

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 fi 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⁻ - 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. Ca²⁺- 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 fidiacilglicerol, 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 fiprehod v GA - modifikacija; različni vezikli - selekcija pri oblikovanju veziklov
- pos. proteini, ki kot škarje zgrabijo pos fosfolipid in ga prenesejo drugam (*fosfolipidni zamaževalni 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
- **PiP₂** (*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** - 3C₆ + C₅ obroč s kratkim repom in nabito -OH fivezan blizu polarnih glav fosfolipidov fi 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 barierne značilnosti membran - rigidni steroidni obroči so v interakciji in delno imobilizirajo regije ogljikovodokovih verig, ki so pripete na polarne glave. Zniževanje mobilnosti prvih nekaj CH₂ 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 fl 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 (-) fina notranji strani; diferenca v naboju notranjosti in zunanosti

3. Proteini

a) splošne značilnosti

- odgovorni za specifikko 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 a - 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 NH₂ 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 a heliks

1) multipli a heliks

1) nekateri od teh proteinov so kovalentno pritrjeni na verigo MK na cy strani;

1) prot. pripeti preko kovalentno vezanega lipida, MK; lahko pritrjeni preko prenilne skupine

1) nek. prot. so pritrjeni preko oligosaharida na fosfolipid, fosfatidilinositol - necitoplazmatska stran

1) 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 fiO₂, CO₂, etanol, urea,..
- za makromolekule, ione, ki ne morejo pasivno prehajati - prenašalni sistemi - ATP črpalke, kanali, prenašalci
- hidrofobna notranjost membrane - otežen prehod polarnih molekul fipom. pri ohranjanju različnosti cy od ekstracelularja
- celice so zato morale razviti različne načine, kako spraviti dol snovi preko membrane fispredjemenje hranilnih snovi, izločanje metabolitov
- ioni, majhne vodotopne molekule fisppec. 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 porinskih molekul v skladu s konc. gradientom. Ne vežejo mol., ampak tvorijo hidrofobne pore - prehod spec. ionov.
- generiranje ionskih konc. razlik preko membrane in generiranje potencialne energije v obliki elektrokemijskega gradienta. Energijska 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 fienergija shranjena v elektrokemijskem gradientu
 - primarni fienergija shranjena v ATP

1* ATP - črpalke

- delujejo proti konc. gradientom (kem. in el.) - na račun hidrolize ATP
- gre za povezavo energetsko ugodne (hidroliza ATP) in neugodne reakcije (prenos iona proti reagentu)

2* 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

3* 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. fikconf. sprememba fispr. 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

4* 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:

$$K = C_m / C_{aq} \text{ fiP sor. K}$$
- **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 flL) - 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

5* 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 ⁺	139	4
Na ⁺	12	145
Cl ⁻	4	116
HCO ₃ ⁻	12	29
X ⁻	138	9
Mg ²⁺	0,8	1,5
Ca ²⁺	< 0,0002	1,8

Ca²⁺ je vključen v signaliziranje, zato ga mora biti znotraj celice malo - min. sprememba v konc. pomeni signal. Ca²⁺ sodeluje s kalcijevimi vezavnimi proteini npr. **kalmodulin** = heterogena molekula, ki lahko veže do 4 Ca²⁺ - glede na št. vezanih Ca²⁺ se molekula konformacijsko spreminja.

Slika: kalmodulin:

ATP črpalka:

- za črpanje snovi proti gradientom je potrebna velika energija

tipi črpalk:

6* P - črpalke

- ioni: p⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺
- 2a in 2b podenoti
- potrebna fosforilacija večje podenote (a)
- lokacija:
 - plazmalema bakterij (p)
 - plazmalema evkariontov (Na⁺/K⁺ črpalka, Ca²⁺)
 - plazmalema želodčnega epitelija (p⁺/K⁺)
 - SER v mišicah (Ca²⁺)

7* F - črpalke

- kompleksna transmembranska domena
- 8 podenot
- transportira p⁺
- plazmalema bakterij, My -udeležena pri sintezi ATP
- uravnavanje pH bakterij

8* 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

9* Ca^{2+} 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:

10* Na / K črpalka (antiporter) - P črpalka

- prenaša K^+ v celico, Na^+ iz celice, proti elektrokemijskemu gradientu
- s pomočjo ATP se spreminja afiniteta vazave 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 fiprememba konformacije in hidroliza ATP
- ko se Na^+ sprostijo, se na zunanji strani poveča afiniteta za K^+ . Ob odcepitvi P se konformacija spremeni fipride 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 fikontrolira konc. rtp. v celici - če so celice tretirane z oubainom se napihnejo

11* p^+ 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.

12* 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.

13* Cl^- črpalka

- odgovorna za iznos anionov
- obolenje: cistična fibroza - okvara tkiv in organov, ki izločajo določene sekrete - moten transport klorovih ionov

14* Kotransporti

- transport glukoze v endotelijskih črevesnih celicah
- simport 1 Glu in 2 Na^+
- polarnost celice
- tesni stiki - preprečevanje mešanja snovi ekstra in intracelularja - omogoča ohranitev gradienta
- slika:

srčna mišica

- vdor Ca^{2+} pomeni skrčitev mišice, transport ven pa relaksacijo
- gre za antiport: 3Na^+ (out) + Ca^{2+} (in) 3Na^+ (in) + Ca^{2+} (out)
- slika:

želodčne epiteljske celice

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

15* 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^{2+}
- lecitinska domena - na koncu proteina, ki se izteza iz celične površine fiv prisotnosti kalcija ve že na spec. oligosaharide ali drugo celico
- lecitinska domena prepozna spec. oligosaharid
- več vrst: epitelijski, endotelijski - E, placentalni - P, limfocitni - L
- slika:

16* IgSF

- struktura v principu taka kot pri Ig
- nahajajo se na pov. limfocitov - prepoznavanje tarčnih celic
- neodvisni od Ca^{2+}
- pom. pri embrionalnem razvoju; tvorba živčevja in mišičja
- povežeta se IgSF sosednjih celic
- slika:

17* kadherini

- odvisni od 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 filamenti in kadherini ni direktna - vmes so razne adapterske, povezovalne molekule - katehini, a - 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 Ca^{2+}
- slika:

18* 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

- Ca^{2+} predstavlja + signal, b podenota ni odvisna od Ca^{2+}
- slika:
- vnetni procesi: tujki pridejo v telo, limfociti jih locirajo in uničijo fipotreben prehod iz kapilar na mesto infekcije. Prehajanje iz kapilar je težko zaradi velikih barrier - pomoč selektinov in integrinov
- slika: - selektini najprej predhodno vežejo limfocit. Nato se aktivirajo integrini, ki trdno povežejo limfocit, nato pride do spremembe v epitelijskih celicah fi špranja fiprehod 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 - a, b, ki se vežeta na fibronektin, laminin, kolagen
- vezava integrinov na ligande je odvisna od Ca^{2+} , Mg^{2+} - 4 vezavna mesta na a podenoti
- integrini na krvnih celicah morajo biti najprej aktivirani, šele nato lahko pride do celične povezave - primer strjevanja krvi fipostimulus (poškodovana žila) sproži intracelularne signalne poti, ki aktivirajo b3 integrin v membrani trombocita fikonformacija, tako, da ekstracelularna domena lahko veže fibrinogen fizlepljanje trombocitov
- pri pojavljanju strdkov moramo najti molekule, ki kompetitivno veže fibrinogen, tako, da ga integrini ne morejo
- integrini se lahko tudi inaktivirajo fipodforilacija serinskega ostanka na cy repu b1 integrina med mitozo vceličnih kulturah. Zato se celice med mejozo odlepajo od substrata - ne morejo se vezati s fibronektinom. Podobno se zfodi pri metastatskih celicah fiposforilacija Tyr ostanka v cy repu

19* 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 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; razmejitve 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:

20* 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 fipovezujejo 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 (a. b, g katenin, vinkulin, a - aktinin, plakoglobin) vezani na kadherin figure 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 miškulatura)
- 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 integrinov (ne kadherinov, kot pri pravem dezmosomu)
- slika:

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

21* **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 fiiz 6 podenot = koneksini (4 a 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 fipermeabilnost lahko variira
- el. vzdražne celice fiAP 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 vklapljanja 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 fiso dinamična struktura
- zapiranje koneksonov, če se poškoduje sosednja celica, da ne pride do iztekanja snovi tudi iz nepoškodovane celice
- rakaste celice nimajo koneksojskih povezav, ker ne tvorijo koneksina - ni komunikacije

ZUNAJCELIČNI MATRIKS

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

glikozaminoglikani (GAG)

- kovalentno povezani s proteini - tvorijo *proteoglikane (PG)* - pp verige (core protein) finastane na RER, polisaharidne verige se dodajo v GA
- glikoproteini fi1 - 60% karbohidratov, tvorijo veliko kratkih razvejanih verig
- proteoglikani fi95% 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 H₂O - 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* fivezava fibroblastov in drugih celice na matrix v vezivnih tkivih, *laminin* fivezava epitelnih celic na bazalno lamino

22* **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 fiprivlak kationov - ozmotska aktivnost fivezava vode na matrix (turgor) - omogoča, da matrix lahko vzdrži pritiske - npr. kolenski sklep
- verige so preveč toge, da bi se lahko zvijale v kompaktne strukture fikonformacije, ki zavzamejo velik volumen glede na svojo maso fitvorba 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 fivezava celic na matrix in iniciacija odgovora celic na rastne faktorje
- GAG verige lahko tvorijo gele z različno velikostjo por in naboja fidelujejo kot selektivna sita za regulacijo prometa molekul glede na njihovo velikost in naboj
- pom. vloga pri kemični signalizaciji fivezava signalnih molekul kot so rastni faktorji - inhibicija lia aktivacija
- GAG vežejo in regulirajo aktivnost drugih tipov proteinov - proteaze, proteazni inhibitorji

1* imobilizacija proteina v bližini mesta sinteze

2* sterična blokada aktivnosti

3* rezervoar proteinov za zakasnjeno sproščanje

4* zaščita proteina pred proteolitično degradacijo - podaljševanje ativnosti

koncentracija proteina za bolj učinkovito prezentacijo površinskim receptorjem

23*

Kolagen

- količinsko največ v celicah
- upiranje nateznim silam fimre žasta postavitev fibril - koža!
- fibrilaren protein, ki ga najdemo pri vseh večceličarjih
- nastaja znotrajcelično v procesu zorenja na ER. Tu se sintetizira kot a 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 a 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 fitvorba fibril
- vloga propeptidov:
 - - vodi intracelularno formacijo trojne vijačnice
 - - preprečuje 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 fiorganizacija fibril v matrixu
- napake pri tvorbi kolagena:
 - *osteogenesis imperfecta*: mutacija kolagena tipa I; šibke in lomljive kosti
 - *hondrodisplazije*: kolagen tipa II; abnormalen hrustanec - deformacija vezi, sklepov
 - *Ehlers - Danlos sindrom* - mutacija kolagena tipa III - krhka koža, žile, hiperobilni sklepi

24*

Elastin

- elastičnost in moč ekstracelularnega matriksa
- visoko hidrofoben protein, bogat s Pro in Gly, vendar ni glikoziliran in vsebuje malo hidroksiprolina in hidroksilizina
- po sekreciji se elastinska vlakna formirajo v mreže
- zgradba: hidrofoben segment - elastičnost, z Ala in Lys bogat a - heliks, ki tvori povezave med molekulami
- elastinsko jedro je pokrito s plastjo mikrofibril - glikoproteini - fibrilin - vloga pri povezovanju elastinskih vlaken

25*

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)

26*

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

27* **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

28* **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, mikrofagih, 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 a 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 pritrdijo 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 fic
- **biosinteza lipidov in proteinov** za večino celičnih organelov fisam ER, GA, Ly, End, Sek. vez., My, Per fi produkcija večine lipidov
- ER lovi spec. proteine iz cy: - transmembranski proteini, ki le delno preidejo skozi membrano in postanejo vključeni vanjo fiti prot. nato preidejo na druge organele

- vodotopni proteini, ki preidejo preko membrane v lumen fiprot, 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 fi **kotranslacija fi preprečena nevarnost gubanja proteina, preden bi dosegel translokator v membrani**
- transport proteinov v My, Clo, Nukl, Per fi **postranslacija** - potrebe drugačen signalni peptid fitu so prisotni cy **chaperoni**, ki skrbijo, da se protein ne more nagubati
- ribosom, na katerem se sintetizira protein je direktno pripet na membrano fi **RER**

v cy torej dve vrsti ribosomov:

- membransko vezani ribosomi
- prosti ribosomi
- ribosomi so strukturno in funkcionalno enaki fazlikujejo se le po tem, da sintetizirajo različne proteine
- **ER signalni peptid** usmeri ribosom na membrano ER fimRNA 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 fisinteza 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+} fikatalizira hitre odgovore na ekstracelularne signale fiv ER visoka koncentracija proteinov, ki vežejo Ca^{2+} fi še posebej zančilno za SER mišic
- RER in SER lahko ločimo s centrifugiranjem fiER se po homogenizaciji fragmentira fipride 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 fivodilni 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 prekurzorje 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 fiRNA iz 300 nukleotidov + 6 proteinov fiprepозна hidrofobno zaporedje s pomočjo polipeptida **p54**, kjer so nakopičeni hidrofobni deli

SRP receptor - docking protein fiiz 2 pp enot - večja podenota je vezavno mesto za SRP fiomogo ča vezavo SRP kompleksa na membrano

- SRP se veže na ER signalni peptid, kakor hitro pride peptid iz ribosoma fi pavza v sintezi proteina, da se ima ribosom čas pritrditi na membrano ER fihazgotovljeno, 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 hidrofilnih 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 fostanejo 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 sprosti v lumen.

TRANSPORT, SINTEZA MEMBRANSKIH PROTEINOV

29* **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 a heliks, ki predira membrano. Amino konec peptida je v lumnu ER, karboksilni pa v cy.

30* signalni peptid je lahko tudi znotraj pp verige - signalni peptid se v tem primeru zasidra v membrano in tvori a 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 a 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 NH₃ 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

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

- **PDI** (proteindisulfid izomeraza), ki katalizira oksidacijo SH finastanek 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 fionmogo či nastanek novih vezi, ki utrezajo pravi konformaciji
- 32* **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
- 33* **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 fi protein se zaradi tega pravilno naguba - ta vezava je zelo ugodna - ni potrebna nobena E. Da pa se protein BiP sprosti 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 sprostitvev

Glikozilacija proteinov:

- ena pomembnejših funkcij ER; v cy je glikoziliranih zelo malo proteinov, tissti, 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 fi visokoenergetske vezi fi 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 fitrimanje
- 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 fipomaga 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 fipp veriga ostane vezana v membrano s hidrofobnim karboksilnim koncem fisedli odcep; karboksilni konec ostane v membrani fiisto časnopride do vezave na N-terminalni konec glikozilfosfatidilinozitolnega intermedata (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 fifiksnost
- **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 fiGA. 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** fifosfatidna kislina fidiacilglicerol (*fosfataza; odcep P*) fi 1,2 diacilglicerol
 - + **aktiviran etanolamin** fi *fosfatidiletanolamin*
 - + **serin** fi *fosfatidilserin*
 - + **holin** fi *fosfatidilholin*
 - raste le citosolni sloj membrane - prihaja pa do flip - flopa iz cy dela v lumenski fipo časi - 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 filipaze 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 kompartmenta (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 fiGA
 - 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 fivezikli, ki prihajajo iz ER
 - GA skladovalnica - cis mediane in trans cisterne fimodifikacija
 - trans omrežje fivezikli, 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 fimodifikacija fisubstrat 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 fitrans GA nastajajo v glavnem **3 vrste nevezanih oligosaharidov**:
 - 34* **visoko manozni** - ostane tak kot pride iz ER
 - 35* **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,... finastanejo 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 figlikozilacija 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 fipakiranje 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 cernid za sint. GL in SM firazvr ščanje 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 fi do označevanja s 6P prihaja že zelo zgodaj
- **cis omrežje** - N acetilglukozaminfosfotarnsferaza, 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 fitrans GA; pH = 7 - vezava liganda na receptor s pomo čjo klatrinskega plašča fi vezikli s tem plaščem vsebujejo te specifične receptorje
- klatrin se sprosti takoj po odcepitvi vezikla fizdru žitev vezikla s poznimi endosomi fizni žanje 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, CH₂O, NK - če kakšen od teh encimov manjka - kopičenje substratov v celici
- encimi za delovanje potrebujejo **kisel pH =5 fi** zaščita celice pred lastnimi encimi: membrana, pH v cy = 7.2
- **membrana** - omogoča prehod snovi (AK, CH₂O, NK), ki so nastale pri prebavi v cy
 - - H⁺ - črpalka
 - črpa H⁺ 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:
 - 36* *fagocitoza*; fagosomi
 - 37* *endocitoza*; endosomi
 - 38* *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 finastanejo 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 fikončni produkt so rezidualna telesa 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

39* *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.

40* *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 fi npr. protitelesa

- na plazmalemi 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:

1* *fagocitoza*

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

2* *pinocitoza*

- pri tvorbi veziklov se cel površine manjša fisimultano 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 plazmalemi 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⁺

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 estra. 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 fivna šanje 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 fizorenje v pozni endosom. Če se združuje več veziklov, je ATP - aznihi 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 laterano difuzijo se zberejo v pokritih jamicah
- pozni endosom, ko ni več receptorjev - združitvev z vezikli, ki prinašajo lizosomske encime, nastane ly, kjer se LDL partikli razgradijo:
- prot. Bf1AK
- holesterolni ester f1MK + holesterol, ki difundira v cy - vgrajevanje v membrane in blokada lastne sinteze, če ga je dovolj
- ly s ooznačeni 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 a - 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 fi ferotransferin, če FE ni vezan - apotransferin

- pride do spremembe konformacije proteina, ki se veže na transferinski receptor (ta prepozna svoj ligand) fi konformacijska sprememba receptorja fiberejo se v klatrinskih pokritih jamicah fi pokrit vezikel fi izgubi klatrinski plašč fizg. endosom preide v poznega, ta se zlije z ly encimi, pri tem se zni ža 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 fi receptorji in ligandi se razgradijo fizmanj ša 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 fi
 - vezikli v endosomski kompartment, prinašajo lizosome
 - vezikli s konstitutivno sekrecijo na plazmalemo

polarizirana celica:

- trans GA - transport:
 - vezikli v endosomski kompartment - to omgoča 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:

41* transport veziklov na cel površino = konstitutivna sekrecija

- transport vezilklov, 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

42* 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 fikondenzacija = **zrela sekrecijska zrna**. pri nezrelih vsebina ni kondenzirana
- zrala 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
- 43* 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 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:

- 44* *citosolni proteini* - obstajajo neki hipotetični modeli, ki še niso povsem pojasnjeni. Obstajajo proteini na cy strani membrane.
 - 45* *klatrin* - preko različnih adaptinov povezan na cy del transmembranskega proteina. Adaptini specifični za pos. citosolni del
 - 46* *koatomere* COP I,II - coating proteins - tvorijo plašč. povzročijo nastanek pokritega vezikla
- 2 vrsti veziklov:
- klatrinski vezikli - selektivni transport
 - koatomerni vezikli - neselektivni transport

3* 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 fiADP, 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)

4* koatomerni vezikli

- neselektivni vezikularni transport ER fiGA, GA fiplazmalema
- vezikularni transport ER ficis 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. fip. - pokriti vezikel. Tudi ta plašč takoj po odščipnjenju vezikla odpade - GTP fiGDP - pride do konformacijskih sprememb v koatomeru - GDP pride v cy, enako koatomer - 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 sprosti 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-ethylmaleimide 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:

- 5* lipidni metabolizem - **b 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
- 6* **razgradna H₂O₂**: pri delovanju je stranski produkt H₂O₂, ki za celico škodljiv - zato je prisotna katalaza - histokemični test - dokaz, da je katalaza v strukturi - vemo, da gre za peroksisom
- 7* enačbe:
- 8* $RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$
- 9* peroxidativna reakcija: $H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$ v prisotnosti katalaze oksidacija št. spojin v jetrih, ledvicah fideksifikacija
- 10* $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ - v primeru če se odvečni peroksid nabira v celicah
- 11* 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⁻ koncu - Ser - Lys - Leu - COO⁻; se ne odcepi, usmeri cy prot v peroksisome
- signali na NH₃ 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 **ravnotrežje za normalen razvoj**
 - - vsako tkivo - spec. potek delitev
- nastanek dveh identičnih hčerinskih celic:
- menjava dveh dogodkov:
 - *podvojitev 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 najmočnejše 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
- 47* jedro v S fazi + jedro v G1 fazi - zlijemo skupaj - S inducira G1, ki tako pride v S fazo - cikel se nadaljuje sinhrono naprej. V jedru torej mora obstajati **S fazni aktivator**
- 48* 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
- 49* M + katerokoli interfazno jedro - **M jedro vsebuje stimulus** - vse celice se obnašajo kot v mitozih - jedro v pos. fazi je spec.
- na koncu G1 (tik pred S fazo) je točka, ki odloči, ali se bo cikel nadaljeval ali ne - 1. kontrolna točka - **1. restrikcijska točka (1RT)** - ena najvažnejših v celičnem ciklu - če celica preide 1RT, cikel 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 cikel 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 fiali se lahko za čne S faza
- **2 RT na koncu G2 faze:** - preverja, če je vsa dedna masa podvojena. Če ni, se cikel ustavi. Preverja tudi, če se ni dedni material podvojil dvakrat fiali se lahko za čne M faza
- **3 Rtv mitozih 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 fiG2 faza
- **start kinaza** - Cdk2 in G1 ciklin fiG1 faza
- 50* G1 - cycE se poveže s Cdk2 - nastane kompleks start kinaza, ki omogoči prehod skozi 1RT
- 51* M - cycB in cyc kinaza - kompleks MPF, ki vodi dogodka v mitozih

slika:

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

- 52* 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 inhibicijsko - 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 fosfatov - 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 - prekinitve 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 fipri regulaciji sodelije 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 fini 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 popravljanja 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,...
 - 1* **2RT** - najmanj poznana
 - 2* **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 pripeta, lahko ena nitka odplove - pride do aneuploidije, čeprav je šlo skozi 3RT
 - 3* **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 pritrudi 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 mitozii 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 zgineta - 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 mišične mase
- 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:

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

vloga citoskeleta:

- povezovanje proteinskih kompleksov in organelov fitransport
- mehanska opora fipomembno 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 fiprehod cy iz sol v gel in obratno
- nitke - 2 tvorita a - heliks
- več oblik G - aktina - *a aktin* (mišične celice), *b, g 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 **fi + 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 fi **hidroliza ATP fiADP**, 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 fcelici uspe vzdrževati visoko koncentracijo nepolimeriziranega aktina
- *faza nastajanja filamenta:*

G - aktini se med seboj povezujejo v nekakšno jedro **FINUKLEACIJA**, nato pride do hitre rasti mikrofilamenta **FELONGACIJA** - nastaja F - aktin, sledi **FAZA RAVNOTEŽJA** - dodajanje in odcepljanje monomer je uravnoteženo; **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 fiaktin 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 fi 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 filameta 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 fi 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 filamenti 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.

- pritrditev aktinskih filamentov na adherentne stike fiposredno na kadherine preko kateninov (a,b,g)

- 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:**

56* *tesni paralelni snopi* - akcesorna belj. je fimbrin; so v vodilnem koncu filopodijev, sodelujejo pri plavanju

57* *kontraktilni snopi* - protein, ki veže filamente med seboj je a- aktinin. Filamenti so tako narazen, da vmes pride še miozin. So v stresnih nitih, kontraktilnem obroču.

58* *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 fimre za 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 fi2 glavi (aminoterminalen konec) - mesta za vezavo ATP, mesta za vezavo na aktinske molekule, rep (karboksilni terminalni konec) - povezava miozinskih molekul v debele miozinske filamente (a - heliks). - antiparalelna povezava
- pomemben pri mišični kontrakciji, nemišične celice - omogoča delitev; ločitev homolognih celic
- gibanje enega filamenta mimo drugega
- kontraktilni snopi so v kontraktilnem obroču pri delitvi celice
- miozinske mol., ki vlečejo aktinski filament enega mimo drugega fivle čenje 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 fivezavno mesto za ATP, rep fivezavno mesto za aktin, membrano
 - povezava 2 mikrofilamentov med seboj (glava na enega, rep na drugega)
 - gibanje iz - fi+ koncu aktinskih filamentov
 - povezava z repom na membrano vezikla gibanje veziklov vzdolž mikrofilamentov
 - vezava na membrano fimikrofilament se giba vzdolž membrane
- **stresne niti** fitrajna 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 ficy domena se veže na talin, ki se veže na vinculin fipovezava z aktininom - vezava na aktin
 - protein kinaze (*src* gen) - nahajajo se na fokalnih kontaktih filahko fosforilirajo različne tarčne proteine, vključno s komponentami citoskeleta firegulacija preživetja, morfologije, gibanja, diferenciacije celic
 - **kontraktilni obroč** fiz aktinskih in miozinskih filamentov. Pojavi se pod plazmalemo med M fazo elične delitve. fionogoča citokinezo
 - **mikrovili:**
 - prstaste strukture - ogrodje iz aktinskih filamentov fipovečanje 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 fi- konci; vsidrani v preplet spektrina fitrdnost, stabilnost korteksa v celici pod mikrovilom
 - **mehanizem lokomocije: str 846**
 - lokomocija fiembrionalni razvoj fipotovanje celic - prehod iz krvi
 - celice pritrjene na substrat s fokalnimi stiki
 - najprej se celica *podaljša* filamelipodij se podaljša v vodilni konec, kjer poteka intenz. polimerizacija aktina, ki omogoča plazenje po podlagi fi *pritrđitev* lamelipodija na podlago s fokalnimi stiki (omogočajo transmembranski receptorji) fi *premik* celotne celice - 2 hipotezi:
 - -1. hip: vodilni konec fikontrakcija aktina povleče za seboj celico
 - -2. hip: polimerizacija aktina v frontalnem delu raztegne aktinski korteks naprej, nastane tenzija, ki nato povleče celico naprej
 - podaljševanje fiaktivna polimerizacija aktina, ki je bolj intenzivna na + koncu
 - medsebojna povezava med filamenti finastanek paralelnega snopa. Ta z miozinom I premika plazmalemo naprej filamelipodij se daljša po podlagi.

- funkcionalni proteini:

- - vezavni fipovezujejo aktinske filamente v vzporedne žarke
- gel - formirajoči fitvorijo mre žaste 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 kontraktlnih 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 fi **tropomiozin** - dimer 2 enakih a - heliksov ovitih v verigo
- veže se vzdolž aktinskega filameta in ga stabilizira ter utrdi
- onemogoča vezavo filamina na sktin
- pospešuje vezavo miozina II - kooperativnost

MIKROTUBULI

59* *značilnosti:*

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

60* *2 tipa:*

- - aksonemni
- citoplazemski

aksonemni:

- zelo stabilni
- dolžina se ne spreminja
- povezani z gibanjem celic - lokomocija
- bički, migetalke, centriol, 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= 25nm
- v obliki cevčice, stena iz 13 protofilamentov - csak sestavljen iz alternirajočih podenot a in b tubulina
- osnovna gradbena enota je **tubulin** = heterodimer iz 2 različnih podenot: a in b tubulin. Heterodimeri se med seboj zaporedno povezujejo - polimerizacija - protofilament
- več oblik a in b 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 filo čimo + 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 Mg^{2+} , GTP za sestavljanje heterodimer v protofilamente

faze nastajanja:

61* 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 ^ drug na drugega, okrog pa se nahaja pericentriolni matrix, ki vsebuje št. beljakovine, g tubulin, ki pomaga pri povezovanju a in b tubulina v heterodimer in pericentrin
- centrioli niso udeleženi pri rasti MT, ampak rastejo iz pericentriolnega matriksa

62* 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. fidepolimerizacija, visoka konc. fipolimerizacija
- *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 fi vzrok je v vezavi GTP na b podenoto tubulina in hidrolizi v GDP. Kakor hitro se dimera veže na MT, v povezavi preide GTP fiGDP. NA + koncu fidodajanje GTP molekul, ve čja afiniteta, hitra vezava dimer med seboj, depolimerizacija je preprečena. Vezan GDP - labilne povezave. hidroliza GTP je torej pomembna za depolimerizacijo!!
- velika koncentracija tubulina fidodajanje heterodimer hitreje kot hidroliza GTP - pojav *GTP kape*, na koncu mikrotubula finadaljevanje rasti mikrotubula
- premajhna konc. heterodimer - prihaja hitreje do razpada GTP kot do dojanja hetrodimer - 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 a podenoti je GTP, vendar je odločilnega pomena GTP v b 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 fiv nepolarizirani celici rast iz centrosoma na vse strani: - kraj šanje, 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 a podenote (na Lys), z a 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:

- 12* vključeni v znotrajcelični transport
 - **dineini** - transport organelov, vlečenje kromatid na pole (mitoza)
 - **kinezini** - mitoza - ločevanje kromatid, mejoza, transport sinaptičnih veziklov v aksonih
- 13* *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 (+ fi-) konec.
 - ⇒ Centrosom: - konec fi *dineini* *transportirajo od periferije proti centrosomu (+fi-)*, *kinezini pa od centrosoma proti periferiji (- fi+)*
- 14* *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.
- 15* transport
 - GA fiER - kinezini
 - ER fiGA - dineini

Aksonemni MT - bički, migetalke, centriol, bazalno telo

- 16* **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.

17* 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 + fi-, neme ščen 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

18* 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 mitozu potuje iz periferije v sredino (prej odvrže biček) in sodeluje pri org. polov delitvenega vretena (lahko prevzame vlogo centriola)
- centriol ficentrosom fiS faza fipodvojitev filo čitev materinskih centriolov, nato ^ na materinski kromosom zraste hčerinski. V začetku mitoze se para ločita in potujeta vsak na svoj pol fidolo čitev 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 fimehanska odpornost - npr. keratini
- nekje med aktinom in miozinom - intermed. fil. najprej najdeni v mišicah
- so raznolika skupina

19* zgradba:

- nitasta molekule - osr. del v obliki a heliksa; zelo konzervativna - ni evlucijskih sprememb
- amino glava in karboksilni rep

20* nastanek:

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

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

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

63* keratinski:

- epitelijske celice - **citokeratini**
- a in b 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

64*

vimentin in sorodniki:

- levkociti, fibroblasti ficelice mezodermalnega izvora;
- homomeri
- **vimentin** - v celicah mezodermalnega izvora; fibroblasti, endotelij, bele krvničke
- **dezmin** fimi šice; pos. miofibrule
- **glia filamenta** fishwanove celice, astrocite; glia
- vsi proteini se lahko povezujejo eden z drugim

65*

nevrofilamenti:- ŽC - pom za vzdrževanje dolžine aksonov, da ne pride do krčenja

66*

jedrna lamina: - monomere - lamin - loči se od ostalih int. fil.:

- osr a 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 firazpade na za četku mitoze in se ob koncu spet znova vzpostavi
- ob fosforilaciji lamina jedrna ovojnica razpade

- pom. mol, ki sodelujejo pri organizaciji intermediarnih filamentov

22*

povezava na dezmosom:

- *plakoglobin*
- *dezmozoplakin I, II*

23*

povezava na hemidezmosome: - *BPAG 1*

24*

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

25*

vezava vimentina na plazmalemo - *ankirin*

26*

povezovanje IF med sabo v tonofilamente - *filagin*vezava lamina na notr. jedrno membr. - *lamin b receptor***CELIČNA SMRT**

- razvoj - odmrtje velikega št. celic - npr. 1/2 živčnih celic
- prične se že med embrionalnim razvojem; intenzivno odmiranje - epitelij, krvne celice
- celične 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 firazgradnja 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 odmre 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 ficeli čni 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 fipotrebna 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 fizvi šanje aktivnosti in blokada apoptoze
 - parakrina sekrecija - delovanje na sosede
 - avtokrina sekrecija - delovanje na celico samo
- celica je neprestano bombardirana s signali, ki vplivajo na življenje in smrt

27* **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. fivsebina celice se izlije po sosednih celicah
- v cy se močno dvigne nivo Ca^{2+} fiaktivacija 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 fiupad DNA in proteinov
- ni sinteze ATP, ker My nabreknejo

28* **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 ovjnici
- 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 fisos. 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 prekurzorskih 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+} fiblokada 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

67* *mediatorji, ki izzovejo apoptozo z vezavo na membranske ali intracelularne receptorje:*

- rastni faktorji
- hormoni
- št neidentificirani faktorji vključeni v smrt med razvojem in diferenciacijo

68* *citotoksične celice; T limfociti - v povezavi s tarčno celico izzovejo smrt*

69* *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:

4* *fiziološki:*

- TNF (tumorski nekrozni faktor)
- TGF b (transformirajoči rastni faktor b)
- neurotransmiterji - dopamin, glutamat
- Ca^{2+}
- glukokortikoidi
- izguba stika z ekstracelulernim matriksom

5* *poškodbe:*

- toplotni šok
- virusi
- bakterijski toksini
- onkogeni (*myc*)
- tumorsupresorski geni (*p53*)
- oksidanti
- prosti radikali
- citotoksični T limfociti

6* *terapevtski agensi:*

- kemoterapevtiki - vinkristin, bleomicin, cisplatin,..
- g sevanje
- UV sevanje

7* *toksini:* - etanol

inhibitorji apoptoze:

8* *fiziološki:*

- rastni faktorji - epidermalni fiizzovejo delitev celic

- celica pritrjena na ekstracelularni matriks
 - Zn
 - estrogeni, androgeni
- 9* *virusni geni*:
- - bakteriovirus: *p35, IAP*
 - herpesvirus
- 10* *farmakološki agensi*:
- - inhibitorji cisteinske proteaze
 - tumor promoterji - fenobarbital
 - a - 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 avtoaktivnih 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 firažgraditev

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 fi fiobstaja v celici (ni identif.)
 toksini fi centralni signal za celično smrt
 poškodbe fi
 terapevtski agensi fi

fiaktivacija cisteinskih proteaz
 - osr. vloga v poteku cel. smrti
 fi
 fispremembe na celični pov. - fagocitoza
 fiaktivacija endonukleaz
 fireorg. citoskeleta
 fidelov. 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)**:
 - 29* cepijo na mestu, kjer je prisoten Asp
 - 30* najprej se sintetizirajo kot proencimi, ki se aktivirajo po cepitvi na mestu, kjer so prisotni Asp - omogočeno samoprocesiranje in aktivacija med kaspazami (1f2, 4f1, 3f7, 3,7f10) - ko je aktivirana ena se aktivirajo še druge
 - 31* C - cistin na aktivnem mestu
 - 32* Asp - za delovanje potrebuje Asp
 - 33* aza - encim
 - 34* 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 1f3
- 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 megakanolov - 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 telesa)
 - 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 κ B - vpliva na izraz več genov (pleotropen učinek) - vsi imajo antiapoptotski učinek - delovanje proti TNFa
- preživetje celice je odvisno od aktivacije kaspaze 8 ali transkr. faktorjev
- - če je nivo NF κ B zelo visok - ravnnot. na strani preživetja
- osr, vloga v indukciji NF κ B - TRAF (TNF - rec. associated factor) - ta prot bo uspešno reguliral NF κ 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^{-TDY} ni prišlo do hibridizacije, z XX^{+TDY} 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 aktivacija 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, leydigive celice - ni izločanja testosterona
- antimüler faktor - preprečuje razvoj Mülerjevega kanala v jajcevode. 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 testosteronski 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^{gm} - ženska - izpad testosteronkega receptorja

Y, TDYfiX, TDX finedif. gonade

fi+ fitestisi

fi- fiovariji

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 vezat - zaviranje Tdx - razvoj ovarijev.