav *invertnih micelov*, ker se dvosloj spremeni in ni več energetsko idealna struktura - membrana je na tistem mestu nestabilna. To traja zelo kratek čas.

c) glikokaliks

- leži ekstracelularno
- glikoproteini, proteoglikani
- oligosaharidne molekule kovalentno pritrjene na membranske proteine (glikoproteini) in lipide (glikolipidi)
- polisaharidne verige integralnih membranskih proteoglikanov - dolga polisaharidna veriga kovalentno pripete na prot. - del ekstracelularnega matrixa
- protein + dimera sladkorja, ki se večkrat ponovita (do 1000x) - **glikozaminoglikani** - gre za velike molekule, ki ustvarjajo zelo debelo plast (3x debelejša od plasti celic - zaščitna plast - mehur, želodec)

d) gibanje

- ni flip - flopa
- rotacijska difuzija prisotna, prav tako lateralna difuzija - *dokaz s hibridnimi celicami*

e) izolacija prot.

detergenti - SDS, Triton X - 100 (str. 489)

TRANSPORT PREKO MEMBRANE

- poteka na različne načine - več sistemov
- voda in majhne hidrofobne in nenabite polarne molekule prehaja neovirano → O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etanol, urea,..
- za makromolekule, ione, ki ne morejo pasivno prehajati - prenašalni sistemi - ATP črpalke, kanali, prenašalci
- hidrofobna notranjost membrane - otežen prehod polarnih molekul → pom. pri ohranjanju različnosti cy od ekstracelularja
- celice so zato morale razviti različne načine, kako spraviti dol snovi preko membrane → sprejemanje hranilnih snovi, izločanje metabolitov
- ioni, majhne vodotopne molekule → spec. transmembranski proteini
- membranski proteini:
  - **prenašalci** - gibajoči se delci, ki prenešajo snovi preko membrane. Lahko
    - sklopljeni z virom energije - aktivni transport. Vežejo spec. mol. in jo preko konformacijskih sprememb prenesejo na nasprotno stran membrane.
    - **kanalčki** - pasivni transport preko pornih molekul v skladu s konc. gradientom. Ne vežejo mol., ampak tvorijo hidrofobne pore - prehod spec. ionov.
    - generiranje ionskih konc. razlik preko membrane → generiranje potencialne energije v obliki elektrokemijskega gradienta → energija se porablja pri različnih transportnih procesih, pri prenašanju električnih signalov, pri tvorbi ATP
  - **pasivni transport**: nek. kanali in prenašalci (pospešena difuzija) omogočajo le prehod v skladu z gradientom - koncentracijski za nenabite mol., če so nabite še elektrokemijski.
  - **aktivni transport**: prenašalci - črpanje snovi proti gradientom - zato je potrebna energija
    - sekundarni → energija shranjena v elektrokemijskem gradientu
    - primarni → energija shranjena v ATP
- **ATP - črpalke**
  - delujejo proti konc. gradientom (kem. in el.) - na račun hidrolize ATP
  - gre za povezavo energetske ugodne (hidroliza ATP) in neugodne reakcije (prenos iona proti reagentu)
- **Kanali**
  - *porini* - prokarionti: kanali občasno odprti ali zaprti - prihaja ogromno snovi istočasno - velika hitrost prehoda. Omogoča prestop snovi v skladu s konc. gradientom, energija ni potrebna
  - transport kalija
- **Prenašalci**
  - transmembranske molekule, ki spec. prenašajo samo eno snov (mol. ali ion) - podobno encim - substrat reakcijam
  - vsak prenašalec ima eno ali več aktivnih vezavnih mest za substrat. Ko je prenašalec nasičen, je hitrost transporta max.
  - prihaja do konformacijskih sprememb: mol. se veže na pov. → konf. sprememba → spr. afinitete vezave. Prenašalec se v bistvu obrne.
  - prenos proti gradientu
  - 1. **uniport**: prenos 1 mol. - iona, podoben črpalci, vendar ne gre za hidrolizo ATP - potek v skladu s konc. gradientom
  - 2. **simport**: prenos 2 mol. istočasno v isto smer, odvisno kako so postavljeni gradienti - ena snov se prenaša v skladu z gradientom, druga pa proti gradientu - gre za sklopljeno reakcijo, ni hidrolize ATP
  - 3. **antiport**: prenos 2 molekul v nasprotno smer - gradienta istosmerna, ena mol. prehaja v skladu z gradientom, sledi vnos proti gradientu - E se uporabi za prenos tiste snovi, ki se transportira proti gradientu

### • Difuzija malih molekul

- porazdelitveni koeficient - merilo hidrofobnosti (afiniteta substance za lipid v primerjavi z vodo) - vodni medij, membrana, hidrofobna mol.
- konc. je odvisna od tega kako se snov porazdeli - **porazdelitveni koeficient** za dol snov:  $K = C_m / C_{aq} \rightarrow P \text{ sor. } K$
- **Fickov zakon** - hitrost prehoda je odvisna od hidrofobnosti molekul; pasivna difuzija malih nenabitih molekul je zanemarljiva, če ne gre za zelo hidrofobno snov. Hitrost difuzije je proporcionalna porazdelitvenemu koeficientu. - najhitreje potojejo prek membrane hidrofobne snovi.
- *prenašalec*: hitrost difuzije je večja kot po Fickovem zakonu, ker ni stika s hidrofobnim slojem- pri difuziji gre za penetracijo - določen upor. Gre za specifičen prenos, medtem, ko je pasivna difuzija nespecifična. V katero smer snov potuje določa gradient snovi; če se obrne se tudi prenos obrne
- *vnos glukoze v celice*:
  - - pospešena difuzija, ki po nekem času doseže svojo  $v_{max}$  - pride do zasičenja
  - prenašalec ima navzven obrnjeno aktivno mesto z veliko afiniteto za glukozo
  - vezava
  - konformacijska sprememba, afiniteta vezave na mestu se zmanjša
  - sproščanje glukoze v notranjost
- transporterji so visoko specifični, že majhna razlika ( $D \rightarrow L$ ) - afiniteta se spremeni
- glukoza se porablja v metabolnih potek, zato ne pride do obrata gradienta. Znotraj celice se fosforilira in transporter je ne prepozna več

### • Gibanje ionov preko membrane

1. transportni proteini - antiport, simport
  2. ionski kanali - v skladu s konc. gradientom
  3. ionske črpalke
- prenos odvisen od:
    - konc. gradienta
    - - el. potenciala - celica deluje kot kondenzor, membrana deluje kot izolacija (zunaj in znotraj je hidrofobna)

ion	konc. - sesalčja celica	konc. - kri
K <sup>+</sup>	139	4
Na <sup>+</sup>	12	145
Cl <sup>-</sup>	4	116
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	12	29
X <sup>-</sup>	138	9
Mg <sup>2+</sup>	0,8	1,5
Ca <sup>2+</sup>	< 0,0002	1,8

Ca<sup>2+</sup> je vključen v signaliziranje, zato ga mora biti znotraj celice malo - min. sprememba v konc. pomeni signal. Ca<sup>2+</sup> sodeluje s kalcijevimi vezavnimi proteini npr. **kalmodulin** = heterogena molekula, ki lahko veže do 4 Ca<sup>2+</sup> - glede na št. vezanih Ca<sup>2+</sup> se molekula konformacijsko spreminja.

Slika: kalmodulin:

#### ATP črpalka:

- za črpanje snovi proti gradientom je potrebna velika energija

#### tipi črpalk:

- P - črpalke

- ioni:  $p^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$
- $2\alpha$  in  $2\beta$  podenoti
- potrebna fosforilacija večje podenote ( $\alpha$ )
- lokacija:
  - plazmalema bakterij ( $p$ )
  - plazmalema evkariontov ( $Na^+/K^+$  črpalka,  $Ca^{2+}$ )
  - plazmalema želodčnega epitelija ( $p^+/K^+$ )
  - SER v mišicah ( $Ca^{2+}$ )
  
- **F - črpalke**
  - kompleksna transmembranska domena
  - 8 podenot
  - transportira  $p^+$
  - plazmalema bakterij, My -udeležena pri sintezi ATP
  - uravnavanje pH bakterij
  
- **V - črpalke**
  - 7 podenot, kompleksne
  - transport  $p^+$
  - v endosomih, lizosomih - kisel pH
  - odgovorna za zakisanje matriksa pri osteoklastih v kosteh
  - za delovanje rabi hidrolizo ATP
  
- **Ca<sup>2+</sup> črpalka - ATPaza**
  - $Ca^{2+}$  se nahaja ekstracelularno, v celici ga je malo - črpa se ven proti gradientu - potrebna energija (ATP), konc. v cy se spreminja po potrebi
  - v jedru, SER, My večja konc.  $Ca^{2+}$  - v membranah nameščena črpalka
  - črpa  $Ca^{2+}$  iz cy v SER
  - v ER prenaša 2  $Ca^{2+}$  naenkrat
  - slika SER, plazmalema:
  
- **Na / K črpalka (antiporter) - P črpalka**
  - prenaša  $K^+$  v celico,  $Na^+$  iz celice, proti elektrokemijskemu gradientu
  - s pomočjo ATP se spreminja afiniteta vezave za oba iona
  - vzdržuje razliko v konc. gradientih, na račun tega, da obstajajo kanali skozi katere gre  $Na^+$ ,  $K^+$  v celico
  - ko se veže  $Na^+$  na citosolni strani (velika afiniteta za  $Na^+$  in majhna za  $K^+$ ), se  $K^+$  ne more vezati, da bi izhajal ven → sprememba konformacije in hidroliza ATP
  - ko se  $Na^+$  sprostijo, se na zunanji strani poveča afiniteta za  $K^+$ . Ob odcepitvi P se konformacija spremeni → pride do prenosa  $K^+$  na drugo stran, kjer pride do disociacije  $K^+$  v cy
  - inhibitor črpalke je ouabain, s  $K^+$  tekmuje za vezavno mesto
  - je elektrogena črpalka - ustvarja električni potencial
  - regulira celični volumen → kontrolira konc. rtp. v celici - če so celice tretirane z ouabainom se napihnejo
  
- **p<sup>+</sup> črpalke**
  - lizosomi - pH 5-6, endosomi, plazmalema osteoklastov
  - V črpalke - ni fosforilacije
  - osnoven namen je , da ustvarijo zakisano vsebino v organelih ali zunaj celice (osteoklasti - kost - veliko kalcijevega fosfata - hiperaktivirane črpalke - razpad apatita)

- če bi k pH prispeval samo črpalke, bi prišlo do ustvarjanja el. gradienta. Zato pride do izčrpavanja drugih kationov ven in včrpavanja anionov v celico, da se ustvari nevtralni naboj.
- **P - 170**
  - protein, ki je pomemben za transport drog ali toksinov - jetra, mehur, ledvice - tam kjer se nabira večja količina toksičnih substanc (detoksifikacija)
  - problematično je tretiranje rakastih celic z antimitotiki, ker ta protein izčrpa vse toksine iz celice. Aktivnost črpalke je pri rakasto spremenjenih celicah lahko celo povečana.
- **Cl<sup>-</sup> črpalka**
  - odgovorna za iznos anionov
  - obolenje: cistična fibroza - okvara tkiv in organov, ki izločajo določene sekrete - moten transport klorovih ionov
- **Kotransporti**
  - transport glukoze v endotelijskih črevesnih celicah
  - simport 1 Glu in 2 Na<sup>+</sup>
  - polarnost celice
  - tesni stiki - preprečevanje mešanja snovi ekstra in intracelularja - omogoča ohranitev gradienta
  - slika:

#### srčna mišica

- vdor Ca<sup>2+</sup> pomeni skrčitev mišice, transport ven pa relaksacijo
- gre za antiport: 3Na<sup>+</sup> (out) + Ca<sup>2+</sup> (in) ⇌ 3Na<sup>+</sup> (in) + Ca<sup>2+</sup> (out)
- slika:

#### želodčne epiteljske celice

- H<sup>+</sup> in OH<sup>-</sup> se morata črpati ven
- H<sup>+</sup> prehaja proti gradientu, zato je potrebna energija. Proti gradientu se prečrpava tudi K<sup>+</sup>, ki pa mora celico zapuščati v skladu z gradientom - s tem se ohranja pH v epitelu in zakisanje v želodcu
- OH<sup>-</sup> - prenos sklopljen z energetsko neugodnim vnosom Cl<sup>-</sup>
- slika:

#### CELIČNE POVEZAVE IN STIKI

- celice so normalno na fiksnem mestu, poznamo pa tudi migracije (embrionalni razvoj)
- lahko se selijo tudi po ekstracelularju, da nastane tkivo, tako kot je z vsemi svojimi funkcijami
- pomembno vlogo igra kalcij (vzdrževanje epitelija v svoji formi), če ga ni tkivo razpade
- **selektini - E (epitelij, endotelij), P (placenta), L (limfociti)** str. 503,967
  - molekule, ki povezujejo glikoproteine v membranah
  - usposobljene, da se vežejo na pos. sladkorne komponente - vezava odvisna od Ca<sup>2+</sup>
  - lecitinska domena - na koncu proteina, ki se izteza iz celične površine → v prisotnosti kalcija veže na spec. oligosaharide ali drugo celico
  - lecitinska domena prepozna spec. oligosaharid
  - več vrst: epiteljski, endoteljski - E, placentalni - P, limfocitni - L
  - slika:

- **IgSF**



- struktura v principu taka kot pri Ig
- nahajajo se na pov. limfocitov - prepoznavanje tarčnih celic
- neodvisni od  $\text{Ca}^{2+}$
- pom. pri embrionalnem razvoju; tvorba živčevja in mišičja
- povežeta se IgSF sosednjih celic
- slika:
  
- **kadherini**
- odvisni od  $\text{Ca}^{2+}$ , sicer ne pride do povezave - kadherini - velike strukturne spremembe
- E - epitelne celice, N - nevroni, mišice, leča, P - placenta, epidermis
- pom vloga pri nastajanju tkiv (embr.) - omogočajo povezavo med pravimi tipi celic
- citoskelet - povezava med aktinskimi filamentami in kadherini ni direktna - vmes so razne adapterske, povezovalne molekule - katehini,  $\alpha$  - aktinin
- večina kadherinov je glikoproteinov iz 700 - 750 AK ostankov. Velik ekstracelularni del je iz petih domen, vsaka po pribl. 100 AK. 4 domene so homologne in vsebujejo vezavna mesta za  $\text{Ca}^{2+}$
- slika:
  
- **Integrini**
- najpom., najbolj kompleksni
- povezujejo celice in ekstracelular preko dezmosomov
- molekule, ki sodelujejo pri signalizaciji (aktivni procesi), komunikaciji
- več vrst, spec. za pos tkiva, tipe celic (vsaj 20)
- iz dveh transmembranskih proteinov
- $\text{Ca}^{2+}$  predstavlja + signal,  $\beta$  podenota ni odvisna od  $\text{Ca}^{2+}$
- slika:
  
- vnetni procesi: tujki pridejo v telo, limfociti jih locirajo in uničijo → potreben prehod iz kapilar na mesto infekcije. Prehajanje iz kapilar je težko zaradi velikih barier - pomoč selektinov in integrinov
- slika: - selektini najprej predhodno vežejo limfocit. Nato se aktivirajo integrini, ki trdno povežejo limfocit, nato pride do spremembe v epiteljskih celicah → špranja → prehod je omogočen
  
- integrini so transmembranski povezovalci, ki povezujejo ekstracelularne molekule na aktinske filamente v celičnem korteksu in s tem regulirajo obliko, orientacijo in gibanje celic
- ligand vežejo z nizko afiniteto, drugače bi se celice lahko ireverzibilno prilepile na matrix
- so glavna pot povezave in komunikacije med celico in ekstracelularnim matrixom
- dve nekovalentno vezani transmembranski glikoproteinski podenoti -  $\alpha$ ,  $\beta$ , ki se vežeta na fibronektin, laminin, kolagen
- vezava integrinov na ligande je odvisna od  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  - 4 vezavna mesta na  $\alpha$  podenoti
- integrini na krvnih celicah morajo biti najprej aktivirani, šele nato lahko pride do celične povezave - primer strjevanja krvi → stimulus (poškodovana žila) sproži intracelularne signalne poti, ki aktivirajo  $\beta 3$  integrin v membrani trombocita → konformacija, tako, da ekstracelularna domena lahko veže fibrinogen → zlepljanje trombocitov
- pri pojavljanju strdkov moramo najti molekule, ki kompetitivno veže fibrinogen, tako, da ga integrini ne morejo
- integrini se lahko tudi inaktivirajo → fosforilacija serinskega ostanka na cy repu  $\beta 1$  integrina med mitozo v celičnih kulturah. Zato se celice med mejozo odlepijo od substrata - ne morejo se vezati s fibronektinom. Podobno se zfodi pri metastatskih celicah → fosforilacija Tyr ostanka v cy repu

- **TESNI STIKI (zonula occludens)**
    - mesta kjer so celice med seboj popolnoma spete v membrani - zlitje v pos. točkah (okludin - transmembranski in zunajcelični)
    - prisotni v epiteliju tik po apexom
    - fizično in funkcionalno razdelijo celico na apikalno in bazalno površino
  - preprečujejo prehod iz en strani na drugo tudi majhnim molekulam
    - tečejo okrog in okrog celice kot pasovi
    - različni pri različnih tipih tkiv - npr. maternica, mehur - veliko takih stikov zaradi širjenja in krčenja
  - pomen:
    - fizična ločitev apexa in bazolateralnega dela celice - osnova polarizirane celice
    - zunajcelični prostor je po sestavi drugačen kot bazolateralni prostor - celični stik mora biti zaprt, da je omogočen kontroliran prehod; razmejitev vsebine dveh zunajceličnih prostorov - npr. tanko črevo - vsbina lumna mora biti ločena od vsebine ekstracelularja na drugi strani epitelne celice (str. 951) - apikalni set prenašalcev ne sme migrirati na bazolateralno stran in obratno. Prostori med samimi epitelnimi celicami morajo biti zatesnjeni, da se vsebini ne mešata.
  - slika:
- 
- **PRILEŽNE POVEZAVE, DEZMOSOMI**
    - povezava citoskeleta celice z drugo celico ali ekstracelulerjem - epitel zato deluje kot strukturna enota
    - najbolj pogosti v tkivih, ki so podvržena mehanskim stresom
    - dezmosomi, hemidezmosomi - sodelujejo intermediarni filamenti
    - povezave so iz dveh vrst proteinov:
      - plak - znotrajcelični proteini, ki se vežejo na transmembranske proteine → povezujejo kompleks z aktinskimi ali intermediarnimi filamenti
      - transmembranski povezovalni proteini, ki se vežejo na notrajcelične proteine, ekstracelularne domene pa kontaktirajo z ekstracelularnim matriksom ali enakim prot. druge celice

#### Pasasti dezmosom

- lociran kot pas tik pod tesnim stikom epitelne celice
- pasasti dezmosomi sosednjih celic so si ravno nasprotni, med seboj povezani s kadherini (transmembranski povezovalni proteini) str.954
- blizu pasastega dezmosoma ležijo aktinski filamenti, ki se preko povezovalnih proteinov ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  katenin, vinkulin,  $\alpha$  - aktinin, plakoglobin) vezani na kadherin → gre za močno transcelularno mrežo
- mehanska vloga - povezovanje celic na ekstracelularni matrix
- slika:

#### Pravi dezmosom:

- točke, ki fizično vežejo dve membrani kot zakovice
- znotraj celice se pripenjajo na intermediarne filamente, ki v celici tvorijo mrežo
- intermediarni filamenti: - keratin (epitelne celice), dezmin (srčna mišična tkiva)
- kot povezovalci plaka tudi tu nastopajo kadherini
- vloga - držanje celic skupaj
- slika:

#### Hemidezmosom

- poldezmosomi, morfološko podobni dezmosomom, funkcionalno in kemično pa različni
- vedno se nahaja na bazi celice in povezuje celico z zunajceličnim matriksom - bazalno lamino preko integriniv (ne kadherinov, kot pri pravem dezmosomu)

- slika:

**molekularni princip povezav:** integrini v plazmalemi povezujejo celico z ekstracelularnim matriksom. Kadherini v plazmalemi ene celice se povezujejo s kadherini sosednje celice. Oba tipa povezav sta odvisna od dvovalentnih ionov.

- **PRESLEDKOVNI STIKI = NEXUS**

- dve sosednji celici sta ločeni s presledkom (2 - 4nm). Tu se nahaja kanalni protein, ki omogoča neoviran prehod ionov in vode, ne morejo pa prehajati makromolekule.
- dve sosednji celici sta sklopljeni - električno in metabolno
- živčna in mišična tkiva - prehod ionov, ki imajo vlogo signaliziranja -  $Ca^{2+}$ , c-AMP (el. sinapse)
- gre za koneksone → iz 6 podenot = koneksini (4  $\alpha$  heliksi) - tvorba pore, ki se razteza v notranjost obeh sosednjih celic in drži obe membrani narazen na točno dol. razdalji
- v različnih tkivih imajo različne lastnosti → permeabilnost lahko variira
- el. vzdražne celice → AP se lahko širi brez časovnega zaostanka, ki se pojavlja pri kemičnih sinapsah
- sinhronizacija srčnega utripa, kontrakcije gladkih mišic - peristaltika
- slika:

**pomen:**

- komunikacija treh kličnih pol med embrionalnim razvojem, da pride do pravilnega vklopljanja celic v tkiva
- koneksioni so strukture, ki se lahko odpirajo in zapirajo - regulacija s pomočjo  $Ca^{2+}$ - vdre v poškodovano celico in zapre konekson; c - AMP → so dinamična struktura
- zapiranje koneksonov, če se poškoduje sosednja celica, da ne pride do iztekanja snovi tudi iz nepoškodovane celice
- rakaste celice nimajo koneksionskih povezav, ker ne tvorijo koneksina - ni komunikacije

**ZUNAJCELIČNI MATRIKS**

- vpliva na razvoj, migracije, proliferacijo, obliko in funkcijo celic
- regulira obnašanje celice na ketere je ekstracelularni matrix pripet
- makromolekule, ki se nahajajo v matriksu → izločajo jih celice npr. fibroblasti

**glikozaminoglikani (GAG)**

- kovalentno povezani s proteini - tvorijo *proteoglikane (PG)* - pp verige (core protein) → nastane na RER, polisaharidne verige se dodajo v GA
- glikoproteini → 1 - 60% karbohidratov, tvorijo veliko kratkih razvejanih verig
- proteoglikani → 95% karbohidratov, tvorijo dolge nerazvejane GAG verige, dolge okrog 80 sladkornih ostankov. Lahko so mnogo večji od glikoproteinov.

**fibrilarni proteini**

- *strukturni*: kolagen, elastin
- *adhezivni*: fibronektin, laminin
- velika variabilnost v obliki in velikosti
- lastnosti:
  - močno hidratiziran - zaradi neg. naboja močno veže  $H_2O$  - podobni gelu
  - Pg predstavljajo uporno silo pritiskom (zlasti kolagen in elastin)
  - kolagen, elastin - nateznost, trdnost, pomagajo urediti matrix
  - hidratizacija omogoča difuzibilnost (difuzija nutrientov, hormonov, metabolitov)

- - adhezivni proteini omogočajo pritrjanje na celično podlago - *fibronektin* → vezava fibroblastov in drugih celice na matrix v vezivnih tkivih, *laminin* → vezava epitelnih celic na bazalno lamino

### • Glikozaminoglikani

- protein + nerazvejan sladkor iz disaharidnih enot
- GAG - eden od sladkornih ostankov je vedno aminosladkor - N - acetilglukozamin, N - acetilgalaktozamin, ki je v večini primerov sulfatiran. Drug sladkor je navadno uronska kislina (glukuronska, iduronska)
- GAG so negativno nabiti - zaradi sulfatnih in karboksilnih skupin na sladk. ostankih → privlak kationov - ozmotska aktivnost → vezava vode na matrix (turgor) - omogoča, da matrix lahko vzdrži pritiske - npr. kolenski sklep
- verige so preveč toge, da bi se lahko zvijale v kompaktno strukture → konformacije, ki zavzamejo velik volumen glede na svojo maso → tvorba gela že pri nizkih koncentracijah

delitev (odvisno od sladk. komp., tipa vezave le-teh, št. in lokacije sulfatnih skupin):

- hialuronan - najnostavnejši, ponavljajoče sekvence nesulfatiranih polisaharidov
- dermatin sulfat, hondroitin sulfat
- heparan sulfat in heparin
- keratan sulfat
- *sindekani* - membranski proteoglikani - intracelularna domena se veže na aktinski citoskelet v celičnem korteksu, ekstracelularna domena pa nosi različno število hondroitin sulfatnih in heparin sulfatnih GAG verig.. Služijo kot receptorji za kolagen, fibronektin in ostale matrikalne proteine
- membranski proteoglikani delujejo kot *ko-receptorji*, ki sodelujejo z receptorskimi proteini na površini celice → vezava celic na matrix in iniciacija odgovora celic na rastne faktorje
- GAG verige lahko tvorijo gele z različno velikostjo por in naboja → delujejo kot selektivna sita za regulacijo prometa molekul glede na njihovo velikost in naboj
- pom. vloga pri kemični signalizaciji → vezava signalnih molekul kot so rastni faktorji - inhibicija lia aktivacija
- GAG vežejo in regulirajo aktivnost drugih tipov proteinov - proteaze, proteazni inhibitorji

\* imobilizacija proteina v bližini mesta sinteze

\* sterična blokada aktivnosti

\* rezervoar proteinov za zakasnjeno sproščanje

\* zaščita proteina pred proteolitično degradacijo - podaljševanje ativnosti

koncentracija proteina za bolj učinkovito prezentacijo površinskim receptorjem

### • Kolagen

- količinsko največ v celicah
- upiranje nateznim silam → mrežasta postavitve fibril - koža!
- fibrilaren protein, ki ga najdemo pri vseh večceličarjih
- nastaja znotrajcelično v procesu zorenja na ER. Tu se sintetizira kot  $\alpha$  veriga prokolagena z značilnim zaporedjem, ki vsebuje tudi dodatne AK - propeptide - pride do dodatka OH na Pro in Lys ostanke, dodatka sladkorja (na Pro in Lys) - glikozilacija. Pro  $\alpha$  verige se uredijo v trojni heliks, ki ga povezujejo vodikove vezi, ki jih tvorijo OH skupine. - prokolagen. Pri kolagenih, ki se izločajo iz celice, se propeptid odcepi - nastane kolagenska molekula. Nato pride do izločanja iz celice in povezovanja v kolagenske fibrile, ki ležijo ekstracelularno. (sir. 981)
- odcepitev propeptida spremeni prokolagen v kolagen → tvorba fibril

- vloga propeptidov:
  - - vodijo intracelularno formacijo trojne vijačnice
  - preprečujejo intracelularno formacijo fibril
- kolagen kot:
  - nitasta struktura - I, II, III, V, XI
  - mrežasta struktura IV. VII
  - pritrjevalne fibrile
  - pomagajo vezati bazalno lamino večceličnega epitela na vezivno tkivo; IX, XII. So bolj prožni od nitastih, po sekreciji propeptid ostane, ne tvorijo fibril v ekstracelularju. Posredujejo pri interakcijah med kolagenskimi fibrilami in matrixom ter fibrilami samimi → organizacija fibril v matrixu
- napake pri tvorbi kolagena:
  - *osteogenesis imperfecta*: mutacija kolagena tipa I; šibke in lomljive kosti
  - *hondrodizplazije*: kolagen tipa II; abnormalen hrustanec - deformacija vezi, sklepov
  - *Ehlers - Danlos sindrom* - mutacija kolagena tipa III - krhka koža, žile, hiper mobilni sklepi
- **Elastin**
  - elastičnost in moč ekstracelularnega matriksa
  - visoko hidrofoben protein, bogat s Pro in Gly, vendar ni glikozilirani in vsebuje malo hidrosiprolina in hidrosilizina
  - po sekreciji se elastinska vlakna formirajo v mreže
  - zgradba: hidrofoben segment - elastičnost, z Ala in Lys bogat  $\alpha$  - heliks, ki tvori povezave med molekulami
  - elastinsko jedro je pokrito s plastjo mikrofibril - glikoproteini - fibrilin - vloga pri povezovanju elastinskih vlaken
- **Fibronektin**
  - ekstracelularni protein
  - heterodimerna molekula - glikoprotein
  - 2 veliki podenoti D in L polovica nista popolnoma identični - povezava z disulfidnimi mostički in karboksilnimi konci
  - veže se lahko na kolagen, heparin, na spec. receptorje na celični površini,...
  - zadrževanje celic na mestu in njihove oblike, pa tudi vodenje celičnih migracij
  - pri rakastih se ne sintetizira, celice bolj gibljive
  - v embrionalnem stanju je drugačen kot v odraslem, spremeni se tudi pri nek. obolenjih (str. 987)
- **Integrini**
  - v plazemski membrani
  - so dimeri
  - spodaj vezani na eksoskelet
  - zgoraj lahko vežejo kolagen, PG,...
  - kolagen veže s spec. sekvenco, ki se pojavi tudi pri drugih ekstracel. prot., ki se prav tako lahko vežejo na integrin
- **Laminin**
  - eden prvih matrikalnih proteinov sint. v razvijajočem se embriju
  - zastopan v lamini - zunaj celice
  - iz 3 dolgih pp verig, povezanih z S-S vezmi v obliki asimetričnega križa
  - številne funkcionalne domene (vezavna mesta) - za IV kolagen, heparan sulfat, entaktin, laminin receptorje na pov. celice

- trdno vezan na membrano in pov. komponente ekstracel. matriksa
- **Bazalna lamina**
  - med endodermom in epitelom
  - sintetizirajo jo celice, ki ležijo na njej
  - je na bazi vseh epiteljskih celic, okrog mišičnih celic, maščobnih celic, v ledvicah v nefronu
  - - vloga:
    - ločuje celice od okolnega vezivnega tkiva
      - omogoča filtracijo krvi - glomerulusi
      - preprečuje prehajanje fibroblastov
      - determinira polarnost celic, vpliva na metabolizem, organizira proteine v plazmalemo
      - bariera za gibanje celic; razen pri rakastih celicah, limfocitih, mikroflagih, živčnih končičih
      - regeneracija tkiv po poškodbah
      - indukcija celične diferenciacije
      - vodenje celic ob potovanju med embriogenezo
      - molekularne sestavine:
        - kolagen IV - mrežaste strukture povezane z S-S vezmi
        - PG
        - laminin
        - entaktin
        - nidogen
    - **entaktin**: paličasta, fibrilarna molekula, 2 vezavni mesti za PG
    - **nidogen**: iz  $\alpha$  helikalne domene in globularne domene
    - komponente bazalne lamine sest. ploščato strukturo - kolagen kot ogrodje - šahovnica, ki zamreži laminin - onemogočen prehod celic
    - **rakaste celice**: nastanek primarnega tumorja - delitev metastatskih celic, ki se pritrjujejo na druga mesta in sledi razvoj sek. tumorjev. Celica, ki pride na neko drugo mesto mora najprej preiti bariero - bazalna lamina. Na tem mestu se razgradijo komponente ekstracelularnega matriksa. Glavna tarča je kolagen, ki se cepi s pomočjo metaproteaz - nastane luknja v lamini - penetracija metastatskih celic.
    - razgradnja ekstracelularnega matriksa - metaloproteaze, serinske proteaze

## SINTEZA, TRANSPORT CELIČNIH KOMPONENT

### ER - str. 577

- mrežasti labirint tubulov in sploščenih vreč, ki raztezajo preko cy; tubuli in vreče se povezujejo in tvorijo enotno strukturo, ki obdaja lumen ER
- membrana ločuje lumen od cy, in skrbi za selektivni transport lumen → cy
- **biosinteza lipidov in proteinov** za večino celičnih organelov → sam ER, GA, Ly, End, Sek. vez., My, Per → produkcija večine lipidov
- ER lovi spec. proteine iz cy: - transmembranski proteini, ki le delno preidejo skozi membrano in postanejo vključeni vanjo → ti prot. nato preidejo na druge organele
- vodotopni proteini, ki preidejo preko membrane v lumen → prot, namenjeni za notranjost organelov, ali za sekrecijo
- prot. se transportirajo v ER s pomočjo **signalnega peptida**
- pri sesalskih celicah protein prične migrirati v ER še preden je dokončno sintetiziran → **ko-translacija** → preprečena nevarnost gubanja proteina, preden bi dosegel translokator v membrani
- transport proteinov v My, Clo, Nukl, Per → **po-translacija** - potrebe drugačen signalni peptid → tu so prisotni cy **chaperoni**, ki skrbijo, da se protein ne more nagubati
- ribosom, na katerem se sintetizira protein je direktno pripet na membrano → **RER**

v cy torej dve vrsti ribosomov:

- membransko vezani ribosomi
- prosti ribosomi
- ribosomi so strukturno in funkcionalno enaki →azlikujejo se le po tem, da sintetizirajo različne proteine
- **ER signalni peptid** usmeri ribosom na membrano ER → mRNA lahko veže več ribosomov - nastane **poliribosom** - multipla rast polipeptidne verige
- po končani sintezi ribosom razpade in se vrne v cy
- ribosom se veže na membrano **z ribosomskim receptorjem**
- če mRNA kodira protein, ki nima signalnega peptida, poliribosom ostane v cy

### SER

- v celicah, ki so spec. za lipidni metabolizem → sinteza steroidnih hormonov,...
- hepatocite: produkcija lipoproteinskih partiklov, ki nosijo lipide po krvi na različne konce telesa
- encimi za sintezo lipidnih komponent se nahajajo v SER
- tu se nahajajo tudi encimi, ki so pomembni pri detoksifikaciji v lipidih topnih srupenih snovi - *citokrom P450 encimi*
- ER deluje kot skladišče  $Ca^{2+}$  → katalizira hitre odgovore na ekstracelularne signale → v ER visoka koncentracija proteinov, ki vežejo  $Ca^{2+}$  → še posebej zanjilno za SER mišic
- RER in SER lahko ločimo s centrifugiranjem → ER se po homogenizaciji fragmentira → pride do tvorbe **mikrosomov**. Pri RER najdemo ribosome vedno na zunanji strani mikrosoma, notranjost pa je ekvivalentna lumnu. Pri SER identifikacija ni tako lahka, ker so tu še fragmenti GA, MY, Per, End,...; razen pri hepatocitah, kjer je SER zelo intenzivno razvit.
- prosti ribosomi se posedejo na dno, ker so težji od mikrosomov, ki so vezani na membrano (lipidi)

**signalni peptidi:** - 30 AK, ki so vglavnem hidrofobne (prvi 1-2 sta hidrofilni, potem več hidrofobnih)

- signalna hipoteza → vodilni peptid deluje kot signalni peptid, ki usmerja protein na membrano ER in se nato odcepi stran s pomočjo signalne peptidaze v ER membrani še preden je polipeptid dokončan
- aminoterminalni ER signalni peptid vodi v ER proteini in prekursorje za proteine, ki nastajajo na ER - tudi topne proteine in membranske proteine
- ER signalni peptid je voden do ER membrane s pomočjo: - **SRP (signal - redognition particle)**, ki kroži med ER membrano in Cy ter veže signalne peptide → RNA iz 300 nukleotidov + 6 proteinov → prepozna hidrofobno zaporedje s pomočjo polipeptida **p54**, kjer so nakopičeni hidrofobni deli

**SRP receptor** - docking protein → iz 2 pp enot - večja podenota je vezavno mesto za SRP → omogoča vezavo SRP kompleksa na membrano

- SRP se veže na ER signalni peptid, kakor hitro pride peptid iz ribosoma → pavza v sintezi proteina, da se ima ribosom čas pritrčiti na membrano ER → zagotovljeno, da se protein ne odcepi v cy in ne naguba. To je pomembno predvsem pri sintezi različnih hidrolaz. Celice, ki sintetizirajo velike količine le-teh imajo v cy veliko inhibitorjev. Pavzo sinteze omogočata p68 in p72
- SRP ribosom kompleks se nato veže na SRP receptor, ki je integralni protein izpostavljen cy strani na membrani ER

- SRP se nato odcepi (s pomočjo GTP hidrolize), SRP receptor oddifundira lateralno po membrani in rastoča polipeptidna veriga se transportira preko membrane ER

**proteinski translokator:** iz hidrofилnih proteinov - ko se ustavi veriga v kateri je večji del hidrofoben se v tem kanalu ustavi - nastajajoča veriga prot. po tem kanalu prodira v lumen ER. Ti kanali so transmembranski proteini zgrajeni iz 3 različnih proteinov: Sc63p, Sec61p, Sec62p. Ti prot. omogočajo tudi vezavo ribosoma. So dinamične strukture, ki se odprejo, ko se ribosom z nastajajočim proteinom namesti na membrano in zaprejo, ko se ribosom odcepi

aminoterminalni ER signalni peptid se s pomočjo **signalne peptidaze** odcepi od pp verige v lumnu ER. Potrebno je pos. signalno mesto, ki ga prepozna signalna peptidaza

- ER signalni peptidi, ki se nahajajo znotraj pp verige se ne odcepijo, ker nimajo prepoznavnega dela za signalno peptidazo → ostanejo kot transmembranski proteini
- aminoterminalni ER signalni protein topnih proteinov ima dve funkciji:
  - usmerja protein na membrano
  - deluje kot **start - transfer signal**, ki ostaja vezan na translokacijski aparat, medtem ko ostali del proteina prehaja v obliki zanke preko membrane
- ko karboksilni terminalni konec preide v lumen se signalni peptid odcepi od translokatorke pore, se odreže od pp verige in se razgradi. Nastala pp veriga se sprostí v lumen.

## TRANSPORT, SINTEZA MEMBRANSKIH PROTEINOV

- **stop - transfer peptid = topogeno zaporedje** (hidrofobni segment) ustavi prehod peptida preko membrane še preden se prenese cela veriga. Veriga se torej zasidra v membrano, še preden se odcepi signalni protein. Stop transfer protein tvori enojen  $\alpha$  heliks, ki predira membrano. Amino konec peptida je v lumnu ER, karboksilni pa v cy.
- signalni peptid je lahko tudi znotraj pp verige - signalni peptid se v tem primeru zasidra v membrano in tvori  $\alpha$  heliks.
- tudi pri proteinih, ki ostajajo v membrani sodelujeta SRP in SRP receptor - lahko pride do cepitve s signalno proteazo ali pa ne
- med samo sintezo lahko protein enkrat ali večkrat prečka membrano - ko se v kanalu pojavi naslednje hidrofobno mesto na verigi, translokacija ne more več potekati. hidrofobni  $\alpha$  heliks ostane v membrani in ne dovoli, da bi se celoten protein transportiral v lumen
- peptid lahko preide membrano na dva načina - da je v lumnu amino konec (če je pri amino koncu str. 587) ali karboksi konec. (odvisno kako je signalni peptid orientiran v pp verigi)
- v lumen ER je vedno obrnjen  $\text{NH}_3$  konec (ni čisto nujno!). Orientacija je ves čas konstantna. Lumen ER je topološko ekvivalenten zunanji membrani - orientacija je lahko tudi drugačna - modifikacije; slika: str.587

Na ribosomu prihaja do translacije mRNA - nastaja **protein, ki se v lumnu RER modificira:**

- nastanek S-S vezi
- nagubanje prot
- začetna glikozilacija v lumnu ER - modifikacija oligosaharida pa kasneje v GA
- nastanek oligomerov - več pp verig
- ko je protein ustrezno formiran lahko zapusti ER v transportnem veziklu, če pa je prišlo pri modifikaciji do napake ne zapusti ER - dober kontrolni mehanizem, drugače lahko pride do avtoimunskih reakcij, če bi se tak protein pojavil v membrani kot integralni prot.
- reziduentni prot. lahko prehajajo v GA, obstajajo pa tudi mehanizmi, ki omogočajo vračanje prot. nazaj v ER

- *proteini v lumnu ER*

- **katalizatorji:** - odgovorni zato, da se proteini, ki so prišli v ER pravilno zvijejo



- **PDI** (proteindisulfid izomeraza), ki katalizira oksidacijo SH → nastanek S-S vezi, ki pa se ne tvorijo na cy strani zaradi reducirajočega okolja
- **Peptidil prolil izomeraza** - ta dva encima sta tudi reziduentna prot. ER. Pri sintezi proteinov v lumnu kjer je oksidacijsko okolje, je velika verjetnost, da pride do napačnega nastanka S-S vezi (povezava SH koncev). PDI razgradi prvotne S-S vezi → omogoči nastanek novih vezi, ki ustrežajo pravi konformaciji
- **signalna peptidaza** - v lumnu ER; prepozna mesto, kjer se signalno zaporedje konča - odcepi verigo od signalnega zaporedja - protein preide v lumen ER signalna peptidaza
  - topni proteini se med samo sintezo običajno še glikozilirajo
- **chaperoni - katalizatorji gubanja - hsp proteini** - prisotni tudi v cy; vežejo se na določene dele proteina in preprečujejo spontano gubanje proteinov. Ko se protein dokončno sintetizira, se odstranijo in protein se lahko naguba. Hsp proteini postanejo aktivni, ko se zaradi povišane T proteini razgubajo in deformirajo. Ko T pade pomagajo, da ne pride do napačnega gubanja.
  - vloga chaperonov:
    - preprečujejo nepravilno gubanje
    - pomagajo pri pravilni vzpostavitvi S-S veti

#### **BiP (binding protein) chaperon:**

- sodi v **skupino hsp** in je katalizator gubanja
- pomaga, da se protein v ER pravilno naguba in popravlja napačno nagubane proteine
- - protein ostane primarno vezan na BiP - prepreči, da bi napačno grajen protein šel iz ER naprej
- veže se na tisti del proteinske molekule - na mesta, ki bi bila ob normalni konformaciji skrita v notranjosti proteina; na mesta, ki imajo večje hidrofobne AK (Trp, Phe,..) na vsaki drugi poziciji → protein se zaradi tega pravilno naguba - ta vezava je zelo ugodna - ni potrebna nobena E. Da pa se protein BiP sprostí je potrebna energija - BiP veže ATP - hidroliza - sproščanje
- do sproščanja ne pride dokler sinteza proteina ni konča na; vezava še ostalih proteinov, ki so poleg BiP v ER
- če konformacija poteče napačno, BiP ne more vezati ATP, ni E za sprostitev

#### **Glikozilacija proteinov:**

- ena pomembnejših funkcij ER; v cy je glikoziliranih zelo malo proteinov, tisti, ki pa so nosijo zelo enostavne sladkorje
- v začetku poteka še kotranslacijsko v ER - medtem, ko se protein sintetizira, se pripne na rastočo verigo oligosaharid. Vsaka AK ni ustrezna - mora biti Asn - **Asparagin - vezan oligosaharid = N vezani oligosaharidi** poznamo pa še - **O vezane oligosaharide** - vezava sladkorja preko OH - Serina - ta glikozilacija poteka v GA
- pred Asn je lahko katera koli AK, sledi pa Thr
- vezavo katalizira **oligosaharid protein transferaza**, katere aktivna stran se nahaja v lumnu ER
- prekursor za oligosaharid je vezan na ER membrano s pomočjo **dolihola** (vezana sta s P vezjo) in se prenese do tarčnega Asn v enem samem koraku, takoj, ko pp veriga preide skozi membrano v lumen
- N glikozilacija: naenkrat se pripne celoten oligosaharid: - 14 sladk. ostankov; 2 N-acetilglukozamina, 9 manoz, 3 glukoze. Sodeluje en sam encim - *oligosaharid protein transferaza*.
- oligosaharid se sintetizira v ER - na dolihol se pripenjajo pos. sladkorni ostanki, ki so vezani z nukleotidi → visokoenergetske vezi → sinteza na dolihol vezanega oligosaharida -

dodajanje pos. sladkornih komponent - se prične na citosolni strani ER, kjer se na dolihol pripenjajo 2x N acetilglukozamin,.... Potem s pomočjo flip - flopa ta polovica oligosaharida preskoči na notranjst - lumen ER - potrebni kanali, ki prepuščajo aktivirane sladkorje, nukleotid, pa se vrne v citosol.

- encim, ki katalizira prenos celotnega oligosaharida na ustrezno mesto Asn
- v samem ER se potem ta oligosaharid do neke mere spremeni - do spremembe pride, ko je celoten oligosaharid pripet (končne 3 glc- signal, da je oligosaharid končan in šele tedaj se lahko pripne na Asn)
- prve modifikacije - procesiranje že v samem ER:
  - odcep 3 glc
  - odstranitev 1 man → trimanje
- prot., ki vstopajo v cis GA - N - acetilglukozamin, 8 manoz
- nadaljna modifikacija poteka v GA
  
- **membr. prot so lahko vezani na lipid** - več cy encimov katalizira kovalentno adicijo MK ali prenilne skupine na izbran protein → pomaga pri usmerjanju proteinov na membrano - analogen proces je kataliziran s pomočjo encimov v lumnu ER
  - karboksilni konec nek. membranskih proteinov (za plazmalemo) je kovalentno povezano na sladkorni ostanek
  - končana sinteza proteina → pp veriga ostane vezana v membrano s hidrofobnim karboksilnim koncem → sledi odcep; karboksilni konec ostane v membrani → istočasno pride do vezave na N-terminalni konec glikozilfosfatidilinozitolnega intermediata (GPI), ki je bil že prej vezan na membrano (COO prisoten v citosolu, hidrofobna sekvenca se ustavi v translokacijskem kanalu, protein pride v lumen ER. Endopeptidaza (v lumnu) prepozna zaporedje in odcepi ta protein. Tu pa je tudi en oligosaharid na katerega je vezan etanolamin. Ob cepitvi endoproteaze se z etanolaminom veže GPI, ta pa se poveže še s proteinom . Ta se na plazmalemi obrne v ekstracelularni prostor.
  
- **GPI (glikozilfosfatidilinozitolno sidro)** - lažja lateralna difuzija znotraj lipidnega dvosloja
- citosolni konec vezan na citoskelet → fiksnost
  
- reziduentni proteini: na COO- koncu zaporedje AK - **KDEL (Lys- Asp - Glu - Leu) = retencijski signal** - omogoči vrnitev proteina iz cis GA nazaj v ER. Receptorji, ki prepoznajo to zaporedje pošiljajo prot. ER → GA. Pride do obratnega transporta.
- receptorjev za reziduentne proteine v ER je manj kot v cis GA, največ pa jih je v transportnih veziklih
  
- ER lahko zapusti le pravilno simtetizirani protein. Če se pojavi ena sma sprememba, prot. ne more zapustiti ER:
  - ireverzibilno vezan na BiP chaperon
  - ne pride do zapakiranja v transportni vezikel (str. 602)

#### bolezni:

- pljučni emfizem
- cistična fibroza - rezidui, kjer pride do sprem. ene same AK, ki zato ne more zapustiti ER

#### nastajanje lipidnega dvosloja v ER

- lipidni dvosloj nastaja na že obstoječih membranah gladkega ER, ker na GER ni več prostora za te encime
- gladek ER ni enako razvit v vseh celicah, leži med GER in GA; v celicah, ki aktivno sodelujejo pri biosintezi lipidov pa je gladek ER močno razvit (prevladuje) - tu poteka sinteza fosfolipidov

- sinteza glikolipidov poteka v GA
- fosfolipidi:
  - fosfatidilholin
  - fosfatidilserin
  - fosfatidiletanolamin

### **sinteza holesterola in ceramida**

- ⇒ sinteza na citosolni strani ER. Ker so ATP in drugi gradniki prisotni v citosolu; encimi, ki sodelujejo pri sintezi so vgrajeni v membrano ER, z aktivnimi deli obrnjeni proti cy
- **glicerol - 3P + MK - CoA** → fosfatidna kislina → diacilglicerol (*fosfataza; odcep P*) → 1,2 diacilglicerol
    - + **aktiviran etanolamin** → *fosfatidiletanolamin*
    - + **serin** → *fosfatidilserin*
    - + **holin** → *fosfatidilholin*
  - raste le citosolni sloj membrane - prihaja pa do flip - flopa iz cy dela v lumenski → počasi - pomoč **flipaz = fosfolipidni translokator** - ti encimi pospešijo flip - flop
  - sinteza lipidov de novo mora biti uravnotežena, da oba sloja rasteta enakomerno
  - zaradi neenakomerne afinitete lipaz se v cy delu plazmaleme nahaja več lipidov ene kot druge vrste → flipaze imajo največjo afiniteto do fosfatidilholina

### **prenos na gladkem ER sintetiziranih lipidov v GA, lizosome, plazmalemo**

- My, Per, Clo ne sintetizirajo lipidov de novo
- prenos v my, peroksisome, kloroplaste - s pomočjo **fosfolipid zamenjevalnih proteinov (FZP)**, ki ekstrahirajo fosfolipid iz gladkega ER in ga prenesejo v tarčni organel, kjer se vgradi. Protein se nato vrne nazaj - kroženje FZ proteinov - ni vezikularen transport

### **prenos lipidov iz ER v duge organele** - več v vezikularnem transportu

- iz donorskega kompartimenta (ER, GA, plazmalema), nastane brst s pomočjo raznih proteinov (klatrin,..). Iz brsta nastane vezikel s sekretom, ki prepozna točno določeno mesto in se zlije s tarčnim kompartmentom
- orientacija membrane je ves čas ista - lumen ER, GA so topološko ekvivalentni celični zunanosti. Proteini ostanejo ves čas enako orientirani - glikozilirani v lumnu GA - ob zlitju s plazmalemo se ta del odviha navzven.
- potek transporta: - *sekrecijski proteini*: ER → GA
  - sekrecijska zrna
  - lizosomi (razgr.)

## **VEZIKULARNI TRANSPORT**

### **GA**

- struktura endomembr. sist. iz sploščenih cistern; močno prisoten v mukoznih - sekretornih celicah
- tu poteka sinteza ogljikovih hidratov, proteoglikanov in sortiranje produktov, ki so nastali v ER ter transportiranje produktov v Ly, na membrano,...
- za glikozilacijo so potrebni nukleozidi; uporabljajo jih glikozil transferaze
- lociran je blizu jedra, centrosoma
- delitev:
  - cis omrežje → vezikli, ki prihajajo iz ER
  - GA skladovnica - cis mediane in trans cisterne → modifikacija
  - trans omrežje → vezikli, ki izhajajo iz GA v Ly, Sekrec. zrna, plazmalemo
- vsak od the delov vsebuje spec. encime, v vsakem delu pa je tisti produkt, ki pride iz ER substrat → modifikacija → substrat za naslednji sklop cistern

- vsako modifikacijo katalizira svoj encim, za razliko od sinteze, kjer je prisoten le 1 encim!

encimi so reziduentni prot., ki ostajajo v GA

- med samimi deli GA poteka vezikularni transport
- prot., ki omogočajo vez. transport - *klatrin*
- pri prehajanju cis → trans GA nastajajo v glavnem **3 vrste nevezanih oligosaharidov**:
  - **visoko manozni** - ostane tak kot pride iz ER
  - **hibridni / kompleksni** - poleg N - acetilglukozamina in manoz še galaktoza in sialične kisline
- kompleksni - le 3 manoze. ki se nikoli ne odcepijo; jedro iz 2 N - aminoglukozamina in 3 manoz + sialične k., laktoze,... → nastanejo po trimanju oligosaharidov, ki so nastali v ER  
slika 13-11 str. 605 !
- vsak set cistern vsebuje svoje encime
- cis GA: - najprej se odcepijo 3 manoze, v medianem delu GA še dve. Doda se 1 N - acetilglukozamin in potem še 2, potem 1 glukoza
- trans GA - končno se dodata še galaktoza, sialična kislina → glikozilacija je končana, sledi zapiranje v vezikle in transport v tarčne organe
- sladkorji se odcepljajo in dodajajo drug za drugim in vsako reakcijo katalizira drug encim
- glikozilirani prot. se razvrstijo v trans GA → pakiranje v transportne vezikle in transport na spec. mesta. Če to razvrščanje ni pravilno prihaja do bolezni - pomanjkanje raznih lizosomskih encimov, kopičenje določenih prod. v celicah
- GA - sinteza še **O vezanih oligosaharidov** - manjša skupina sladkorjev, ki se vežejo drug na drugega: 1. N - acetilgalaktozamin - oligosaharidi se vežejo prek OH na serin Ser oz Thr
  - gre za vezavo kompletnega oligosaharida
    - 2. galaktoza
    - sialična kislina
- GA - še sinteza glikolipidov in sfingomielina, ostali lipidi se sint. v ER, kjer se sint. tudi prekursor cermid za sint. GL in SM → razvrščanje produktov na različna mesta

Ly encimi se ločijo od ostalih proteinov v trans GA z membransko vezanim receptorjem, ki prepozna manozo-6P

- ločitev lizosomskih encimov od ostalih produktov iz ER poteka že v cis GA, zato da se prepreči nadaljne odcepljanje manoznih ostankov. Imajo 8 manoznih ostankov → do označevanja s 6P prihaja že zelo zgodaj
- **cis omrežje** - N acetilglukozaminfosfotransferaza, ki pripne N acetilglukozaminP (NagP) na manozo. Ta encim prepozna tudi konformacijo proteina - notranji signalni vzorec - protein mora biti pravilno naguban, da ga encim prepozna kot svoj substrat. Ta encim ima 2 aktivni mesti:
  1. prepozna prot.
  2. katalizira prenos NagP na manozo. V naslednji stopnji se s pomočjo **NagP glikozidaze** Nag odstrani, P pa ostane vezan na manozo (**M 6P**)
- tako označeni glikoproteini se v transportnih veziklih razvrstijo - vezava na dol mesta v trans GA, kjer je za **M6P spec. receptor**
- od trans GA se vezikli odcepljajo s pomočjo klatrina
- glikoprotein označen z M6P → trans GA; pH = 7 - vezava liganda na receptor s pomočjo klatrinskega plašča → vezikli s tem plaščem vsebujejo te specifične receptorje

- klatrin se sprosti takoj po odcepitvi vezikla → združitev vezikla s poznimi endosomi → znižanje pH na 6, ligand se loči od receptorja, receptor pa se vrne nazaj v trans GA. Lizosomski encimi so v poznih endosomih - pH še dodatno znižan.
- gre za membransko recikliranje - str. 615!
- **I cell bolezen** - v celicah veliki vključki namesto ribosomov - gre za nerazgrajene dele, ki so v celico prihajali od zunaj. Ni oznake z manozo-6P - ni zapakiranja v vezikle temveč po konstitutivnem transportu zapuste celico - so ekstracelično - gre za okvaro encima, ki katalizira označevanje manoz s 6P - ni encima NagP transferaze, ni označitve manoze v M6P - izločanje po konstitutivni poti

### LIZOSOMI

- celični organeli - **intracelularna prebava**
- vloga: prebavljanje različnih substratov, ki prihajajo vanje na več načinov - stičišče dveh poti: biosintetske ali sekrecijske in endocitotske
- ly postane aktiven, ko dobi substrat
- so zelo heterogene strukture, ki vsebujejo celo vrsto **hidrolitičnih encimov (kisle hidrolaze)** - do 50 različnih encimov, ki razgrajujejo vse celične komponente: P, M, CH<sub>2</sub>O, NK - če kakšen od teh encimov manjka - kopičenje substratov v celici
- encimi za delovanje potrebujejo **kisel pH = 5** → zaščita celice pred lastnimi encimi: membrana, pH v cy = 7.2
- **membrana** - omogoča prehod snovi (AK, CH<sub>2</sub>O, NK), ki so nastale pri prebavi v cy
  - - H<sup>+</sup> - črpalka
    - črpa H<sup>+</sup> ione v celico, da zagotavlja nizek PH, pri tem porablja ATP
    - nizek pH omogoča odcep receptorja od liganda
  - močno glikozilirana, zato, da predstavlja veliko oviro za prehod encimov v citosol
- pojedeni material se najprej transportira v endosome, šele nato v ly
- ly identificiramo s pomočjo encimske histokemije
- v ly prihajajo produkti po različnih poteh; razgraditi se morajo produkti iz celične zunanosti (nekoristne snovi ali molekule, ki jih celica potrebuje, razgradnja lastnih delov celice)
- ly se zlivajo z večjimi vakuolami, ki nastajajo po treh različnih poteh:
  - *fagocitoza*; fagosomi
  - *endocitoza*; endosomi
  - *avtofagija*; avtofagosomi

#### **fagocitoza**

- celično prehranjevanje - tega niso sposobne vse celice - lastnost makrofagov in levkocitov
- vnos večjih delcev v celico - to so lahko bakterije, odmrle celice. Makrofagi ob vezavi bakterij na receptorje iztezajo psevdopodije, ki te bakterije obdajo. Bakterija ostane v ly, kjer jo hidrolitični encimi razgradijo.

#### **endocitoza**

- prihod manjših molekul in tekočin v celico
- endosomi se nato zlijejo z ly → nastanejo encimi, ki jih celica nato porabi naprej

#### **avtofagija**

- nastanejo avtofagosomi - odstranjevanje nerabnih snovi v sami celici
- hepatocite - veliko gladkega ER, vsebujejo veliko encimov, ki spreminjajo v lipidih topna zdravila v v lipidih netopna zdravila, ki se izločajo z urinom.
- del citosola z organeli se obda z membrano ER - nastane avtofagosom, ki se zlije z ly → končni produkt so rezidualna telesca z razgrajenimi produkti
- različni substrati - različni ly - heterogen izgled, vendar iz morfologije ne moremo sklepati, kaj ly vsebuje.

## RAZVRŠČANJE V TRANS GA

### ENDOCITOZA:

- pride do invaginacije citoplazme - vezikel, ki vsebuje ione, molekule, .. iz cel. zunanosti
- drugi način je fagocitoza - spec. endocitoze
- endocitoze so zmožne vse celice
- *tekočinska (fluid phase) - pinocitoza* - neselektivna, v endocitotskem veziklu je tekočina z razpadlimi snovmi, ki se nahajajo v okolici, konstitutiven proces, ki se redno dogaja. Ekstracelična tekočina se ujame v pokrite jamice, tvori se vezikel.
- *receptorska - fagocitoza* - izbere se spec. substanca - iz razredčene tekočine se izberejo le tiste, ki so potrebne - lahko pride do koncentriranja; sprožen proces, ki potrebuje dražljaj, da se sproži → npr. protitelesa
- na plazmalemii so določeni receptorji - transmembranski proteini, ki spec. vežejo določen ligand. Receptorji so skoncentrirani na delu plazmaleme. ki je na citosolni strani pokrita s *klatrinom* - slika:

#### ⇒ *fagocitoza*

- oblika endocitoze → nastajanje **fagosomov**, ki vključujejo velike partikle - MO, org. delce,..
- pri enoceličarjih je oblika hranjenja, pri večceličarjih → fagociti (makrofagi, nevtrofilci)
- partikli končajo v lizosomih → po koncu prebave ostanejo **rezidualna telesa**
- fagociti imajo na površini pos. receptorje, ki prepoznajo dol partikle

#### ⇒ *pinocitoza*

- pri tvorbi veziklov se cel površine manjša → simultano poteka eksocitoza - gre za **endo - eksocitotski cikel**
- receptorska endocitoza je zelo hiperaktiven proces - hitro kroženje membr. veziklov, zato je površina celice vedno enaka.
- endocitoza se ponavadi vrši na spec. regijah - **klatrinski pokrite jamice** - klatrin se formira v mrežo, košaro na cy strani plazmaleme V njih se konc. receptorji in določeni ligandi, iz pokritih jamic se formirajo **pokriti vezikli**, ko protein dinamin tako jamico odščipne. Med klatrinom in citosolnim delom receptorja se še adaptini, ki specifično vežejo receptorje.
- s klatrinom pokritih mest na plazmalemii je 2%
- kmalu po odščipnenju klatrinski plašč odpade (0,1s) - endosomski vezikli se zlijejo z zadnjim endosomom - v njem še vedno vezani ligandi na receptor. Klatrin se v obliki triskelion vrne nazaj na plazmalemo.
- iz zg endosome se receptorji vračajo na plazmalemo zaprti v vezikle, lahko pa gredo v razgradnjo
- že vzg. endosomu se ligand loči od receptorja zaradi spremembe pH - aktivno črpanje H<sup>+</sup>

### receptorska endocitoza

- hiperholesterolemija - pov. konc. holesterola v krvi - nalaganje v steno žil - infarkt
- V celici obstaja pos. receptor, ki veže holesterol v obliki LDL partiklov in tako je sproščanje v kri preprečeno

### LDL - low density lipoproteini

- v obliki partiklov kroži po krvnem obtoku. Tu je holesterol zaestren z zelo dolgo MK in s tem hidrofoben Ta partikel je obdan s plastjo fosfolipidov, vmes so še pos. mol holesterola. Fosfolipidi so adsorbirani na skupek holesterolnega estera. Zraven je še apoprotein B100, ki je ligand za holesterol. Receptor omogoči, da se holesterol vnese v celico.

- holesterol receptor se le malo spremeni in hol. se ne more več vnesti v cel., ampak se izloča v kri
- Ko celica potrebuje holesterol naredi **LDLreceptorje** in jih vgradi v membrano. LDL receptorji nato difundirajo po membrani in se združijo s klatrinskimi pokritimi jamicami → vnašanje LDL partiklov v celico. Vezikli se združijo z zg. endosomi, ki se nahajajo blizu celične periferije. Sledi prenos v pozni endosom in nato v Ly, kjer se holesterolni estri hidrolizirajo in sprostijo holesterol, ki postane uporaben za sintezo mambrane.
- vezava liganda na receptor povzroči konformacijsko spremembo - laterana difuzija receptoja v coated pit
- pri holesterolu so receptorji že spravljeni v pokritih jamicah, klatrinsko omrežje pa preprečuje, da bi se vezal kakšen drug receptor
- združevanje veziklov v zg. endosome → zorenje v pozni endosom. Če se združuje več veziklov, je ATP - aznih črpalk več - PH se zniža. Po združitvi s hidrolitičnimi encimi je pH = 5 (pozni endosom) - ligand LDL se loči od receptorja. Receptorji se v obliki veziklov odščipnejo in se vrnejo na plazmalemo - z lateralno difuzijo se zberejo v pokritih jamicah
- pozni endosom, ko ni več receptorjev - združitve z vezikli, ki prinašajo lizosomske encime, nastane ly, kjer se LDL partikli razgradijo:
- prot. B → AK
- holesterolni ester → MK + holesterol, ki difundira v cy - vgrajevanje v membrane in blokada lastne sinteze, če ga je dovolj
- ly s označeni z manozo - 6P. Receptorji, ki to prepoznajo se nahajajo v trans GA omrežju - v cy pokritih jamicah
- ko je v celici dovolj holesterola, se konča lastna sinteza holesterola in sinteza LDL receptorjev

#### LDL receptor je transmembranski protein, ki ima:

- velik ekstracelularni del - vezavno mesto za LDL, ki prepozna apoprotein B na LDL partiklu
- N - vezani oligosaharid
- O - vezani oligosaharid
- hidrofoben  $\alpha$  - heliks - 22AK
- cy rep - 50AK

slika:

- bolezen - napaka v cy repu - namesto tirozina je cistein. Ta del je odločilen za vezavo na spec. adaptin. Receptor se ne more vezati na klatrin, ne more nastati pokrita jamica. Ker LDL ne more priti v celico se sinteza lastnega holesterola ne more regulirati in celica holesterol izloča v kri. Lahko pa da receptorjev na celicah sploh ni - še hujše okvare

#### **vnos FE- transferin (prot) - vezava 2 FE → ferotransferin, če FE ni vezan - apotransferin**

- pride do spremembe konformacije proteina, ki se veže na transferinski receptor (ta prepozna svoj ligand) → konformacijska sprememba receptorja → berejo se v klatrinskih pokritih jamicah → pokrit vezikel → izgubi klatrinski plašč → zg. endosom preide v poznega, ta se zlije z ly encimi, pri tem se zniža pH (5,6) - iz ferotransferina oddisociira FE, transferin pa se ne loči od receptorja. Receptor z apotransferinom se vrne nazaj na plazmalemo. Ob zlitju s cel. površino se spremeni konformacija zaradi spremembe pH - apotransferin oddisociira od receptorja.

#### **receptorji za rastne hormone (EGF)**

- receptor in ligand gresta v pozni endosom → receptorji in ligandi se razgradijo → zmanjša se št. ligandov in vnos hormonov v celico je preprečen - down regulacija

- nekaj lizosomskih encimov gre po konstitutivni poti iz celice, vendar se vračajo nazaj z receptorsko endocitozo - "najačna pot"
- polarizirane celice - lahko gre za transcitozo - določen produkt se prenaša iz apikalne plazmaleme s pomočjo receptorske endocitoze na bazolateralno stran - tu igra pom. vlogo pH. Znotraj celice potujeta ligand in receptor skupaj

#### nepolarizirana celica:

- trans GA →
  - vezikli v endosomski kompartment, prinašajo lizosome
  - vezikli s konstitutivno sekrecijo na plazmalemo

#### polarizirana celica:

- trans GA - transport:
  - vezikli v endosomski kompartment - to omogoča klatrinski plašč ligandov in receptorjev
  - vezikli na bazolateralni del s konstitutivno sekrecijo, imajo spec. signale
  - vezikli, ki potujejo na apikalni del imajo druge signale, tudi konst. sekrecija

#### EKSOCITOZA:

- **transport veziklov na cel površino = konstitutivna sekrecija**
  - transport veziklov, ki nimajo klatrinskega plašča in se zlivajo s plazmalemo
  - ta vrsta transporta poteka pri vseh celicah
  - gre za neke vrste eksocitozo - v plazmalemo se vgrajujejo nove membrane - vsebina se izloča, ekstracelular (npr. mukus)
  - ta sekrecija ni odvisna od zunanjega stimulusa
- **regulirana sekrecija**
  - pri sekrecijskih celicah
  - vezava neurotransmiterja na celično površino
  - zlitje plazmaleme in vezikla - izločanje
  - povečana konc. citosolnega  $Ca^{2+}$  - proženje sekrecije
  - pankreas: za regulacijo sekrecije se izloči inzulin, po drugi strani pa encimi, ki sodelujejo pri prebavi - tripsin

slika:

- produkti sekrecijskih zrn se sint. v ER, modificirajo v GA. Iz trans GA se odcepljajo v obliki veziklov, ki so sprva manjši, potem se zlijejo v večja. Nato se gre voda iz zrn v cy → kondenzacija = **zrela sekrecijska zrna**. pri nezrelih vsebina ni kondenzirana
- zrela sz. se nabirajo med jedrom in GA ter delom, kjer se bo izvršila eksocitoza, ki se izvrši s stimulusom
- konstitutivna in regulirana sekrecija vodita do povečanja cel. površine. Poteka pa tudi endocitoza, s pomočjo katere se membrana vnaša v notranjost - v celoti se P celice ne spremeni
- različne vrste sekrecije - večinoma so polarizirane
  1. apikalna površina
  2. bazolateralna površina
  - površini sta opredeljeni s tesnimi stiki. Del transporta poti sekrecije gre v teh celicah lahko na obe strani.

**sekrecijske celice:** kopičijo spec. sekrecijske produkte, vezikli zorijo iz nezrelih sekrecijskih zrn v zrele sekrecijske vezikle - regulirano izločanje ob stimulusu, del se izloča s konst. eksocitozo. Pri nepolarizirani celici je del veziklov označenih s klatrinom, pri polarizirani celici je razlika v signalih za apikalni oz. bazolateralni del. Po eni teoriji naj bi imela vsaka celica vse vrste



razvrščanja in sekrecije. S tem be bi bila več potrebna delitev celic na polarizirane in nepolarizirane. Razlika je le v intenzivnosti teh transportov.

- eksperimenti - ugotavljanje proteinov, ki omogočajo brstenje veziklov - usmerjanje do tarčnih membran

#### specifičnost transporta zagotovljena z:

- *citosolni proteini* - obstajajo neki hipotetični modeli, ki še niso povsem pojasnjeni. Obstajajo proteini na cy strani membrane.
- *klatrin* - preko različnih adaptinov povezan na cy del transmembranskega proteina. Adaptini specifični za pos. citosolni del
- *koatomere* COP I,II - coating proteins - tvorijo plašč. povzročijo nastanek pokritega vezikla

- 2 vrsti veziklov:

- klatrinski vezikli - selektivni transport
- koatomerni vezikli - neselektivni transport

#### ⇒ klatrinski vezikli

- vloga klatrinskega plašča:
  - sila, ki potegne membrano skupaj v vezikel
  - lovljenje delcev
- nastanek cy veziklov - sodelovanje BE na cy strani - **klatrin** - se uredi v mrežasto strukturo, preko **adaptinov** povezan na cy del transmembr. prot. (klatrin - vezavno mesto za adaptin na koncu težke verige
- poleg klatrina sodelujejo še: **COP I in COP II (coating proteins)** - tvorijo plašč in povzročijo nastanek pokritega vezikla - koatomernega vezikla
- slika:
- klatrin - 3 težke in 3 lahke verige, ki skupaj tvorijo **triskelion** - na koncu težke verige je mesto za vezavo na adaptin
- po odščipnjenju vezikla klatrinski plašč odpade: ATP → ADP, chaperon se odstrani od plašča, klatrinski plašč depolimerizira; klatrinski triskelioni ostanejo v cy
- hepatocite - **hsp 70** - chaperon, ki z vezanim ATP sodeluje pri nastanku klatrinskega plašča - ob hidrolizi ATP nastane konformacijska sprememba, ki povzroči odcepitev chaperona in plašča
- nastanek klatrinskega plašča - v veziklih s hidrolitičnimi encimi v trans GA
- sodeluje tudi pri receptorski endocitozi (vnos različnih partiklov)

#### ⇒ koatomerni vezikli

- neselektiven vezikularni transport ER → GA, GA → plazmalema
- vezikularni transport ER → cis GA, in obratno - vračanje rezidualnih BE, eksocitoza - v teh primerih tvorijo plašč **koatomere - COP - i** - za formacijo potrebujejo ATP, na membrani vezikla ostajajo vse dokler se vezikel ne sprosti
- tu sodelujejo cy prot., ki ima vezan GTP - ob nj. hidrolizi se plašč sprosti. Ta pr. se imenuje **ARF (ADP Ribozilacijski faktor)**
- koatomerni plašč II pomaga pri brstenju veziklov iz ER v cis GA in iz trans GA v plazmalemo
- koatomerni plašč I nastaja v cis GA in nato potuje nazaj v ER - vračanje rezidualnih prot.
- transport med pos. cisternami GA - tudi tu sodeluje koatomerni plašč I
- konstitutivna sekrecija: iz trans GA se odcepljajo vezikli, na m. se veže ARF z vezanim GTP, ta omogoča vezavo pos. koatomer → plašč - pokriti vezikel. Tudi ta plašč takoj po

- odščipnjenju vezikla odpade - GTP → GDP - pride do konformacijskih sprememb v koatomeru - GDP pride v cy, enako koatomeri - gol vezikel je sposoben zlitja z membrano
- plašč omogoča nastanek vezikla
- trans GA - načini za izmenjavo ARF z GDP - ARF - GTP lahko zopet tvori plašč - str. 642!
- **kaveolinski vezikli** - tvori še dodatne pokrite vezikle - odkrili so jih na epitelnih celicah tankega črevesa - znotraj mikrovilov so majhne jamice, okoli katerih je kaveolin
- slika:

### Zlitje vezikla z membrano:

- zlivanje membran mora biti visoko selektivno
- vsak pokrit vezikel ima transmembr. prot. **v- SNARE**, tarčna membr. ima **t- SNARE** - morata se srečati, kar omogoči dod. cy prot. - **Rab prot. (GTP-aza)**, ki preverja kompatibilnost v in T SNARE - z njihovo pomočjo se da ugotoviti, kam gre transportni vezikel, Se enaki pri kvasovkah in pri sesalcih. Vežajo se na vezikel in ga pripeljejo do tarčne membrane, tam se zopet sprostijo
- slika:
- citosolni proteini SNAP in NSF tudi omogočajo prepoznavanje veziklov in tarčne membrane
- slika:
- **kroženje Rab proteina**
- v cy vezan GTP - hidroliza, v cy se nahaja inhibitor, ki se veže na Rab, ko je na Rabu vezan GDP
- ko se RAB veže na vezikel, se spremeni konformacija Raba tako, da se inhibitor sprostí v citosol. Namesto GDP se veže na Rab GTP (Ko je Rab v cy, je nanj vezan GDP - vezava na vezikel - odstrani se vezikel, veže se GTP) - Rab je aktiven - pripelje vezikel do tarčne membrane. Vezava tarčne membrane z veziklom - nastane Rab GDP, konf. se spremeni - na Rab se veže inhibitor in ga odstrani iz membrane. Inhibitor naj bi preprečeval nespec. vezavo Raba na membrane.

v - SNARE: Soluble NSF Attachment protein Receptor

NSF: N - ethylmalinide Sensitive Factor

SNAP: Soluble NSF Attachment Protein

*Za zlitje membran so potrebni transmembranski proteini v veziklih in tarčnih membranah. Potrebni so tudi cy prot., ki delujejo s pomočjo GTP in še dodatnih proteinov.*

- slika:

### PEROKSISOMI

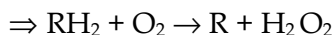
- cel organeli, ki jih najdemo v vseh celicah - največji v hepatocitah in ledvičnih celicah
- v njih se nahaja **katalaza**, različne **peroksidaze**
- po funkciji podobni My in Clo, po morfologiji pa Ly:
  - - enojna membrana
  - brez DNA in ribosomov
  - proteine dobijo iz cy

### funkcija:

⇒ lipidni metabolizem - **β oksidacija MK**, sinteza holesterola in dolihola (nanj je vezan oligosaharid pri glikozilaciji BE v ER), v možganih sintetizirajo plazmaligen - fosfolipid, kjer je MK vazana na - OH preko etrske vezi

⇒ **razgradna H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: pri delovanju je stranski produkt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ki za celico škodljiv - zato je prisotna katalaza - histokemični test - dokaz, da je katalaza v strukturi - vemo, da gre za peroksisom

⇒ enačbe:



⇒ peroxidativna reakcija:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}'\text{H}_2 \rightarrow \text{R}' + 2\text{H}_2\text{O}$  v prisotnosti katalaze oksidacija št. spojin → v jetrih, ledvicah → detoksifikacija

⇒  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  - v primeru če se odvečni peroksid nabira v celicah

⇒ rastline - dva tipa peroksisomov: glioksilatni cikel (glioksisomi), fotorespiracija

### **nastanek peroksisomov:**

- z delitvijo že prej obstoječih peroksisomov
- BE se sint. na prostih rib. v cy (za razliko od lizosomov) - brez spremembe signalnega zaporedja pridejo v lumen oz. v membrano peroksisoma
- signalno zaporedje: 3AK na COO<sup>-</sup> koncu - Ser - Lys - Leu - COO<sup>-</sup>; se ne odcepi, usmeri cy prot v peroksisome
- signali na NH<sub>3</sub> koncu in notr. signalna področja, ki nastanejo pri gubanju BE - Be pride v peroksisom
- ni znano vgrajevanje BE v obstoječo membr., enako velja za LI
- lipidi - sinteza v cy delu ER; ko se odcepi transportni vezikel, se odcepi tudi del LI. Pri peroksisomu ni tako - prenašalni Pr prenese fosfolipid na peroksisom. Večina LI se sint. v ER (tudi za peroksisome)
- vnos PR in LI v membrano - peroksisom raste - ko doseže kritično velikost, se preščipne na dva

### CELIČNI CIKLUS

- nastajanje novih individuov
- nadomestitev umrlih celic
- nanj vplivajo geni
  - - pospeševanje, ustavljenje
  - - obstajati mora **ravnotežje za normalen razvoj**
  - - vsako tkivo - spec. potek delitev
- nastanek dveh identičnih hčerinskih celic:
- menjava dveh dogodkov:
  - *podvojitve dedne mase*
  - *segregacija - razporeditev mase na hčerinski celici*
- cel. cikel vključuje tudi celične organele - koordinacija podvojitve in segregacija cel. organelov
- mitotična - zanemarljivo kratka:
- interfaza - rast in razvoj celice, priprave na delitev (na M)
- metafaza
- anafaza
- citokineza

### **interfaza:**

- **G1** - sintetski dogodki, sinteza BE, tu je nejmogljivejša prepisovanje, izraža se skoraj večina genov
- **S** - sinteza DNA, histonov (v G1 se ti ne sint.), centriolov
- **G2** - sinteza tistih BE, ki kasneje sodelujejo v delitvi - tubulin - sint. ob koncu te faze, aktivnost se skoraj popolnoma ustavi, preverjanje popolnosti sinteze DNA

**mitotična** - ni pom. sintetske aktivnosti

- embr. celice - G1 praktično ni - celice ne rastejo v začetku brazdanja, zato, ker ni G1 faze (blastulacija)
- celice se ne morejo nešteto krat deliti - fibroblasti se delijo okoli 50x - problem staranje - celični cikel se upočasni - celice s starostjo ne morejo več priti v S fazo
- nek celice so stalno v GO fazi (podaljšana G1) in se ne delijo - nevroni - specializacija
- jedro v S fazi + jedro v G1 fazi - zlijemo skupaj - S inducira G1, ki tako pride v S fazo - ciklus se nadaljuje sinhrono naprej. V jedru torej mora obstajati **S fazni aktivator**
- S + G2 - G2 jedro miruje, dokler S jedro ne pride v G2 fazo - v **G2 jedru je blok**, da G2 ne more priti v S fazo
- M + katerokoli interfazno jedro - **M jedro vsebuje stimulus** - vse celice se obnašajo kot v mitozu - jedro v pos. fazi je spec.
- na koncu G1 (tik pred S fazo) je točka, ki odloči, ali se bo ciklus nadaljeval ali ne - 1. kontrolna točka - **1. restriksijska točka (1RT)** - ena najvežnjih v celičnem ciklu - če celica preide 1RT, ciklus teče naprej - 1RT deluje po principu vse ali nič
- kontrolnih točk je še več - kontrolirajo, ali je vse v redu - če je - signal, da se ciklus nadaljuje, sicer se ustavi
- osnovni namen RT je, da se dedni material podvoji in pravilno razporedi - preprečevanje mutacij, zagotovitev genske identitete
- **G1 kontrolna točka**: - kontrola pogojev izven in v celici (za vse RT) - ali je okolje ugodno, ali so prisotni rastni faktorji, ali je celica zadosti velika, fizični pogoji okolja → ali se lahko začne S faza
- **2 RT na koncu G2 faze**: - preverja, če je vsa dedna masa podvojena. Če ni, se ciklus ustavi. Preverja tudi, če se ni dedni material podvojil dvakrat → ali se lahko začne M faza
- **3 Rtv mitozu med meta in anafazo**: kontrola segregacije dednega materiala, ali je ta pravilno razporejen - preprečitev aneuploidij

- celični cikel vodita dva proteina:

**ciklini** - regulatorne podenote; odgovoren za dogajanje v pos. fazi

**ciklinske kinaze - Cdk** - katalitični prot.

- ciklin in Cdk se povežeta in postaneta aktivna molekula (kompleks) - kinaze fosforilirajo tarčne BE - spec. dogodki

- več vrst ciklinov in Cdk

- poj. se ciklično v razl. čas obdobjih
- Cdk - prisotne v vseh fazah interfaze, so različne v različnih fazah
- v razl. fazah se poj. razl. ciklini, potem izginejo
- ciklin A - v S fazi, skupaj s Cdk je odgovoren za potek replikacije DNA
- ciklin B - G2 in M faza = mitotični ciklin
- ciklin D - G1 faza
- ciklin E - konec G1 oz. prehod v S fazo = G1 ciklin
- dva kompleksa (vezana ciklin in Cdk):
- **MPF** (mitotski promocijski faktor) - Cdk2 in mitotični ciklin → G2 faza
- **start kinaza** - Cdk2 in G1 ciklin → G1 faza
- G1 - cycE se poveže s Cdk2 - nastane kompleks start kinaza, ki omogoči prehod skozi 1RT
- M - cycB in cyc kinaza - kompleks MPF, ki vodi dogodke v mitozu

slika:

- ko kol. MPF naraste, je to vstop v mitozo, ko nj. kol. pade, je to signal za izstop iz mitoze

- *cycB* + kinaze - dol. dogodki, nato se razgradi, pojavi se druga vrsta ciklinov - drugi dogodki  
- druga vrsta *cyc* se razgradi

**aktivacija *cyc* in Cdk:** - šele akt. kompleks lahko fosforilira druge BE

- 1. faza - sinteza *cycB* - ko nj. konc. naraste, se poveže s Cdk - MPF kompleks - 1. dogodek = povezava, sledi aktivacija kompleksa - fosforilacija dol. mest na Cdk (3 mesta, ki se fosforilirajo: 2 sta aktivacijski, kjer mora biti vedno P, 1 je inhibicijski - če se P odstrani - aktivacija kompleksa.) Najprej se fosforilirajo vsa 3 mesta, nato se z enega odstrani P - dobimo aktiven kompleks. Ko je kompleks aktiven, vodi mitozo - to velja za sesalske celice
- na meji med meta in anafazo se MPF inaktivira - odcepita se obe P skupini. To se zgodi v trenutku - zato strm padec
- nabiranje P skupin teče s pomočjo fosfataz - odvzem P in kinaz - dodatek P
- MPF - fosforilira, aktivira razl. substrate - enako delujejo start kinaze - različni so substrati - tarčne BE, dogodek je vedno v osnovi enak
- start kinaza aktivira BE, ki vodijo DNA replikacijo
- MPF aktivira BE, ki gradijo niti delitvenega vretena
- ciklično pojavljanje in izginjanje ciklinov in MPF - sinteza v interfazi, a je konc. majhna - ko konc. naraste se pojavi MPF - prehod v mitozo
- **1RT** kontrolira ali je z DNA vse v redu, ali so prisotni rastni faktorji. DNA mora biti nepoškodovana, da se cel. cikel nadaljuje. Vsaka poškodba, ki povzroči enojen prelom - prekinitev fosfodiesterke vezi - ustavitev cel. cikla
- prelom - cel. cikel je ustavljen - celica ima 2 možnosti - popravilo preloma, cel. cikel se nato normalno nadaljuje naprej. Če napake ni mogoče popraviti, celica vztraja v G1 fazi, cel. cikel se ne nadaljuje, aktivacija poti, ki vodojo v apoptozo. Katera pot se izvrši, določa protein **p53**. Je jedrni fosfoprotein, je tudi v cy, je kot antigen. Ko pride do napake - preloma - se p53 veže na DNA, tam se kopiči (upočasni se nj. nivo razdalje) - kopičenje in vezava DNA - aktivira gen *waf* - nj. produkt je p21 - inhibitor ciklinskih kinaz. V primeru okvare DNA se sproži inhibiranje ciklinskih kinaz - start kinaze ni in cel. cikel se ne nadaljuje → pri regulaciji sodeluje tudi *rb gen*
- p21 - vezava na PCNA - podenoto DNA polimeraze
- ***rb gen (retinoblastoma gen)*** je ključni gen regulacije cel. cikla - **Rb - protein:** lahko je defosforiliran ali fosforiliran - različni odgovori; Rb je pravzaprav celično stikalo. Ko P niso vezani, je v povezavi z nekim transkripcijskim faktorjem (E2F) - E2F ne deluje → ni prepisa in sinteze BE ali je min - celica ne more rasti - faza GO
- P vezani - afiniteta do E2F se zmanjša - E2F se lahko pripne na DNA - transkripcija - rast celic, nadaljevanje G1 faze in prehod v naslednje faze.

*Fosforilacija Rb omogoča, da proteini normalno delujejo, ker se RB odcepi od njih!* - celica lahko preide G1 fazo.

- rakaste celice - zatajijo mehanizmi popraviljanja napak - kljub napaki celica lahko raste, preide 1RK in nadaljuje cikel - mutacija se prenese naprej - dedovanje. Apoptoza je izključena in tumor raste
- mutacija *p53* - prisotna pri večini tumorjev
- kontrola dogodkov - kdaj pride do delitve, ustavitve,...
- ◇ **2RT** - najmanj poznana
- ◇ **3RT** - preprečitev aneuploidije - ko so vsi kromosomi speti z nitmi delitvenega vretena, je to signal, da je metafaza uspešna. Če ni tako, je signal, da je nekaj narobe. 3RT deluje na neg. signalih. Če se nek kromosom ne pripne, se signal generira, sicer ne. Tudi če sta dva kromosoma že priprta, lahko ena nitka odplove - pride do aneuploidije, čeprav je šlo skozi 3RT

### ◇ 1RT - preprečitev mutacij na nivoju DNA

- aktivacija MPF je signal za začetek mitoze, med meta in anafazo je inaktivacija (razgraditev). Tu je tudi kontrolna točka. Če se en kromosom ne pritrdi na niti, to pomeni blokado - inaktivacija MPF
- MPF je stalno aktiven, se ne inaktivira in razgradi
- če celica uspešno pride 3RT se MPF inaktivira in razgradi. Govorimo o proteolitični poti. Vključi se **ubiktivinski proteolitični sistem**, ki razgrajuje BE, ki so napačno sestavljene ali, ki se morajo ciklično razgraditi. Ta sistem se vključi med meta in anafazo - razgradnja MPF - signal za izhod iz mitoze. Degradirajo se tudi tarčni proteini (mikrotubuli,..)

### vloga MPF med mitozo:

- fosforilira različne proteine - zaradi tega razpade jedrni ovoj (zaradi fosf. lamina. Če je lamin defosforiliran, je jedrni ovoj oblikovan)
- fosforilira kromatin (H1 histone) - kondenzacija kromatina
- fosforilira mikrotubule - oblikovanje mikrotubulov, BE v povezavi z jedrom in GA - razpad jedra in GA, ER v vezikle. Ko MPF razpade se ti prot. defosforilirajo - vzpostavitev stanja kot pred mitozo

### CITOKINEZA - DELITEV CELICE

- povezana s fosforilacijo
- v mitozu zelo velik nivo fosforilacije - fosforilirani so tudi nek el. citoskeleta - npr. miozin - med mitozo ne prihaja do povezav med aktinom in miozinom - defosforilacija možna ko MPF konec anafaze zgineva - povezava aktina in miozina - omogočena citokineza
- slika: količina MPF v odvisnosti od celičnega cikla

### CITOSKELET

- v celici poteka gibanje veziklov in drugih substanc - to omogoča citoskelet - citomuskulatura, vzdržuje obliko celic, omogoča ameboidno gibanje, krčenje miškulature
- visoko dinamična struktura, ki se spreminja, ko celica spreminja obliko, se deli in odziva na okolje
- vse molekule se združujejo v filamente - *polimerizacija*

### 3 skupine:

- **aktinski filamenti** - nahajajo se na periferiji celice pred plazmalemo - pom. pri gibanju celic
- **mikrotubuli** - iz centrosoma se širijo proti periferiji - znotrajcelično gibanje; primarni organizatorji citoskelete
- **intermediarni filamenti** - potekajo okoli jedra, povezani z dezmosomi; mehanska trdnost

### vloga citoskeleta:

- povezovanje proteinskih kompleksov in organelov → transport
- mehanska opora → pomembno za živalske celice, ker nimajo celične stene
- tvori notranjo mrežo, ki podpira celico - kot železobetone v stavbah
- funkcija filamentov je odvisna od akcesornih proteinov - predstavljajo motorje, ki premikajo filamente, kontrolirajo združevanje filamentov na dol. mestih

### AKTINSKI FILAMENTI

- mikrofilamenti - 2 prepletajoči verigi **F - aktina**,  $d = 7\text{nm}$ , osnovna monomera je **G - aktin**
- aktin zastopan v velikem % v celici
- stabilni elementi - mikrovili, labilna struktura → prehod cy iz sol v gel in obratno
- nitke - 2 tvorita  $\alpha$  - heliks

- več oblik G - aktina -  $\alpha$  aktin (mišične celice),  $\beta$ ,  $\gamma$  aktin - v vseh ostalih celicah - evolucijsko se ni spreminjal
- aktinska molekula je **polarna** - ločimo del, ki se veže na ATP in drug del, ki se veže na drug aktin - tudi mikrofilament je polaren → **+ in - konec**
- na + koncu se dodajajo monomere G - aktina (hitrorastoči konec - raste 10x hitreje), - je počasirastoči konec
- ko se G - aktin že veže na verigo → **hidroliza ATP → ADP**, tako da večina aktina v verigi nosi ATP. Na + koncu ima aktin še vezan ATP in ta konec zato hitreje raste - analogno z GTP pri tvorbi mikrotubula, vendar pri aktinu pride do konformacijske spremembe.  
**Hidroliza ATP je pomembna pri depolimerizaciji!**
- zamenjava ADP z ATP je dosti počasnejša kot zamenjava GDP in GTP pri tubulinu → celici uspe vzdrževati visoko koncentracijo nepolimeriziranega aktina
- **faza nastajanja filamenta:**
  - G - aktini se med seboj povezujejo v nekakšno jedro → NUKLEACIJA, nato pride do hitre rasti mikrofilamenta → ELONGACIJA - nastaja F - aktin, sledi FAZA RAVNOTEŽJA - dodajanje in odcepljanje monomer je uravnoreženo; KRITIČNA KONCENTRACIJA aktinskih monomer - na + koncu je višja kot na - , če hočemo, da mikrofilament raste
- **tread milling:**
  - na + koncu se dodajajo monomere z ATP, na - pa odcepljajo. Z vsakim novim dodajanjem monomer se ostale premaknejo proti - koncu, dokler se ne odcepijo. Filament ostaja vseskozi enako dolg (tega pri MT ni). ZA to je potreben ATP
- v celici mora obstajati ravnotežje med aktinskimi monomeri in filamenti - na aktinske monomere so zato vezani proteini - *timozin* - veže se na vezavno mesto aktinske monomere ali pa na mesto, kjer je vezan ADP → aktin tako ne more vezati ATP
- *profilin* se veže na mesto za drugo aktinsko molekulo, in če se veže na aktin z ATP je polimerizacija blokirana, če pa se veže na aktin z ADP omogoča odprtje molekule in izmenjavo z ATP → polimerizacija je omogočena. Pospešuje zamenjavo ADP z ATP, če je vezan na aktinski monomer
- **stabilizatorji in destabilizatorji:**
  - citohalazin - preprečuje polimerizacijo, ker se veže na + konec AF
  - faloidin (*Amanita*) - veže se po celi dolžini filamenta in preprečuje depolimerizacijo
  - vpliv na lokomocijo celic
- gibanje celic, spreminjanje oblike - pom. nastajanje podaljškov - *lamelipodiji*, *pseudopodiji*, *filopodiji* - v teh delih visoka koncentracija aktina - tik pod plazmalemo prihaja do hitre polimerizacije aktina, kar povzroči dvigovanje plazmaleme brez pretrganja - v zg. delu poteka polimerizacija - vodilni konec +, v sp. depolimerizacija - vse to je kontrolirano z G - proteini (**Rac**, **Rho** - majhni GTP - azi. Rac - hitra formacija lamelipodijev, Rho - razvoj stresnih vlaken → kontrola polimerizacije aktina v filamente in organizacija filamentov v spec. strukture)
- osnovna struktura vseh mikrofilamentov v celicah je enaka. Št., način povezave in druge lastnosti pa se ločijo med pos. celicami - te lastnosti so odvisne od **akcesornih proteinov**, ki delujejo kot motorji.
- *eritrociti*: aktinski filamentni so kratki, takoj pod plazmalemo, med seboj so povezani s *spektrinom* (tetrameti tvorijo 2D mrežo, ki je na koncu povezana z zeli kratkimi aktinskimi

- filamenti). Spektrin se veže na cy rep transmembranskega proteina *band3* s pomočjo *ankirinskih* mostičkov.
- pritrnitev aktinskih filamentov na adherentne stike → posredno na kadherine preko kateninov ( $\alpha, \beta, \gamma$ )
  - kadherini se povezujejo s kadherini druge celice - mikrofilamenti so povezani med seboj (med celicami)
  - **distrofin** - veže aktinske filamente na kompleks transmembr. prot.. Če tega ni, pride do mišične distrofije. Gen leži na X kromosomu
  - **medsebojna povezava aktinskih filamentov:**
    - *tesni paralelni snopi* - akcesorna belj. je fimbrin; so v vodilnem koncu filopodijev, sodelujejo pri plavanju
    - *kontraktilni snopi* - protein, ki veže filamente med seboj je  $\alpha$ - aktinin. Filamenti so tako narazen, da vmes pride še miozin. So v stresnih nitih, kontraktilnem obroču.
    - *mreža* - protein je filamin, ki ima dve domeni za povezovanje filamentov. So v korteksu celic in omogočajo gel stanje v celici. Prehajanje iz gela v sol omogoča protein gelsolin, ki ob povečanju koncentracije  $Ca^{2+}$  cepi aktinske filamente → mreža razpade
  - **pogonska funkcija v celici - miozin I in II**

### *miozin II*

- splošno razširjen v evkariontski celici (sploh v mišicah) - 2 težki, 4 lahke verig.
- težki → 2 glavi (aminoterminalen konec) - mesta za vezavo ATP, mesta za vezavo na aktinske molekule, rep (karboksilni terminalni konec) - povezava miozinskih molekul v debele miozinske filamente ( $\alpha$  - heliks). - antiparalelna povezava
- pomemben pri mišični kontrakciji, nemišične celice - omogoča delitev; ločitev homolognih celic
- gibanje enega filameta mimo drugega
- kontraktilni snopi so v kontraktilnem obroču pri delitvi celice
- miozinske mol., ki vlečejo aktinski filament enega mimo drugega → vlečenje membrane navznoter - obseg obroča se zmanjšuje ← depolarizacija aktinskih filamentov

### *miozin I*

- le v nemišičnih celicah
- 1 veriga (glava, rep)
- evolucijsko starejša molekula; glava konzervativna, rep - različne lastnosti
- glava → vezavno mesto za ATP, rep → vezavno mesto za aktin, membrano
- povezava 2 mikrofilamentov med seboj (glava na enega, rep na drugega)
- gibanje iz - → + koncu aktinskih filamentov
- povezava z repom na membrano vezikla → gibanje veziklov vzdolž mikrofilamentov
- vezava na membrano → mikrofilament se giba vzdolž membrane
- **stresne niti** → trajna kontraktilna vlakna podobna miofibrilam v mišicah
- pritrjanje na plazmalemo na fokalnih stikih (zunanost celice je tesno povezana na ekstracelularni matrix, na drugi strani se povezujejo z mrežo intermediarnih filamentov, ki obdajajo jedro)
- integrini - zunanja domena se veže na extracelularni matrix, cy domena pa na aktin v stresnih vlaknih. Povezava ni direktna → cy domena se veže na talin, ki se veže na vinkulin → povezava z  $\alpha$  aktininom - vezava na aktin
- protein kinaze (*src* gen) - nahajajo se na fokalnih kontaktih → lahko fosforilirajo različne tarčne proteine, vključno s komponentami citoskeleta → regulacija preživetja, morfologije, gibanja, diferenciacije celic



- **kontraktilni obroč** → iz aktinskih in miozinskih filamentov. Pojavi se pod plazmalemo med M fazo elične delitve. → omogoča citokinezo
- **mikrovili:**
  - prstaste strukture - ogrodje iz aktinskih filamentov → povečanje površine celice
  - plazmalema, ki pokriva mikrovile je visoko specializirana - plašč iz polisaharidov in prebavnih encimov
  - na koncu mikrovila + konec aktinskih filamentov
  - mikrofilamenti so povezani z vilinom, paralelni snop aktinskih filamentov se povezuje na plazmalemo z miozinom I in kalmodulinom
  - cy → - konci; vsidrani v preplet spektrina → trdnost, stabilnost korteksa v celici pod mikrovilom
- **mehanizem lokomocije: str 846**
  - lokomocija → embrionalni razvoj → potovanje celic - prehod iz krvi
  - celice pritrjene na substrat s fokalnimi stiki
  - najprej se celica *podaljša* → lamelipodij se podaljša v vodilni konec, kjer poteka intenz. polimerizacija aktina, ki omogoča plazenje po podlagi → *pritrđitev* lamelipodija na podlago s fokalnimi stiki (omogočajo transmembranski receptorji) → *premik* celotne celice - 2 hipotezi:
    - -1. hip: vodilni konec → kontrakcija aktina povleče za seboj celico
    - -2. hip: polimerizacija aktina v frontalnem delu raztegne aktinski korteks naprej, nastane tenzija, ki nato povleče celico naprej
  - podaljševanje → aktivna polimerizacija aktina, ki je bolj intenzivna na + koncu
  - medsebojna povezava med filamenti → nastanek paralelnega snopa. Ta z miozinom I premika plazmalemo naprej → lamelipodij se daljša po podlagi.
- **funkcionalni proteini:**
  - - vezavni → povezujejo aktinske filamente v vzporedne žarke
  - gel - formirajoči → tvorijo mrežaste strukture
- **strukturni proteini**
  - vzdrževanje aktina in miozina v sarkomeri v pravilni geometriji
  - *titin* - sega od Z linije proti miozinu in ga vzdržuje na sredini sarkomere
  - *fimbrin* - vezavni prot., v filopodijih (vodilni konec) skrbi za trdno povezavo aktinskih filamentov, 2vm
  - *nebulin* - poteka vzdolž aktinkega filamentain vzdžuje stalno dolžino fil.
  - *alfa aktinin* - v stresnih vlaknih, rahle povezave v kontraktilnih filamentih - vmes se lahko vriva še miozin, 2vm
  - *filamin* - gel formirajoči prot. - nahaja se v korteksu in omogoča tvorbo rahle, viskozne mreže z zlepljanjem dveh aktinskih filamentov, ki križata drug drugega, 2vm
  - *gelsolin* - aktivacija s pomočjo Ca, tvori kapo na na novo nastajajočem + koncu
  - *dezmin* - povezuje miofibrile med seboj
  - *distrofin* - omogoča povezavo aktinskih fil. na membrano mišične celice
  - *tropoin* - posredno vezan na filamente preko tropomiozina
- **interakcije med proteini, ki vežejo aktin**
  - preprečevanje mešanja različnih aktinskih filamentov med seboj → **tropomiozin** - dimer 2 enakih  $\alpha$  - heliksov ovitih v verigo
  - veže se vzdolž aktinskega filamenta in ga stabilizira ter utrdi
  - onemogoča vezavo filamina na sktin
  - pospešuje vezavo miozina II - kooperativnost

## MIKROTUBULI

- *značilnosti:*

- polarizirane strukture
- polimerizacija globularnih podenot v cilindrične strukture
- dinamična nestabilnost
- povezani s pom. proteini
- nukleacija, elongacija, faza ravnotežja

- *2 tipa:*

- aksonemni
- citoplazemski

### aksonemni:

- zelo stabilni
- dolžina se ne spreminja
- povezani z gibanjem celic - lokomocija
- bički, migetanke, centrioli, bazalno telo

### citoplazemski:

- nestabilni, zelo dinamični - din. mrežje cy
- dolžina se neprestano spreminja
- delitveno vreteno, aster - pojav med delitvijo celice

- MT so dolga, toga struktura, ki se razporejuje po celici;  $d = 25\text{nm}$
- v obliki cevčice, stena iz 13 protofilamentov - vsak sestavljen iz alternirajočih podenot  $\alpha$  in  $\beta$  tubulina
- osnovna gradbena enota je **tubulin** = heterodimer iz 2 različnih podenot:  $\alpha$  in  $\beta$  tubulin. Heterodimeri se med seboj zaporedno povezujejo - polimerizacija - protofilament
- več oblik  $\alpha$  in  $\beta$  tubulina, vse pa kažejo veliko medsebojno podobnost - evolucijsko ni velikih sprememb (enako velja za aktin)
- MT splošno razširjeni v evkariontskih celicah. le redke jih nimajo
- polarna je že sama molekula tubulina → ločimo + in - konec; + hitrorastoči del, - počasi rastoči del
- cy Mt so zelo labilni, dolžina se neprestano spreminja - pred mitozo se razgradijo na monomere - med mitozo nastane delitveno vreteno in aster

### citostatiki

- preprečujejo nastanek delitvenega vretena (*kolhicin, vinblastin, vinkristin, kolcemid*); gre za preprečevanje polimerizacije, ker se vežejo na tubulinske dimere
- stabilizatorji MT - *taxol (Taxus)* - vezava vzdolž MT - preprečuje razpad in tako ustavi celično delitev - kemoterapija raka na pljučih in jajčnikih
- ločevanje kromosomov je povezano z nastajanjem in razgrajevanjem MT - to uporabljajo pri kemoterapiji
- polimerizacija MT - potrebni  $\text{Mg}^{2+}$ , GTP za sestavljanje heterodimer v protofilamente

### faze nastajanja:

- **nukleacija**

- formiranje manjših skupin dimer v agregate - metastabilni derivati - nek. so stabilni, drugi hitro razpadejo
- poteka v *centrosomu* - ob jedrni ovojnici je center za org. MT

- centrosom: sestoji iz centriolov, ki ležita  $\perp$  drug na drugega, okrog pa se nahaja pericentriolni matrix, ki vsebuje št. beljakovine,  $\gamma$  tubulin, ki pomaga pri povezovanju  $\alpha$  in  $\beta$  tubulina v heterodimer in pericentrin
- centrioli niso udeleženi pri rasti MT, ampak rastejo iz pericentriolnega matriksa
- **elongacija**
- na nukleus se hitro dodajajo nove heterodimere. Nato pride do faze ravnotežja, MT ne raste več - hitrost polimerizacije = hitrosti depolarizacije
- konca MT sta različna - na + koncu raste MT 3x hitreje kot na - koncu, zato je + konec bolj oddaljen od nukleusa
- rast je odvisna od konc. heterodimer - nizka konc.  $\rightarrow$  depolimerizacija, visoka konc.  $\rightarrow$  polimerizacija
- *kritična koncentracija*: konc. pri kateri prihaja do rasti na + koncu in hkrati do razgradnje na - koncu; *faza ravnotežja*. Na + koncu je konc.  $>>$  kot na - koncu, ker na + koncu potekajo čisto drugačne kemične reakcije  $\rightarrow$  vzrok je v vezavi GTP na  $\beta$  podenoto tubulina in hidrolizi v GDP. Kakor hitro se dimera veže na MT, v povezavi preide GTP  $\rightarrow$  GDP. Na + koncu  $\rightarrow$  dodajanje GTP molekul, večja afiniteta, hitra vezava dimer med seboj, depolimerizacija je preprečena. Vežan GDP - labilne povezave. hidroliza GTP je torej pomembna za depolimerizacijo!!
- velika koncentracija tubulina  $\rightarrow$  dodajanje heterodimer hitreje kot hidroliza GTP - pojav *GTP kape*, na koncu mikrotubula  $\rightarrow$  nadaljevanje rasti mikrotubula
- premajhna konc. heterodimer - prihaja hitreje do razpada GTP kot do dojanja heterodimer - ni GTP kape, ki ščiti MT pred razpadom, zato prihaja do depolimerizacije
- *dinamična nestabilnost MT je pogojena z GTP in nj. hidrolizo!*
- podenote se lahko zelo hitro vežejo v filament, nato pride do hidrolize GTP. Če na koncu ni vezan GTP, sledi hiter razpad. V cy pride do izmenjave GTP in GDP in vzpostavljanja novih heterodimer
- tudi v  $\alpha$  podenoti je GTP, vendar je odločilnega pomena GTP v  $\beta$  podenoti!
- proces v fazi ravnotežja - tubulinske molekule, ki se interkorporirajo na + koncu se premeščajo na - konec, kjer se nato odcepijo - **treadmilling** - poteka samo v fazi ravnotežja in pomeni, da dimeri potujrjo od + do - faze, kjer pride do njihove depolimerizacije.
- **centrosom**
  - - prim. mesto nukleacije  $\rightarrow$  v nepolarizirani celici rast iz centrosoma na vse strani: - krajšanje, ponovna rast
  - izginotje, nastajane novih
  - - dol. naletijo na svoji poti na proteine, ki MT stabilizirajo (*selektivna stabilizacija*) - MT lahko v tej smeri nemoteno rastejo - celica postane polarizirana in spremeni obliko - to je pom. med dif. celic
  - življenska doba MT je 10 min, tubulina pa 20h
- za funkcioniranje pom. tudi **pomožni proteini** - **MAP (microtubule associated proteins)**, ki povezujejo MT med seboj in z organeli in jih stabilizirajo. Glede na mol maso jih razdelimo na:
  - **TIP I - HMV** - visoka mol masa: - **MAP 1, MAP 2** - dendriti, aksoni
  - **TIP II- tau proteini**: nižja mol. masa
- proteini iz obeh razredov imajo 2 domeni - z eno se vežejo na mikrotubul, z drugo pa na ostale celične komponente

- vežejo se na št. nepolimerizirane podenote in s tem pospešujejo nukleacijo. Ko je mikrotubul enkrat stvorjen, preprečujejo depolimerizacijo na - koncu.
- **modifikacija MT** - dodajanje acetilnih spojin na dimere  $\alpha$  podenote (na Lys), z  $\alpha$  podenote se odcepi Tyr s karboksilnih koncev, šele nato lahko pride do povezav
- *acetilacija in detirozinacija* - *zorenje mikrotubula* se odvijata samo na mikrotubulih in ne na prostih tubulinskih molekulah. Ob depolimerizaciji hiter reverzen proces.
- zgodi se preden se na MT vežejo MAP, ki ga še dodatno stabilizirajo
- MT pogosti v ŽC - v aksonu orientirani s + koncem proti sinapsam. V dendritih je orientacija mešana (odvisno od MAP) - sodelujejo pri transportu sinaptičnih veziklov iz some proti aksonu
- če pride do fosforilacije Tau, se začnejo mol med seboj združevati in nastanejo nitasti prepleti - Alzheimerjeva bolezen - moten transport sinaptičnih veziklov iz some do sinapse

### MT motorni proteini:

⇒ vključeni v znotrajcelični transport

- **dineini** - transport organelov, vlečenje kromatid na pole (mitoza)
- **kinezini** - mitoza - ločevanje kromatid, mejoza, transport sinaptičnih veziklov v aksonih

⇒ *sestava*: iz 2 težkih in 2 lahkih verig - ločimo globularno glavo in repa.

⇒ glava - vezavna mesta za ATP in tubulinske molekule,

⇒ rep - specificirajo tip tovora, ki se transportira vzdolž MT (+ → -) konec.

⇒ Centrosom: - konec → *dineini transportirajo od periferije proti centrosomu (+ → -)*, *kinezini pa od centrosoma proti periferiji (- → +)*

⇒ *pomen*: - vzdrževanje lege organelov v celici.

⇒ kinezini - vzdrževanje cistern ER

⇒ dineini - vzdrževanje GA (MTOC ob centrosomu) - lokacija različnih org.

⇒ My, GA, ER se pred delitvijo povsem razgradijo, nato se sestavijo nazaj. Če pride do blokade dineina, se GA ne more ponovno vzpostaviti.

⇒ transport

- GA → ER - kinezini
- ER → GA - dineini

### Aksonemni MT - bički, migetalke, centriol, bazalno telo

⇒ **bički**:

- cy podaljšek obdan s plazmalemo; ogrodje podaljška tvori zapleten sist MT: aksonema, odg. za upogibanje bička ali migetalke - *dvojna funkcija*:
  - lokomocija, z gibanjem omogoča pretok tekočin
  - dovajanje hrane pri enoceličarjih. Večceličarji - migetalke vezane na epiteljske celice - jajcevod, dihala, gibanje - spermij.

⇒ **aksonema**:

- gibalo bička - sredica
- 9 x 2+2 MT - v sredini je par samostojnih MT - 13 protofilamentov, na periferiji pa 9 parov, od katerih je eden popoln - 13 filamentov, drugi pa deli steno s prvim - 10 - 11 filamentov
- *nexin* - omogoča medsebojno povezavo periferno ležečih tubulov. Iz perifernih parov izhajajo proti sredini *radialne špice*, ki se povezujejo s centralno nožnico, ki ovija centralni par MT - omogoča, da se migetalka upogiba kot celota
- pogonski protein = *ciliarni dinein*. Premika se + → -, nemeščen po celi dolžini MT, z repom je vezan na mikrotubul A, ATP - azna glava pa se med upogibanjem povezuje s tubulinom B naslednjega para.

- upogibanje: dineinske molekule se premikajo proti - koncu (s pomočjo hidrolize ATP) . Če MT nista povezana, pride do drsenja MT enega ob drugem. Nexin preprečuje da bi prišlo do drsenja, zato pride do upogibanja

#### ⇒ **bazalno telo:**

- leži na bazi migetalk, bičkov, vsidrano v cy
- pom. pri nastajanju bičkov in migetalk
- oba sta zgrajena iz 9 x 3 perifernih MT (A - popoln, B, C - nepopolna)
- B, C sta nepopolna, cilinder je pov. z dol. prot., v sredini ni MT
- 2 MT od 3 perifernih se podaljšata v migetalko oz. biček. Usoda 3. ni jasna in kako nastane centralni tudi ne.
- bazalno telo in centriol sta funkcionalno povezana - bazalno telo ob mitozni potuje iz periferije v sredino (prej odvrže biček) in sodeluje pri org. polov delitvenega vretena (lahko prevzame vlogo centriola)
- centriol → centrosom → S faza → podvojitvev → ločitev materinskih centriolov, nato  $\perp$  na materinski kromosom zraste hčerinski. V začetku mitoze se para ločita in potujeta vsak na svoj pol → določitev lege delitvenega vretena, vendar ne sodelujeta pri nastanku niti delitvenega vretena.

### **INTERMEDIARNI FILAMENTI**

- osnovne gradbene enote so dolge nitaste molekule
- niso polarizirane
- so zelo stabilne
- v celici se nahaja samo v polimerizirani obliki, ni monomerov
- obdajajo jedro in se iztezajo proti periferiji tvorba *jedrne lamine*
- splošno razširjen tip el. - razširjeni v celicah, ki so podvržene stresom, pritiskom: epitelii, mišične in živčne celice → mehanska odpornost - npr. keratini
- nekje med aktinom in miozinom - intermed. fil. najprej najdeni v mišicah
- so raznolika skupina

#### ⇒ zgradba:

- nitasta molekule - osr. del v obliki  $\alpha$  heliksa; zelo konzervativna - ni evolucijskih sprememb
- amino glava in karboksilni rep

#### ⇒ nastanek:

- ovijanje 2 mol v dimer - omogoča osr. regija v obliki  $\alpha$  heliksa
- nato se 2 dimera antiparalelno povežeta v tetramer - zato niso polarizirani
- tetrameri se povezujejo v protofilamente in naprej v intermediarne filamente

⇒ več tipov monomerov - osr. del soroden, razen amino glave in karboksilnega repa, ki se razlikujeta v dolžini in sekvenci AK

tipi: - jedro - tesno se prilega jedrni membrani - jedrna lamina- citosol:

#### • **keratinski:**

- - epiteljske celice - **citokeratini**
- $\alpha$  in  $\beta$  keratini
- kisli keratini - tip I
- nevtralni, bazični keratini - tip II
- pri sestavi filamenta - enaka količina kislih in bazičnih filamentov, ker homomeri ne morejo tvoriti intermediarnih filamentov
- pokazatelji stopnje diferenciacije epitelnih celic
- povezani z dezmosomi in hemidezmosomi - povezovanje epitelnih celic med sabo in na bazalno lamino

#### • **vimentin in sorodniki:**

- - levkociti, fibroblasti → celice mezodermalnega izvora;
- homomeri

- **vimentin** - v celicah mezodermalnega izvora; fibroblasti, endotelij, bele krvničke
- **dezmin** → mišice; pos. miofibrule
- **glia filamenti** → shwanove celice, astrocite; glia
- vsi proteini se lahko povezujejo eden z drugim
- **nevrofilamenti**: - ŽC - pom za vzdrževanje dolžine aksonov, da ne pride do krčenja
- **jedrna lamina**: - monomere - lamin - loči se od ostalih int. fil.:
  - osr  $\alpha$  heliks je daljši
  - vsebujejo jedrni transportni signal (= sortirni = kariofilni), ki usmerja filamente iz cy v jedro, ko so sintetizirani
  - povezujejo se v 2D mrežo
  - mreža je dinamična tvorba → razpade na začetku mitoze in se ob koncu spet znova vzpostavi
  - ob fosforilaciji lamina jedrna ovojnica razpade

- pom. mol, ki sodelujejo pri organizaciji intermediarnih filamentov

⇒ povezava na dezmosom:

- - plakoglobin
- - dezmozoplakin I, II

⇒ povezava na hemidezmosome: - BPAG 1

⇒ vezava vimentina, vezava z MT preko MAP, vezava na aktinske filamente preko spektrina - plektin

⇒ vezava vimentina na plazmalemo - ankirin

⇒ povezovanje IF med sabo v tonofilamente - filagin

vezava lamina na notr. jedrno membr. - lamin  $\beta$  receptor

### CELIČNA SMRT

- razvoj - odmrtje velikega št. celic - npr. 1/2 živčnih celic
- prične se že med embrionalnim razvojem; intenzivno odmiranje - epiteli, krvne celice
- celična smrt - poteče zelo hitro in ne zapusti pos. sledov, ker sosednje celice hitro odstranijo odmrlo celico
- zelo množičen in potraten proces (odmiranje jc pri ženski: 3 mes - 7 mio, rojstvo - 3 mio, puberteta 400 - 500 jc)
- - morfološki temelji za normalno celično smrt se jasno razlikujejo od *patoloških sprememb* = *nekroza*:
  - cy prične močno nabrekati, prav tako organeli
  - pride do poškodbe plazmaleme, aktivacije hidrolitičnih
  - encimov → razgradnja celic
  - pojavijo se vnetne reakcije pri sosedah
- apoptoza**:
  - kondenzacija cy, kromatina
  - nastanek apoptotskih teles, ki jih absorbirajo sos. celice ali fagociti
  - celična smrt poteka spontano - v dol. tkivu odmrlo določeno št. celic; gre za *programirano cel. smrt, fiziološko cel. smrt*
- vsaka celica vsebuje lasten mehanizem za samodistrukcijo; gre za ti. *pilulo strupa*, ki se nahaja pod membrano. Za aktivacijo tega mehanizma je potreben zunanji namig → celični samomor
- - celična smrt je skrbno reguliran proces. Za normalen razvoj tkiv in organov je potrebno ravnotežje med celično proliferacijo in odmiranjem - gre za vzpostavitev homeostaze. Odstopanja pomenijo anomalije

- smer proliferacije - rak
- smer odmiranja - AIDS
- cel smrt je nujna za normalen razvoj - gibanje po ozkem robu med življenjem in smrtjo → potrebna stalna komunikacija med sosedami
- preživetveni faktorji
  - več oblik:
  - vpliv na znižanje količine proteinov, ki so odgovorni za apoptozo, na neškodljiv nivo, ali pa delujejo na antiapoptotske proteine → zvišanje aktivnosti in blokada apoptoze
  - parakrina sekrecija - delovanje na sosedo
  - avtokrina sekrecija - delovanje na celico samo
- celica je neprestano bombardirana s signali, ki vplivajo na življenje in smrt

#### ⇒ NEKROZA:

- prizadene večjo skupino celic
- nabrekanje cy, organelov, v jedru ni vidnejših sprememb
- močno se poškoduje plazmalema - ionske črpalke ne delujejo zaradi pomanjkanja E in same poškodbe membr. → vsebina celice se izlije po sosednih celicah
- v cy se močno dvigne nivo  $Ca^{2+}$  → aktivacija fosfolipaze C, ki se nahaja v plazmalemi - pride do razgradnje fosfolipidov - poškodba ly - iztekanje hidrolitičnih encimov in izlivanje celične vsebine iz celice. Vpliv na sosednje celice je škodljiv - vnetne reakcije. Do njih pride tudi zato, ker makrofagi ob fagocitiranju nekrotične celice izločajo vnetje-inducirajoče signale. Če fagocitirajo apoptotsko celico, tega ne storijo.
- sinteze DNA, transkripcije ni → upad DNA in proteinov
- ni sinteze ATP, ker My nabreknejo

#### ⇒ APOPTOZA

- prizadene pos. celice, majhne skupine
- pride do izgube kontaktov s sos. celicami, celična površina se spremeni, da postane prepoznavna za makrofage
- s cel. pov. izginejo značilne cel. strukture - npr. mikrovili, cy se prične močno kondenzirati
- kond. poteka tudi v jedru - kond. kromatin se nabira v gručah ob jedrni ovjnic
- pride do izgube vode in ionov - celica se prične gubat, postane neprevilne oblike, sledi fragmentacija celice in jedra
- **fragmenti = apoptotska telesa** - ko vsebujejo tudi fragm. jedra → sos. celice in fagociti jih hitro odstranijo. Pride do pojavljanja spec. polisah., ki jih prepoznajo receptorji na fagocitih. V fagocitu se nato celica razgradi do osnovnih prekursorjskih molekul.
- apoptotska telesa v epitelih se ne fagocitirajo, ampak se izrinejo v lumen in z nekrozo razpadejo

#### *biokemične spremembe znotraj apoptotskih celic:*

- znotrajcelično kopičenje  $Ca^{2+}$ :
  - signal za samouničenje celice
  - disfunkcija My
  - sprememba v organizaciji citoskeleta
  - oslabitev signalov - hormonov, rastnih faktorjev
  - aktivacija katabolnih encimov - nukleaze, proteaze, ki imajo pri apoptotskem odmiranju velik pomen
- blokada  $Ca^{2+}$  → blokada apoptoze (in obratno)
- $Ca^{2+}$  poti so drugačne kot pri nekrozi

- internukleosomska razgradnja DNA - v jedru nastanejo fragmenti DNA (180-200bp); poteče zelo zgodaj, še preden celica kaže izgubo vitalnih znakov. Če so blokirali endonukleazo, celica ni odmrta - fragmentacija DNA je torej predpogoj
- povečana količina cAMP in pov. aktivnosti proteinkinaze A, ki preko fosforilacije različnih prot. vpliva na potek apoptoze
- med apoptozo pride do sint. RNA in proteinov - je *aktiven proces*
- v celici obstajajo bazični mehanizmi za apoptozo, prot. so potrebni v kasnejših fazah ne v začetnih - geni, odgovorni za celično samouničenje - mediatorji, ki izzovejo apoptozo - isti signal lahko v različnih celicah povzroči različne učinke
- *mediatorji, ki izzovejo apoptozo z vezavo na membranske ali intracelularne receptorje:*
  - rastni faktorji
  - hormoni
  - št neidentificirani faktorji vključeni v smrt med razvojem in diferenciacijo
- *citotoksične celice; T limfociti - v povezavi s tarčno celico izzovejo smrt*
- *škodljivi zunanji vplivi:*
  - - toksini
  - sevanje
  - hipo in hipertermije
  - ishemije
  - kemoterapevtiki
  - zunanji vplivi izzovejo apoptozo do dol. praga konc., če gre za majhne konc. Če presežejo mejno konc., gre za nekrozo.

### **induktorji apoptoze:**

- ◇ *fiziološki:*
  - - TNF (tumorski nekrozni faktor)
  - TGF  $\beta$  (transformirajoči rastni faktor  $\beta$ )
  - nevrotransmiterji - dopamin, glutamat
  - $\uparrow$  Ca<sup>2+</sup>
  - glukokortikoidi
  - izguba stika z ekstracelulernim matriksom
- ◇ *poškodbe:*
  - - toplotni šok
  - virusi
  - bakterijski toksini
  - onkogeni (*myc*)
  - tumorsupresorski geni (*p53*)
  - oksidanti
  - prosti radikali
  - citotoksični T limfociti
- ◇ *terapevtski agensi:*
  - kemoterapevtiki - vinkristin, bleomicin, cisplatin,..
  - $\gamma$  sevanje
  - UV sevanje
- ◇ *toksini:* - etanol

### **inhibitorji apoptoze:**

- ◇ *fiziološki:*
  - - rastni faktorji - epidermalni  $\rightarrow$  izzovejo delitev celic
  - celica pritrjena na ekstracelularni matriks
  - Zn



- estrogeni, androgeni
- ◇ *virusni geni*:
  - - bakteriovirus: *p35*, *IAP*
  - herpesvirus
- ◇ *farmakološki agensi*:
  - - inhibitorji cisteinske proteaze
  - tumor promoterji - fenobarbital
  - $\alpha$  - heksaklorocikloheksan

Apoptoza je splošno razširjen pojav - rastlinske in živalske celice - embrionalni razvoj; celotni celični ciklus:

- metamorfoza - juvenilna tkiva se odstranijo z apoptozo
- terminalna dif. - celice pod vplivom rastnih faktorjev, hormonov - kadar delovanje ni pravilno
- imunski sistem - odstranjevanje avtoreaktivnih limfocitov - ostane samo limfocit, ki ima pravo protitelo proti dol Ag
- tumorske celice, atrofija tkiv (involucija - zmanjšanje mlečnih žlez po končanem dojenju, zmanjšanje maternice po porodu)

### GENSKA KONTROLA

*glista - Caenorhabditis elegans* - const. št. celic - 1030, med razvojem odmre natančno dol., vedno enako št. celic - 131. S pomočjo mutacij se ugotavlja, kateri geni so vključeni v odmiranje the 131 celic.

#### Program celične smrti

slika:

- faza sojenja - sodel. preživetvenih faktorjev
- apoptotske eksekucijska faza - morf. spremembe - nastanek apoptotskih teles
- fagocitoza → razgraditev

vsaka od the faz je gensko regulirana. **3 geni vključeni v smrt:**

- *ced 3*
- *ced 4* - oba odgovorna za smrt. *ced - 4* je poz. regulator. Če pride do mutacije, celica ne odmre.
- *ced 9* - neg. regulator, ki prepreči celično smrt. Podoben učinek ima tudi P35 (izoliran prot. iz bakulovirusa) - blokira delovanje genov smrti *ced 3*, *ced 4* ali izzove ekspresijo *ced 9*
- sesalci - obstaja homolog s *Ced9* - protein **Bcl 2** - prepreči celično odmiranje in deluje tudi pri glistah - v osnovi gre za bazičen proces. *bcl2* je proto - onkogen
- homologi za *Ced 4* - ni, *Ced 3* - **ICE - interleukin converting enzyme** - cisteinska proteaza; vključena v modif. interleukina. Na aktivnem mestu prisoten cistein.
- P35 ima enak učinek na sesalske celice kot pri glisti

fiz. aktivatorji → → obstaja v celici (ni identif.)  
 toksini → centralni signal za celično smrt  
 poškodbe →  
 terapevtski agensi →

→ aktivacija cisteinskih proteaz  
 - osr. vloga v poteku cel. smrti

↓

→ spremembe na celični pov. - fagocitoza  
 → aktivacija endonukleaz  
 → reorg. citoskeleta  
 → delov. na My

**REAPER**

- aktivira ga katerikoli signal, ki je prišel do celice
- deluje na ICE (*ced 3*) - povzroči celično smrt.
- supresira *bcl2*, ki deluje na ICE - povzroči celično smrt. Blokada delovanja *bcl2* pomeni, da ICE lahko nemoteno deluje. Če *bcl2* ni supresiran, torej lahko zavira delovanje ICE in ne pride do celične smrti.

**ICE = kaspaza!**

- odkritih je 10 cisteinskih proteaz - **kaspaze (1-10)**:
  - ⇒ cepijo na mestu, kjer je prisoten Asp
  - ⇒ najprej se sintetizirajo kot proencimi, ki se aktivirajo po cepitvi na mestu, kjer so prisotni Asp - omogočeno samoprocesiranje in aktivacija med kaspazami (1→2, 4→1, 3→7, 3,7→10) - ko je aktivirana ena se aktivirajo še druge
  - ⇒ C - cistin na aktivnem mestu
  - ⇒ Asp - za delovanje potrebuje Asp
  - ⇒ aza - encim
  - ⇒ delovanje:
    - povezovanje receptorjev v membrani z apoptotskimi eksekucijskimi procesi v celici
    - najpom. družine receptorjev za tumorski nekrozni faktor TNF-R -
    - veliko receptorjev, ki so po zgradbi podobni. Sem spada tudi **FasR** - najdemo ga v vseh celicah; transmembranski prot, ki ga aktivira **Fas ligand (FasL)** - prisoten samo na T-limfocitih (citotoksične celice). Ko neka celica (AG prezentirajoča celica) predstavi AG, ga prepozna T- receptor (CTR).

slika:

**delovanje Fas liganda**

- Fas receptor in TNF sta transm. prot.. Na ekstracel. membr. se vežeta FasR in TNF prot. Vezava ligandov aktivira te receptorje, ki pa se ne vežejo direktno na kaspazo8 - pom. pos. proteini. Pot je nekoliko drugačna.
- znotrajcelične domena receptorjev vsebuje smrtno domeno, na katero se vežejo spec. prot., ki vsebujejo tudi spec. motiv, ki prepozna smrtno domeno FADD
- na rec. TNF se veže TRADD
- kompleks Fas rec - FADD prepozna aminoterminalni konec kaspaze 8, kjer je pos. motiv za prepoznavanje smrtnih domen
- TRADD se ne veže direktno na kaspazo - vmes mora biti še FADD
- šele z vezevo teh kompleksov na kaspazo pride s osamoprocesiranjem in cepitve na Asp delu
- aktivna kaspaza 8 deluje nato naprej in sicer verjetno na 1→3
- kaspaza 8 je najvišje v hierarhiji regulacije celičnega odmiranja
- z delovanjem kaspaze8 je tesno povezano dogajanje v My, ki močno poveča prepustnost zun. membrane - pojav megakanalov - porušenje gradienta in padec membr. potenciala. Pride do izhajanja dol faktorjev iz My - proteaza 50kDa in citokrom c
- dogajanje v jedru - aktivacija nukleaz, cepljenje DNA
- zun. My membr. - prot, ki leži blizu megapor - *bcl2* - preprečuje nastajanje megapor - preprečuje apoptozo
- induktorji apoptoze:
  - *p53* - tumorsupresorski gen
  - onkogen *c- myc* - oba gena pom vključena v regulacijo celičnega cikla - ustavita cel. cikel v G1 fazi - celica preide v apoptozo
- *p53* - v G1 fazi kontrolira. če je z DNA vse v redu in zaustavlja dol. procese, da lahko prode do popraviljanja napak. Če se napaka ne popravi pride do smrti. Aktivacija *c- myc* - nadaljevanje celičnega cikla
- delitev celice in apoptoza sta povezani, ker je apoptoza neke vrste aberantna mitoza

**Antiapoptotski regulatorji**

- *bcl2* - pri človeku so ga odkrili pri folikularnem limfonu - translokacija med kromosomoma 18 in 14. Iz 18 (18g21) se prenese *bcl2* na 14. (14g23) - prenese se neposredno ob gen za težko verigo imunoglobulina - v limfocitih pride do intenzivnega prepisovanja - prekomerna produkcija *bcl2* pa omogoča celici preživetje
- *bclX* - več oblik - (S) - inducira apoptozo, deluje kot supresor *bcl2*
- BAX - preprečuje delovanje, ker tvori dimere *bcl2*
- A1
- *mcl1* - preprečujeta apoptozo, delujeta pod vplivom rastnih in diferenciacijskih faktorjev
- delovanje *bcl* družine je zelo kompleksno: + in - regulacija
- - značilnosti *bcl 2*:
  - - hidrofobna sekvenca, da se lahko vgradi v membrano (zun My membr.)
  - prisoten v jedrni ovojnici - regulacija prehoda v jedro
  - ER - regulacija s pomočjo  $Ca^{2+}$  (prehod v cy)
  - intenzivno prepisovanje v fetalnih in progenitorskih celicah - osn. za nove celice (epiteli, krvna telesca)
  - učinkuje kot preživetveni faktor, saj se pred smrtjo celice izražanje tega faktorja močno zniža
- maligna transformacija - povezava z aktivacijo apoptotske mašinerije - Bcl2 blokira delovanje *c-myc* in *p53*
- *p53* - zaustavitev v G1 fazi - pride do zmanjšanja ekspresije *c-myc* in aktivaciji *cip1* - veže se na cistein - preprečevanje cel. cikla - deluje tudi na potek apoptoze
- sočasno izražanje *p53* in *bcl2* - *p53* se nahaja v jedru deluje na *c-myc* in *cip1* in zaustavi celični cikel. Z zakasnitvijo deluje tudi na deblokado efektorja *bcl2* - apoptoza. V primeru, da se izrazijo *p-53*, *c-myc*, *bcl2* - cel. cikel teče nemoteno dalje in do apoptoze ne pride. *p53* se nahaja v cy in *c-myc* preko Bcl2 preprečuje prehod P53 v jedro - cel. cikel ni zaustavljen in do apoptoze ne pride.

**IAP - inhibitor apoptoze**

- najprej so jih odkrili v bakulovirusih, so splošno prisotni tudi v sesalskih celicah - vključeni v celično preživetje - blokada apoptoze
- vključeni v dogajanja pri prevejenju signalov preko rec. v celico - povezava s TNF
- aktivacija TNF - aktivacija kaspazein pos. transkripcijskega faktorja NF $\kappa$ B - vpliva na izraz več genov (pleotropen učinek) - vsi imajo antiapoptotski učinek - delovanje proti TNF $\alpha$
- preživetje celice je odvisno od aktivacije kaspaze 8 ali transkr. faktorjev
- - če je nivo NF $\kappa$ B zelo visok - ravnot. na strani preživetja
- osr, vloga v indukciji NF $\kappa$ B - TRAF (TNF - rec. associated factor) - ta prot bo uspešno reguliral NF $\kappa$ B le, če se bo nanj vezal IAP

**Bolezni**

- blokada apoptoze
  - - rak:
  - folikularni limfom
  - tumorji na prostati, prsih, ovarijih - ekspresija BCL2 - zelo slaba prognoza
  - avtoimunske bolezni
  - virusne infekcije
- - pospešena apoptoza: - AIDS
  - neurodegenerativne bolezni
    - Alzheimerjeva bolezen
    - Parkinsonova bolezen
  - infarkt, kapi
  - ciroza jeter

**DOLOČITEV SPOLA PRI SESALCIH**

- fenotipično
- genotipično
- sesalci - diplogenotipična določitev spola - določitev ob oploditvi
- spolni kromosomi: X,Y
- Y - razvoj testisov; če je le prisoten, pride do realizacije moškega spola
- gen potreben za realizacijo moškega spola = **testis določujoči gen TDF =TDY**
  
- genotipi: Tdq - prisoten samo q krak Y kromosoma - ta genotip se razvija kot ženska
- Tdp - ta genotip se razvija kot moški - TDF torej leži na p kraku
- XX deček - med spermatogenezo pride do crossing overa in kombinacije. V bližini kjer leži Tdy pride do rekombinacije med homolognimi odseki - dokaz s hibridizacijo - v primeru XY<sup>TDY</sup> ni prišlo do hibridizacije, z XX<sup>TDY</sup> p
- primarni signal za določanje spola prihaja še iz Y kromosoma. To še ni dovolj za realizacijo spola. Odčitati ga mora TDX. Če pride do aktivacije TDX se bodo indif. gonade razvile kot testisi, drugače kot ovariji. Če je TDX mutiran - razvoj v žensko. X\*Y - ženska.
  
- genski defekt na testisih - sartolijeve celice, leydigove celice - ni izločanja testosterona
- antimüler faktor - preprečuje razvoj Mülerjevega kanala v jajcevod. Leydigove celice se lahko ne razvijejo - ni testosterona kljub genotipu XY in razvitim testisom - razvoj osebe z ženskimi genitalijami. Ker sartolijeve celice delujejo normalno, se ovariji ne razvijejo
- mutacija na X -testikularna feminizacija - XY oseba - razviti testisi, normalna prod. testosterona, mutiran pa je gen za testosteroni receptor - testosteron ne more delovati na tarčne celice - ni razvoja moških znakov in realizacija spola je gensko in hierarhično voden kompleks genskih in hormonskih signalov

- 1) Xyq - ženska brez prim. signala TDy, ki je lociran na Yp
- 2) X\*Y - ženska brez Tdx, ki odčita in posreduje prim. signal
- 3) XY - ženska - odsotnost Leydigovih celic
- 4) X<sup>tgm</sup>- ženska - izpad testosteronkega receptorja

Y, TDY → X, TDX → nedif. gonade

→ + → testisi

→ - → ovariji

prim. signal - lahko deluje kot + signal v obliki prot., ki aktivira Tdx. Obstajale pa naj bi represibilne molekule, ki jih veže Tdy - Tdx je zato prost in se lahko izraža. Če Y ni, se represibilne molekule nimajo kam vezati - zaviranje Tdx - razvoj ovarijev.