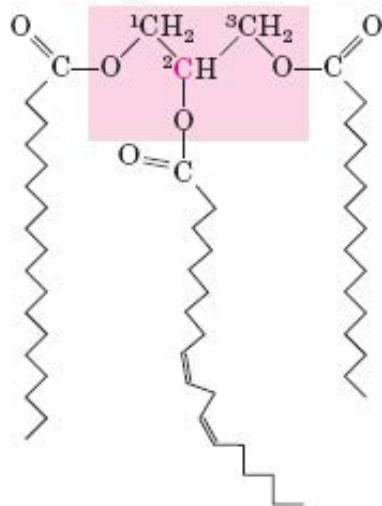


Funkcije proteinov (pogojene s strukturo)

- Oporna funkcija (strukturni proteini, npr keratini, kolagen ...)
- Transport/skladiščenje molekul (ligandov, npr. O₂ v Hb, Mb)
- Uravnavanje - DNA-vezavni proteini (histoni, transkripcijski faktorji)
- Obramba pred tujki/invazivnimi organizmi (Imunoglobulini)
- **Transport lipidov (lipoproteini, označeni z apolipoproteini)**
- Gibanje: kontraktilni proteini
- Transport molekul/ionov preko membrane (membranski proteini)
- Prenos signala (receptorji, G-proteini, kinaze ...)
- Kataliza biokemijskih reakcij (encimi)

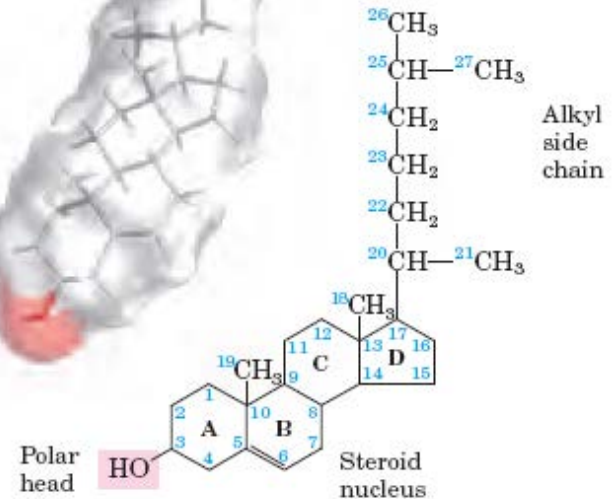
Nepolarne (hidrofobne) molekule se prenašajo po krvi shranjene v amfipatičnih strukturah (lipoproteinskih delcih)

triacilglicerol



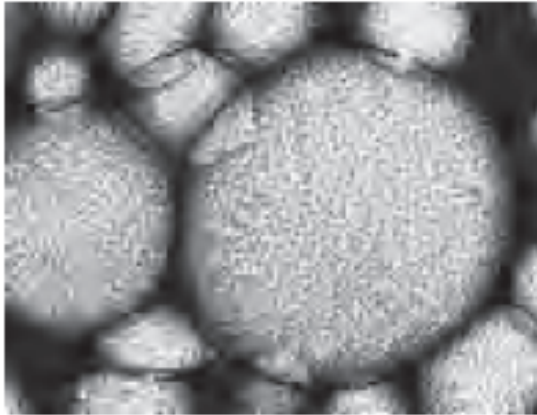
1-Stearoyl, 2-linoleoyl, 3-palmitoyl glycerol, a mixed triacylglycerol

holesterol

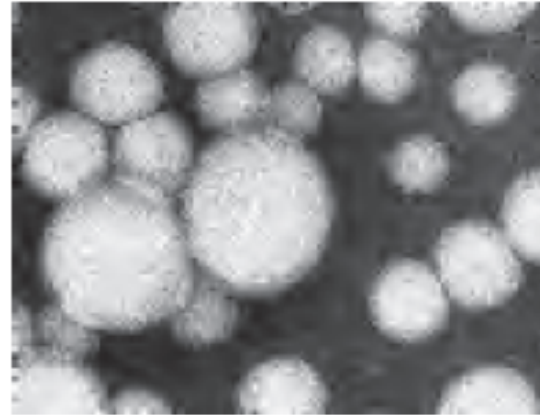


Primeri nepolarnih molekul - lipidov

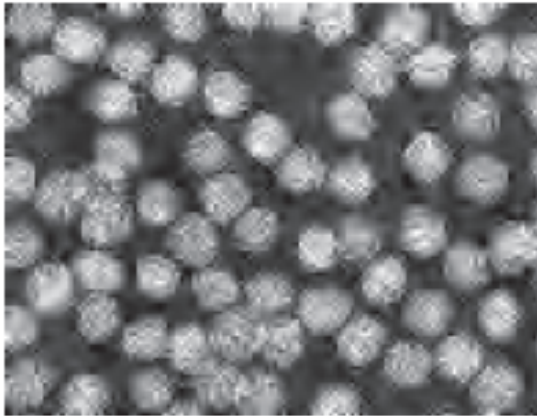
Lipoproteini so nadmolekulski kompleksi lipidov in proteinov



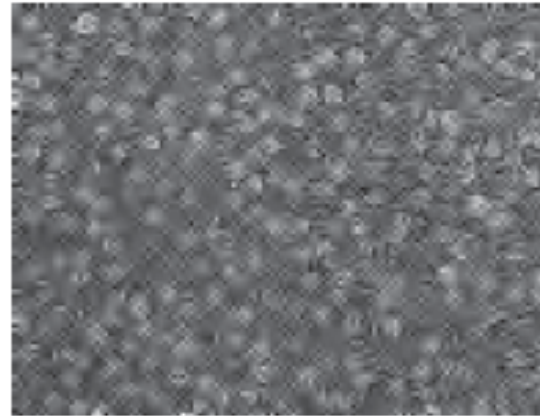
Chylomicrons ($\times 60,000$)



VLDL ($\times 180,000$)



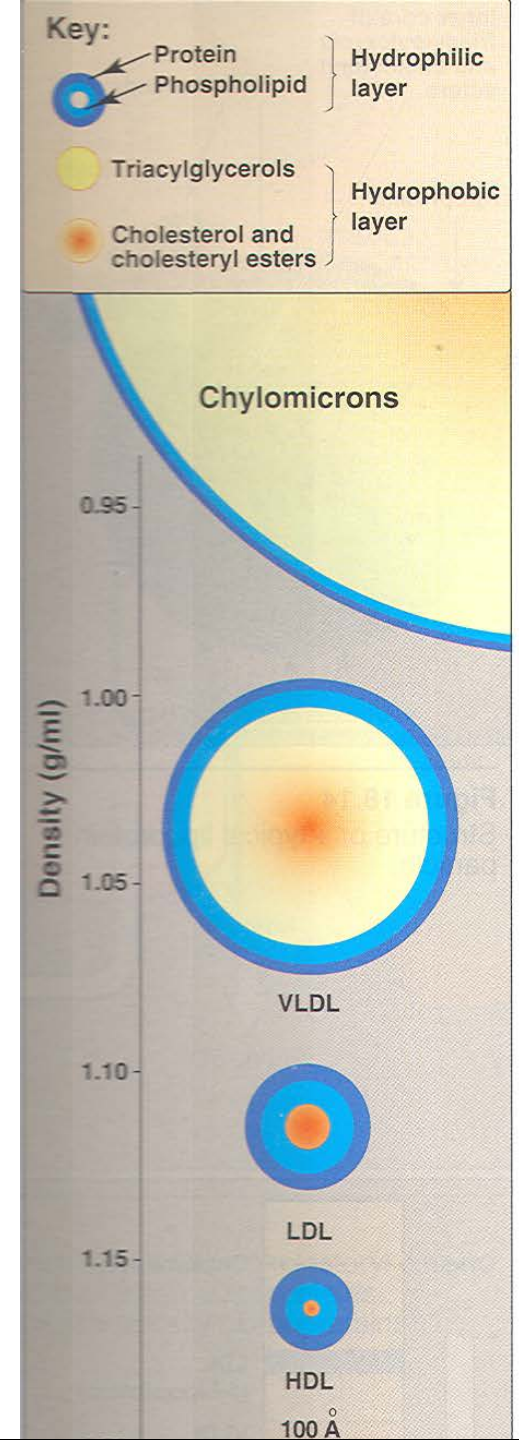
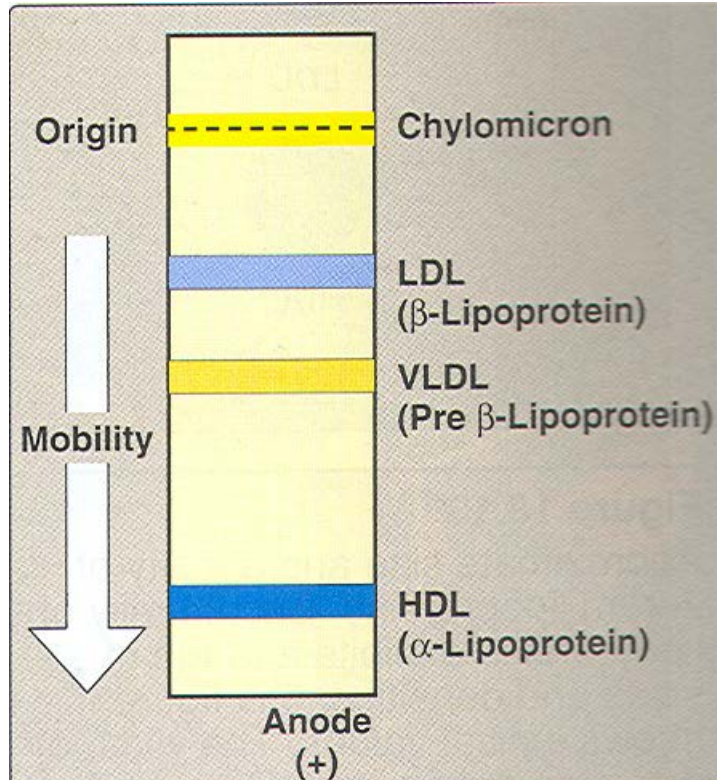
LDL ($\times 180,000$)



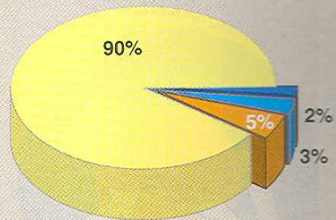
HDL ($\times 180,000$)

4 vrste lipoproteinskih delcev, vidnih z elektronskim mikroskopom

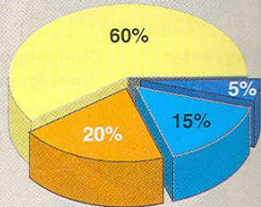
Lipoproteine lahko ločujemo z elektroforezo



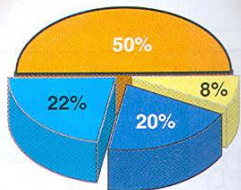
Sestava lipoproteinov



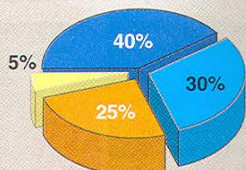
Chylomicron



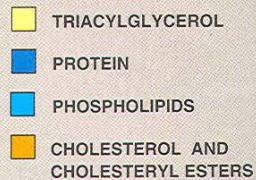
Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)



Low-Density Lipoprotein (LDL)



High-Density Lipoprotein (HDL)

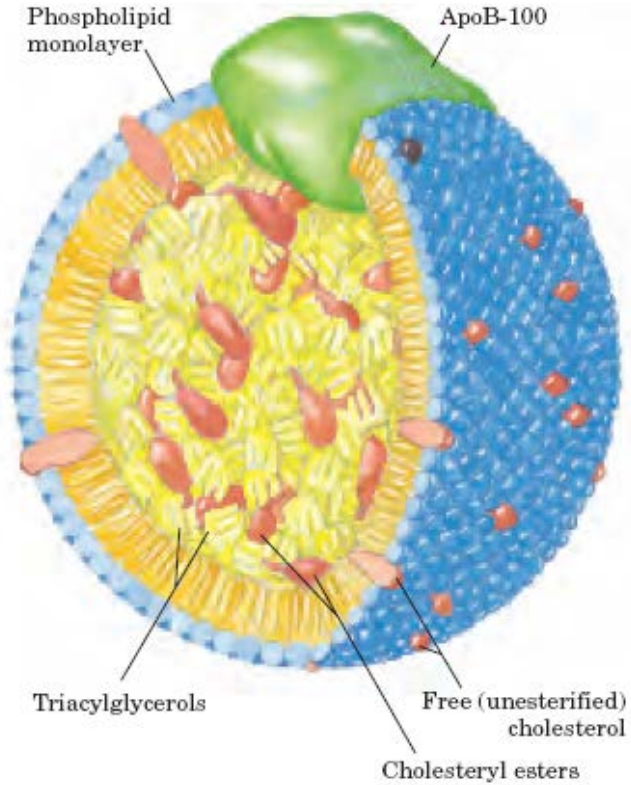


	TAG	Fosfolipidi	Holesterol in estri	Proteini
Hilomikroni	+++	-	-	-
VLDL	++	+	+	-
LDL	-	+	++	+
HDL	-	+	+	++

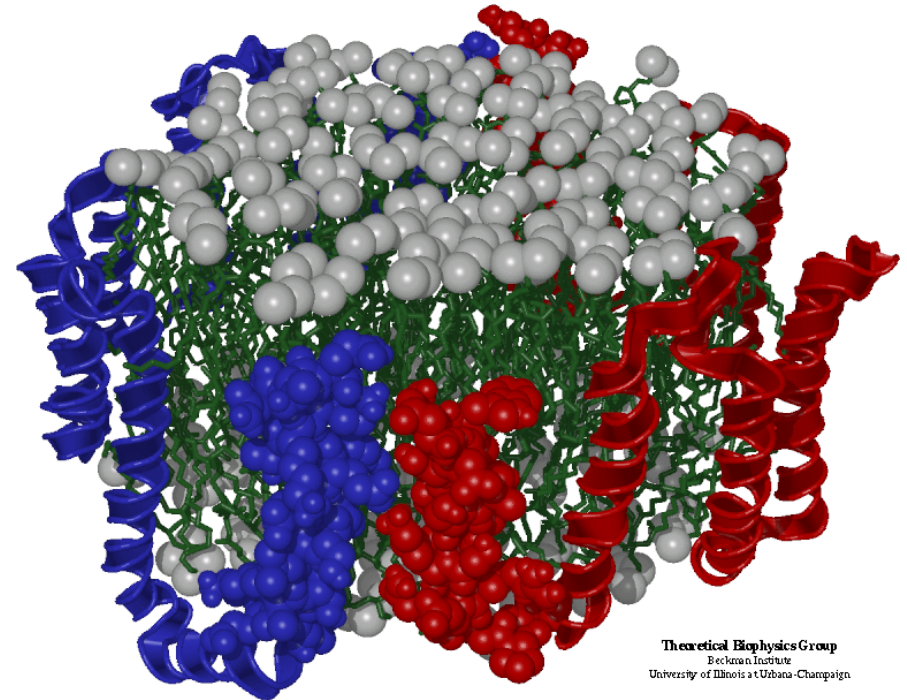
- manj kot 10%
- + 20-40%
- ++ 40 – 80%
- +++ več kot 80%

Gostota: proteini > fosfolipidi > holesterol in estri > TAG

Modeli LDL in HDL s specifičnimi apolipoproteini

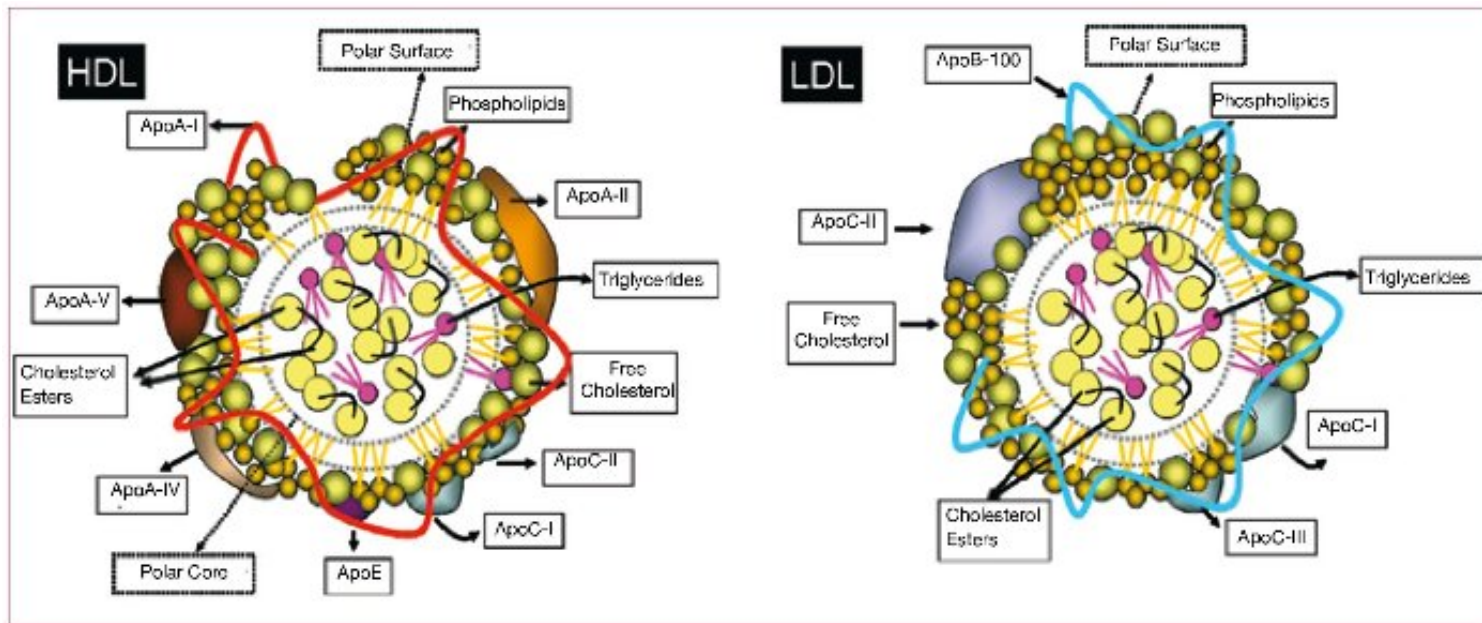


Struktura LDL z **apolipoproteinom B-100**

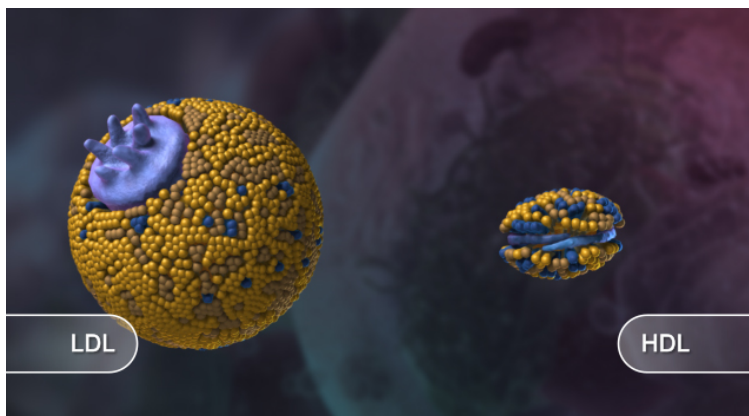


Struktura HDL z **apolipoproteinom A1**

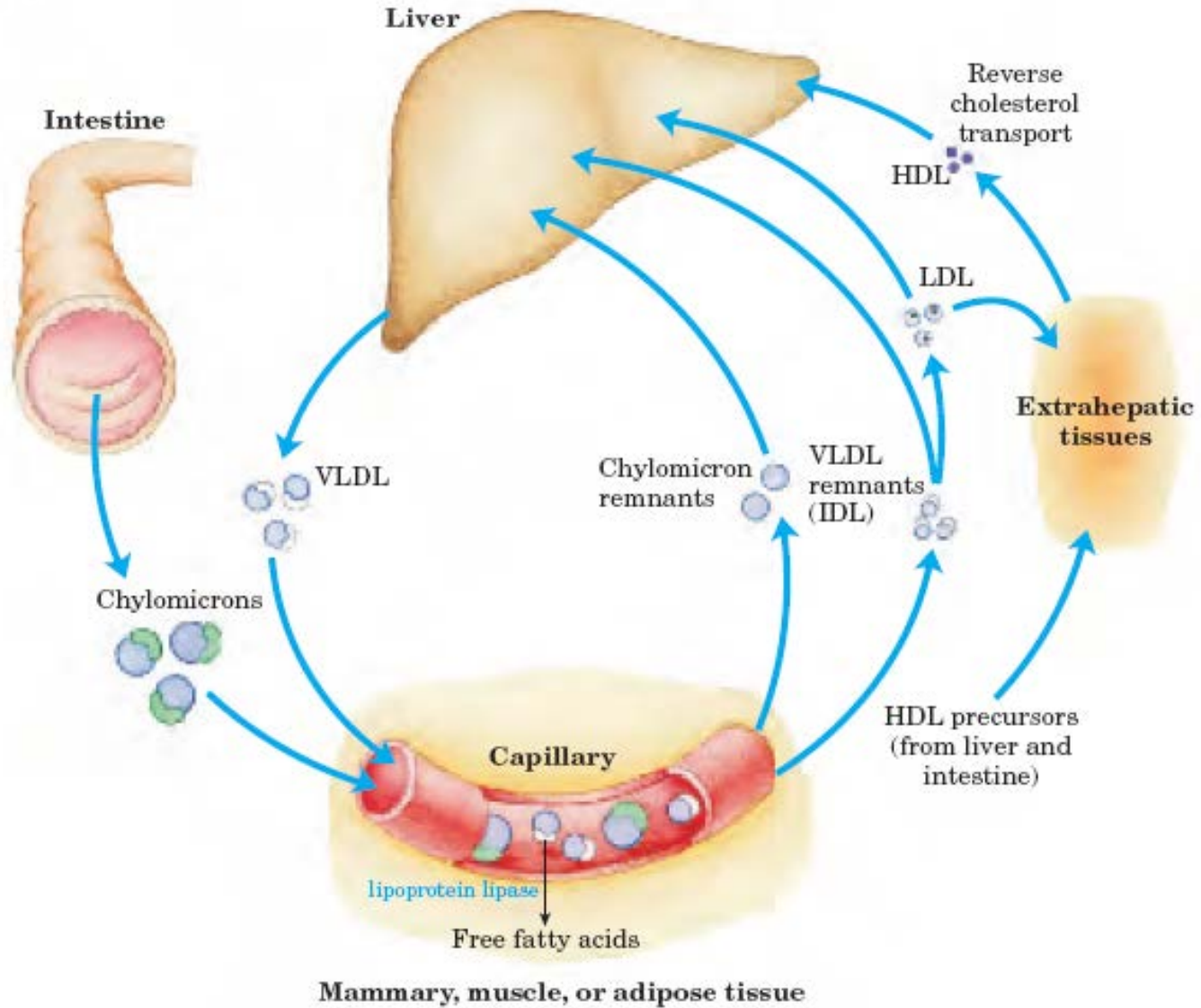
Apolipoproteini določajo, v katere celice se bodo lipidi prenašali.



Rev Esp Cardiol.2009; 62(10) :1161-78



Kroženje lipoproteinov

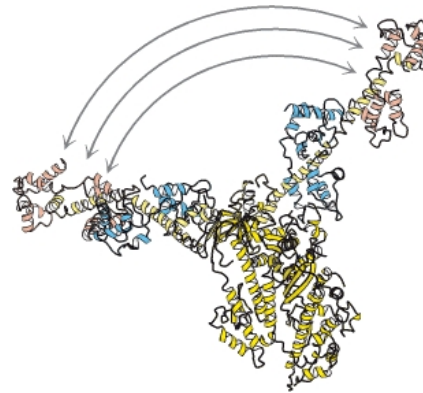


Funkcije proteinov (pogojene s strukturo)

- Oporna funkcija (strukturni proteini, npr keratini, kolagen ...)
- Transport/skladiščenje molekul (ligandov, npr. O₂ v Hb, Mb)
- Uravnavanje - DNA-vezavni proteini (histoni, transkripcijski faktorji)
- Obramba pred tujki/invazivnimi organizmi (Imunoglobulini)
- Transport lipidov (lipoproteini)
- **Gibanje: kontraktilni proteini**
- Transport molekul/ionov preko membrane (membranski proteini)
- Prenos signala (receptorji, G-proteini, kinaze ...)
- Kataliza biokemijskih reakcij (encimi)

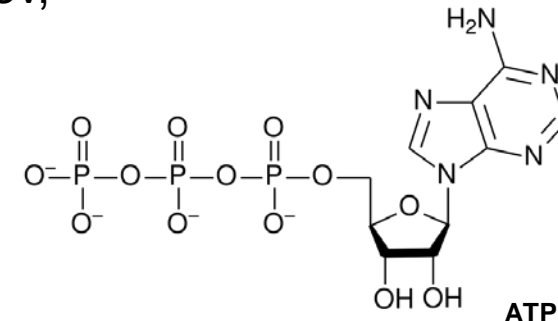
Gibanje

- Organizmi (kontrakcija mišic)
- Celice (gibanje bičkov in migetalk)
- Organeli (reorganizacija kromosomov med delitvijo celic)
- Makromolekule (drsenje proteinov vzdolž DNA med transkripcijo)



Princip – molekularni motorji

- Energija (hidroliza ATP) – **kemična energija se pretvarja v kinetično**
- Encimi, ki gibanje omogočajo, so **NTPaze s P zanko**
- Konformacijske spremembe velikih molekulskih agregatov, ki so strukturno zelo urejeni
- Konformacijske spremembe se ciklično ponavljajo
- Usmerjena sila

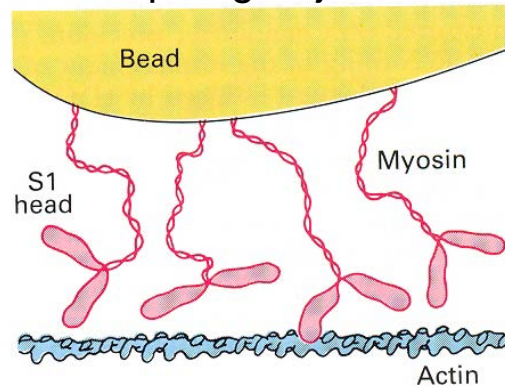


Primeri gibanja na molekularni ravni

Interakcije med kontraktilnimi proteini vključujejo komplementarne razporeditve med ionskimi, vodikovimi, hidrofobnimi in van der Waalsovimi interakcijami.

Te interakcije imajo nenavadno visoko raven prostorske in časovne organizacije.

“Korakanje” kroglice s pripetim miozinom po ogrodju aktina



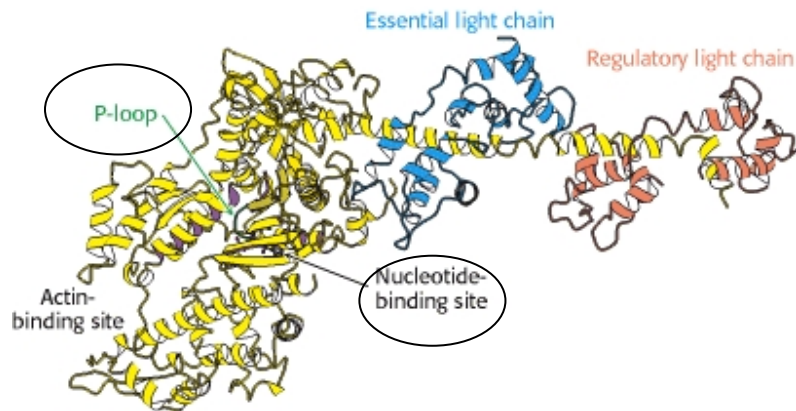
Konformacijska sprememba enega proteina povzroči njegov premik ob drugem proteinu

Gibanje omogočajo molekularni motorji

-miozini, kinezini, dineini – različna AK sestava, podobna 3D struktura,

-Človeški genom vsebuje 40 različnih miozinov, preko 40 kinezinov in približno 10 dineinov.

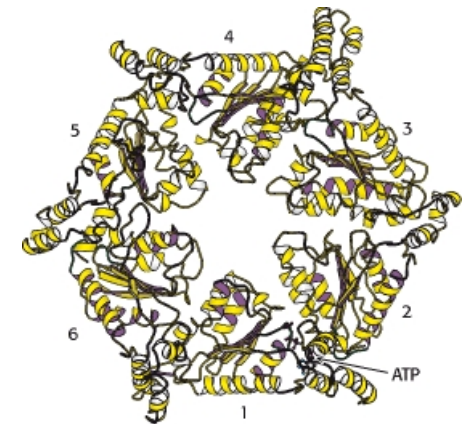
- vsi vsebujejo NTPazo domeno s P zanko (P-loop NTPase), (ki je podobna domeni G proteinov).



miozin

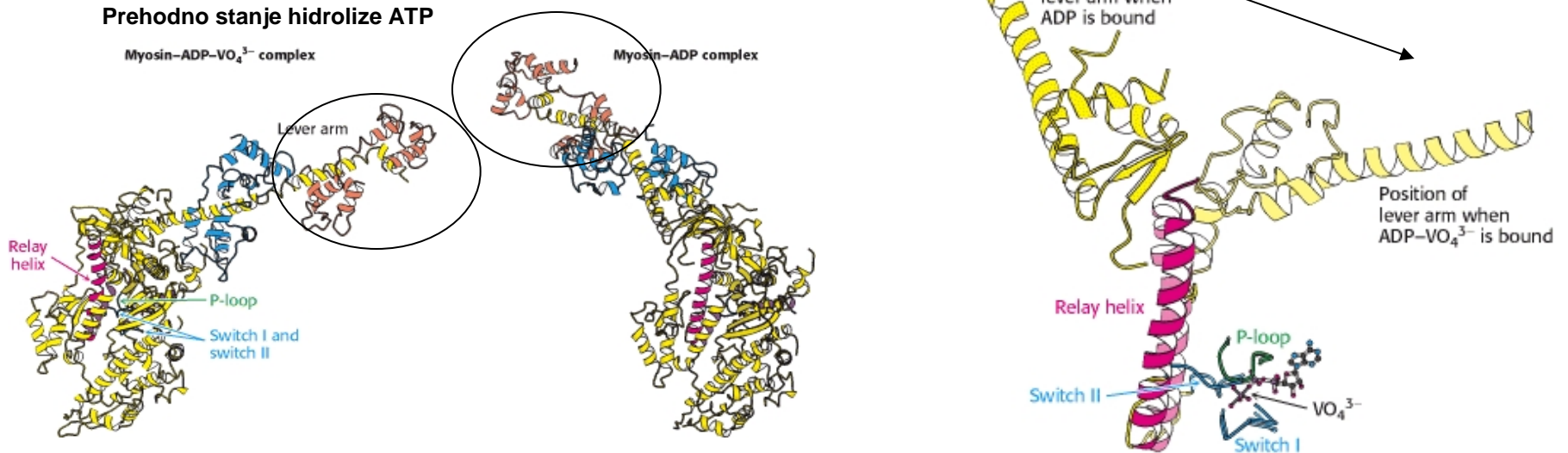


kinezin



dinein

Vezava ATP (in hidroliza) povzroči spremembo v konformaciji in v vezavni afiniteti molekularnih motorjev



-Po hidrolizi ATP se je ročica obrnila za skorajda 90 kotnih stopinj !!

-Po spremembi vezanega nukleotida se smer celotnega alfa heliksa obrne.

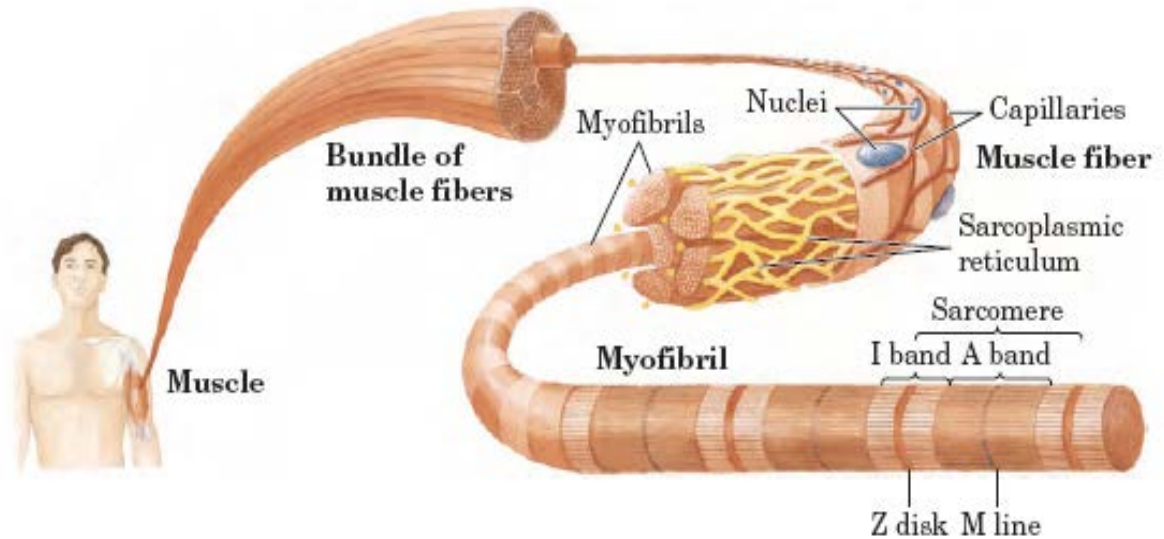
-Miozin: vezava ATP signifikantno zmanjša afiniteto miozina do aktina (miozinskih glav do aktinskih filamentov).

Sestava mišičnega vlakna progaste mišice

Mišični kontraktilni proteini

- miozin
 - aktin
- } interakcija → kontrakcija
- tropomiozin
 - troponin
- } uravnavanje kontrakcije

-
- α -aktinin
 - dezmin
 - vimentin
 - *nebulin*
 - paramiozin
 - C-protein
 - M-protein
 - *titin*
 - *distrofin*

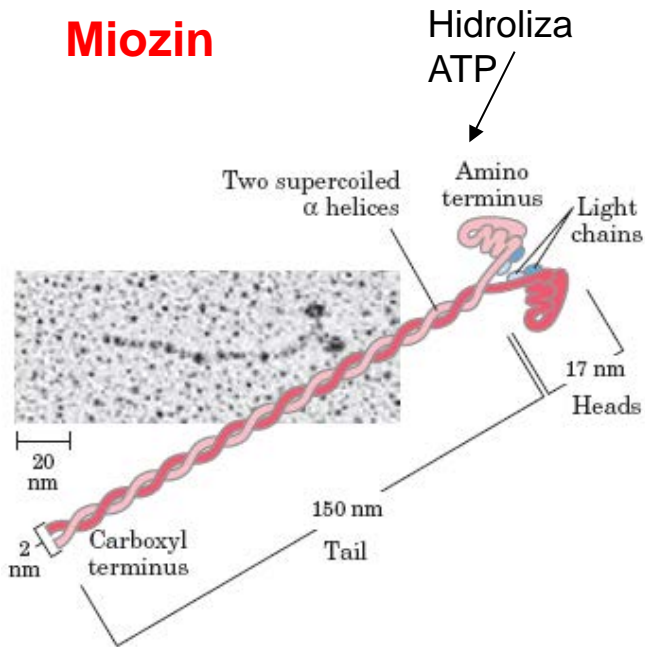


Proteini progaste mišice

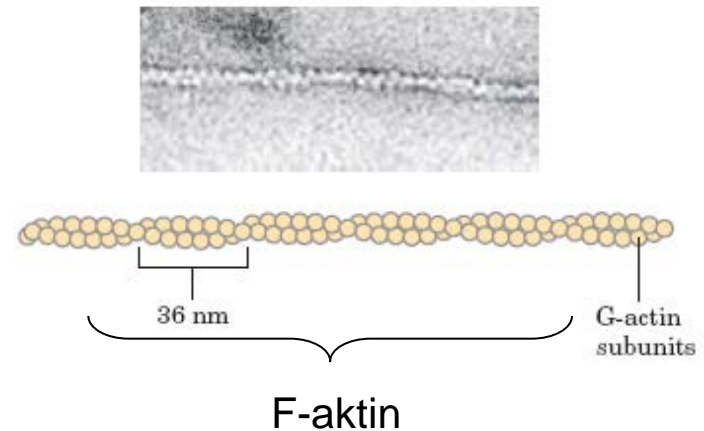
- **Miozin, aktin** (motorična proteina) – povezujeta se s šibkimi interakcijami
- **Tropomiozin, troponin** (uravnavanje kontrakcije)
- Z obroč tankih filamentov – **α -aktinin, dezmin, vimentin**
- Preko celotnega tankega vlakna – **nebulin** (7000 ak, α -vijačnica)
- M linija debelih vlaken – **paramiozin, C-protein in M-protein**
- Povezovanje debelih vlaken na Z obroč – **titin** (26 926 ak) določa dolžino sarkomere in preprečuje preobsežno raztegotanje mišice
- **Distrofin**

Glavna mišična kontraktilna proteina sta miozin in aktin

Miozin



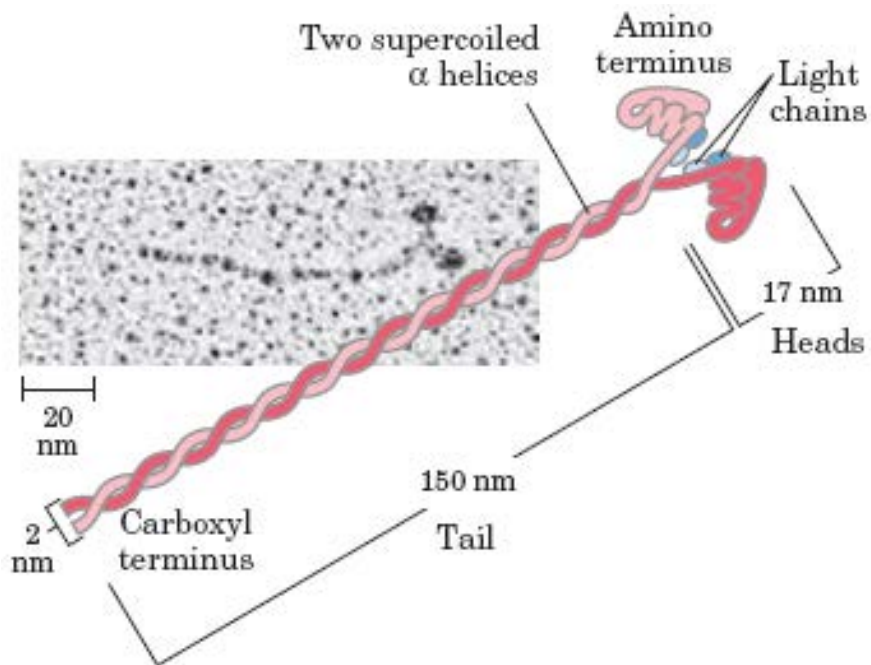
Aktin



- 6 podenot, Mw 540 000 Da
- 2 težki verigi (220 000 Da) (ovita vijačnica)
- 4 lahke verige (pripete na "glavo")
- Tvori debele (široke?) filamente mišičnih vlaken
- Je molekularni motor, ki s hidrolizo ATP omogoči gibanje

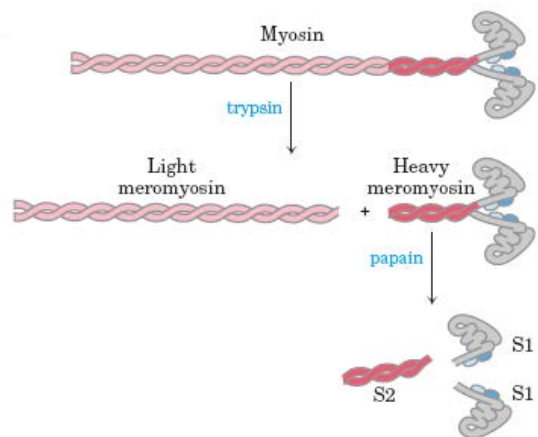
- G aktin je globularni protein, Mw 42 000 Da
- Tvori polimere filamentoznega F aktina
- Tvori tanke filamente mišičnih vlaken
- Vsaka molekula G-aktina veže 1 molekulo ATP
- Hidroliza ATP aktina vpliva na povezavo G aktina v F aktin, ne prispeva direktno h kontrakciji mišic

Miozin: 6 podenot (2 teži in 4 lahke verige)

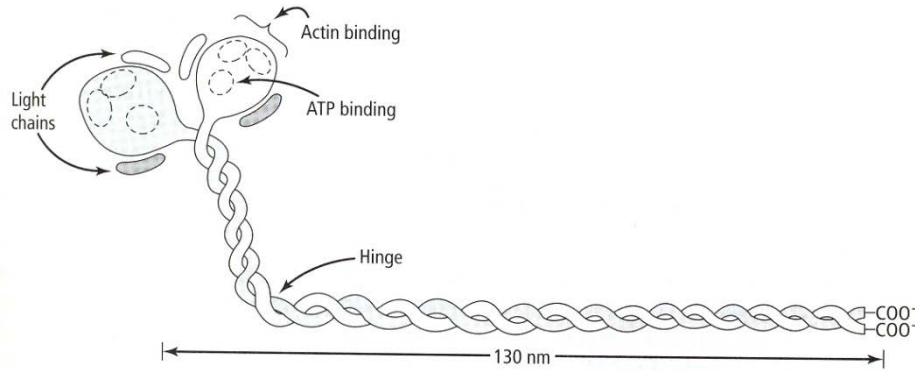


- Miozin, Mr 540 000,
- Težka veriga, Mr 220 000
- Lahka veriga, Mr 20 000

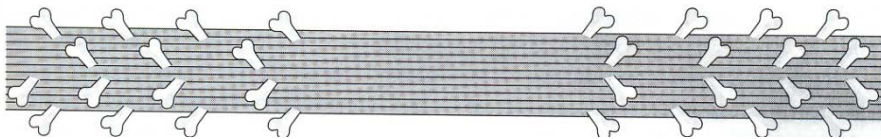
Strukturo so določili prek razgradnih produktov



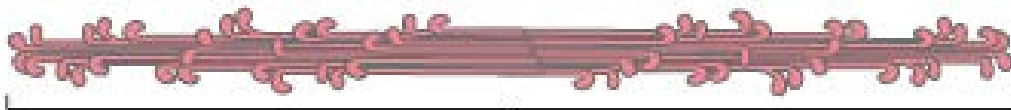
Struktura miozina in debelih filamentov



več 100 molekul miozina



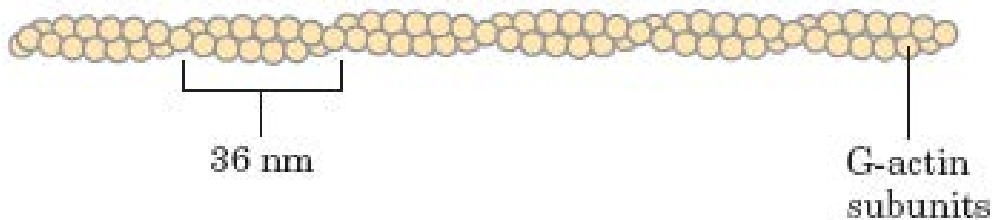
Elektronsko mikroskopska slika debelih filamentov



Model strukture debelih filamentov

Struktura aktina in tankih filamentov

aktin

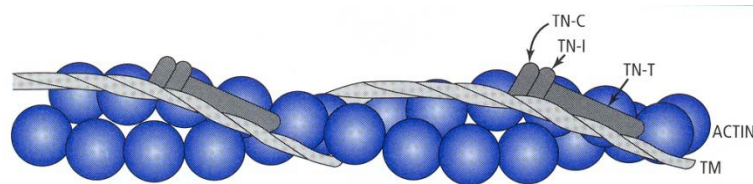


- F-aktin je polimer globularnih G-aktinov
- M_r 42 000
- Za polimerizacijo v F-aktin je potrebna energija (hidroliza 1 molekule ATP za 1 podenoto G-aktina)
- Na vsako podenoto F-aktina se specifično veže miozinska glava
- **Samozdruževanje molekul G aktina**

Struktura tankih filamentov

F-aktin (strukturni protein)

tropomiozin in troponin (uravnavanje mišične kontrakcije)



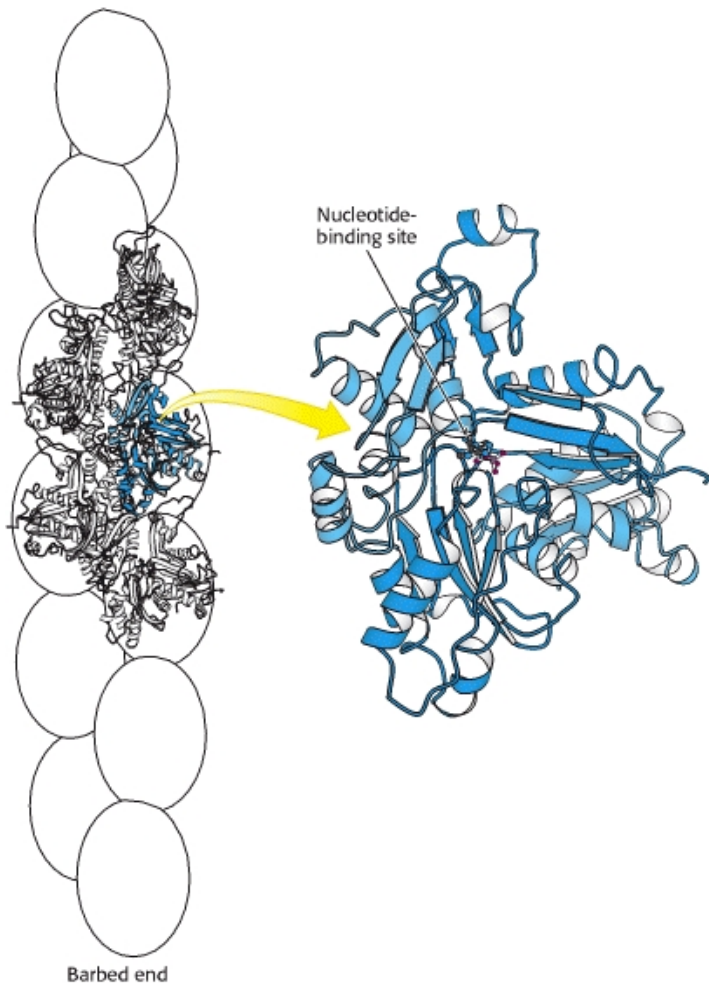
TM – tropomiozon

TN-C – troponin veže Ca^{2+}

TN-I – inhibira vezavo
miozina na aktin

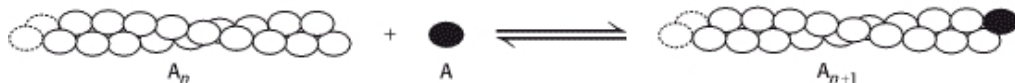
TN-T – veže se na
tropomiozin

Aktin je polaren, samozdružujoč dinamični polimer



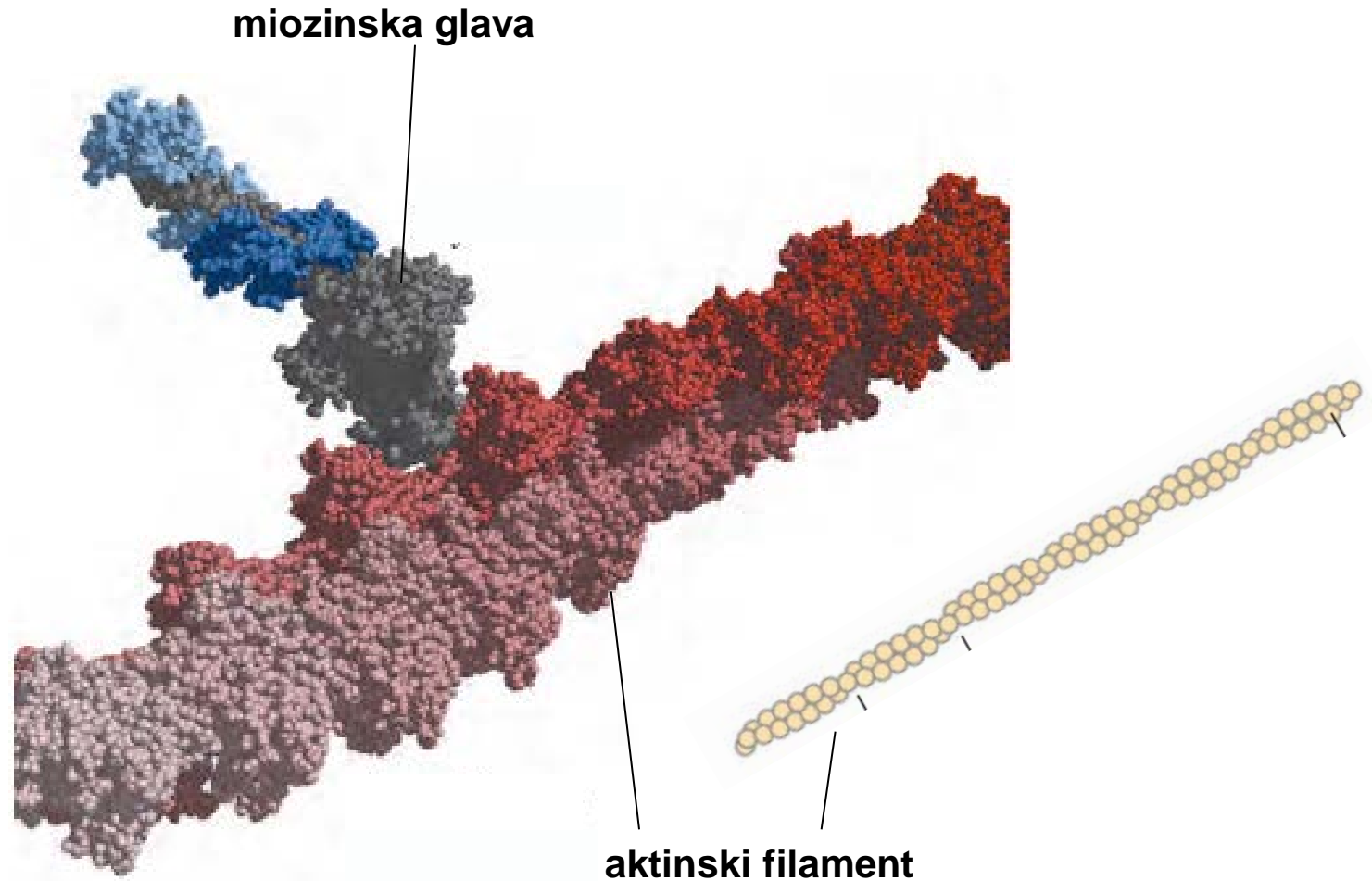
$$K_d = \frac{[A_n][A]}{[A_{n+1}]}$$

$$[A_n] \approx [A_{n+1}] \text{ and so } K_d = \frac{[A_n][A]}{[A_{n+1}]} \approx [A]$$



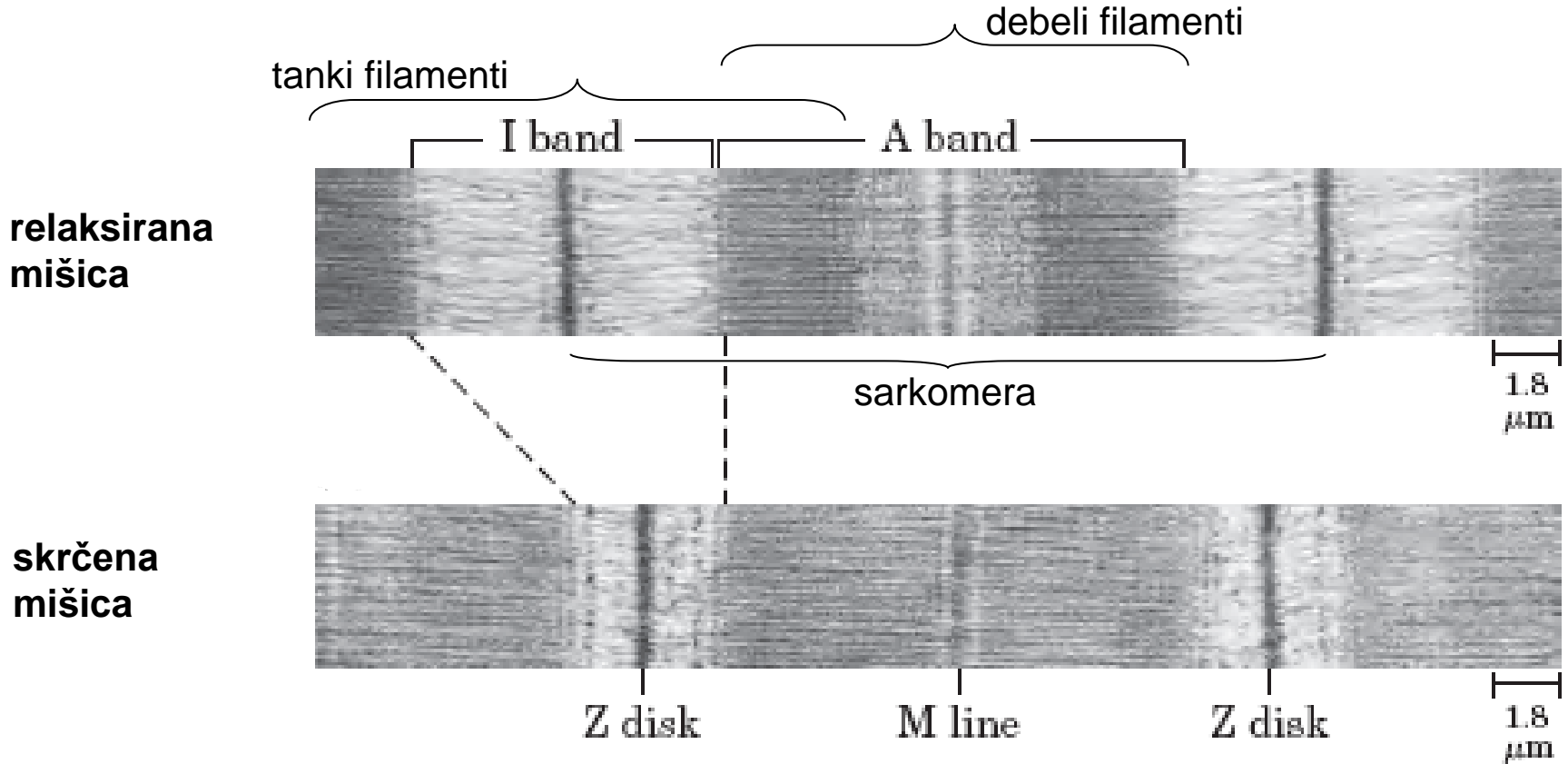
K_d – kritična koncentracija monomera –
 K_d mora biti presežena, da poteka polimerizacija. Če je manjša. Poteka depolimerizacija.

Interakcija miozinske glave z monomerno enoto (dimer G-aktina) aktina



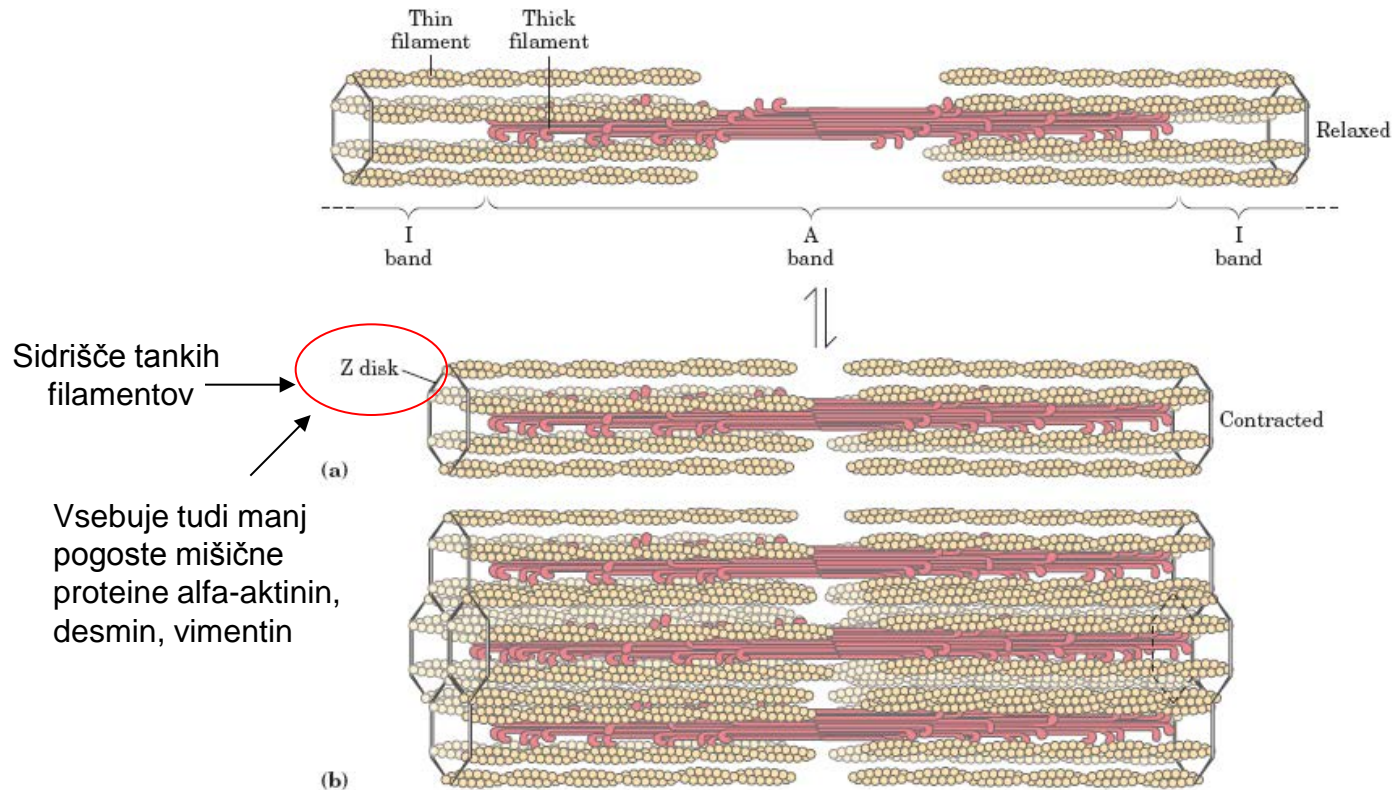
- Na vsako podenoto F-aktina se veže miozinska glava

Elektronsko-mikroskopska slika progaste mišice



- **I pas** (Izotropni) – nizka elektronska gostota, **A pas** (Anizotropni) – visoka elektronska gostota
- **I pas** – tanki filamenti
- **A pas** – debeli filamenti in prekrivanje tankih in debelih filamentov
- **Z obroč** – pripenjanje tankih filamentov (od Z do Z – sarkomera)
- **M linija** – pripenjanje debelih filamentov

Krčenje mišice– drsenje debelih vlaken miozina ob tankih vlaknih aktina

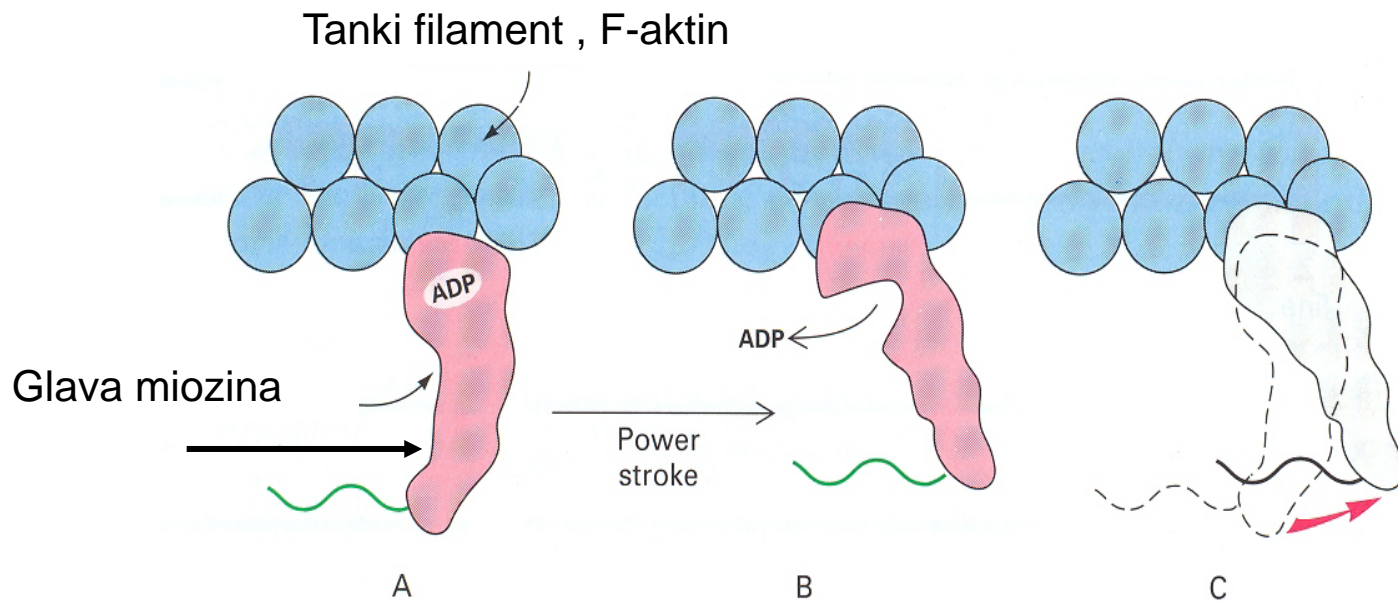


<http://www.youtube.com/watch?v=0kFmbrRjQ4w&feature=related>

Sarkomera – kontraktilna enota progaste mišice, sestavljena iz tankih in debelih vlaken.

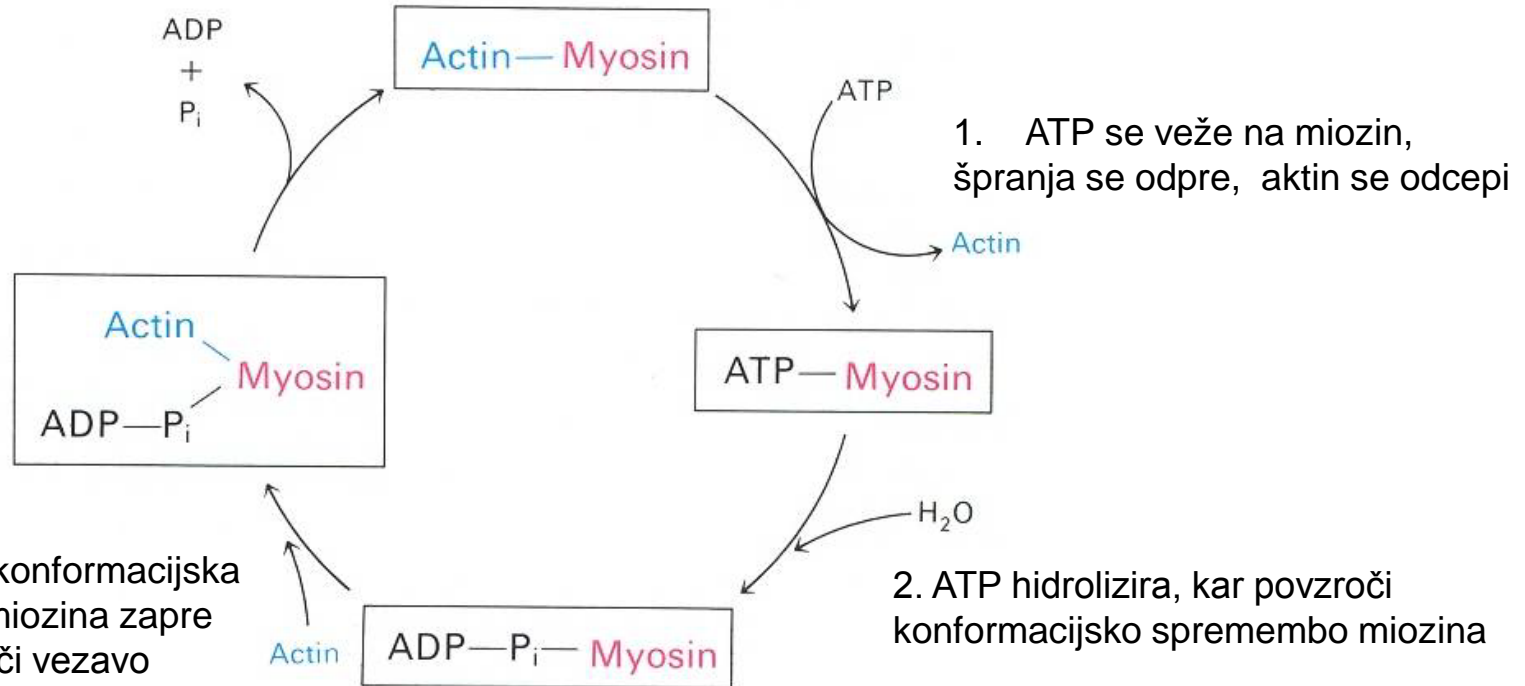
Titin in nebulin sta molekularni ravnili, ki določata dolžino tankih in debelih filamentov.

Konformacijske spremembe miozina med kontrakcijo



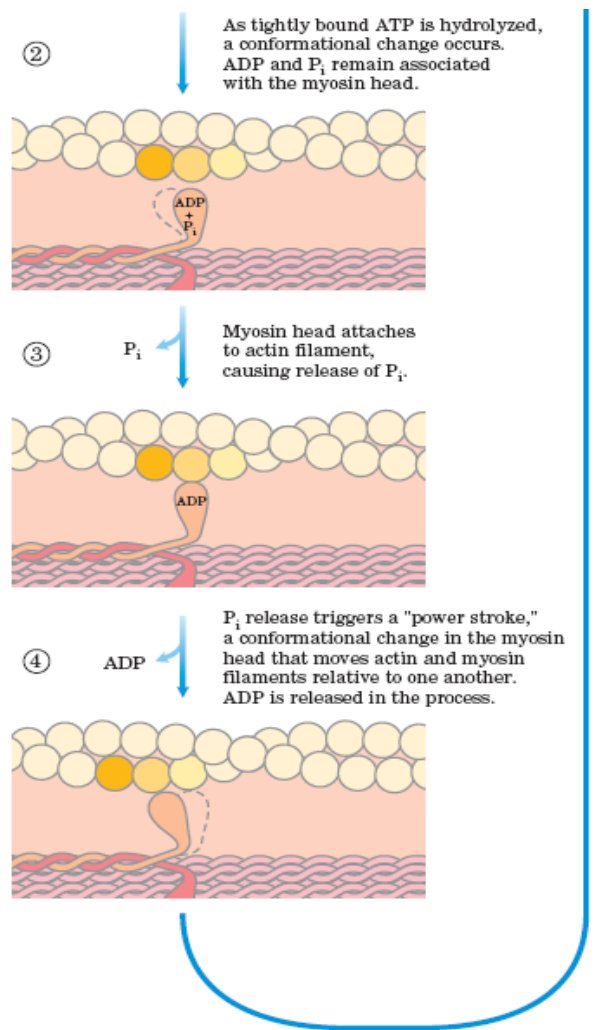
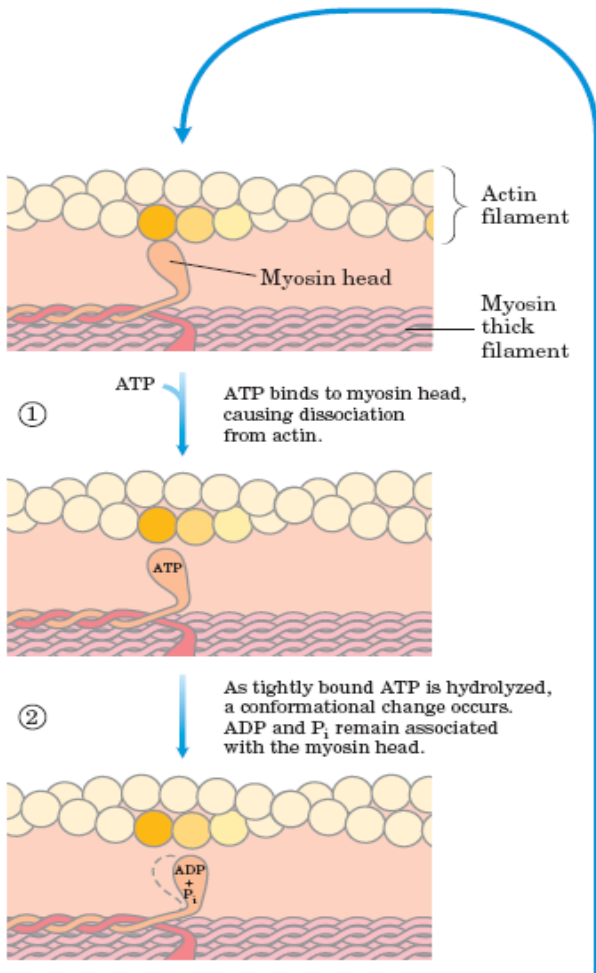
Mehanizem mišične kontrakcije

4. Usmerjena sila (poteg), med katero se miozinske glave vrnejo v prvotno stanje. To povzroči spremembo orientacije in premik miozinskega repa k Z disku. ADP se sprosti.



Konformacijska sprememba enega proteina povzroči njegov premik ob drugem proteinu

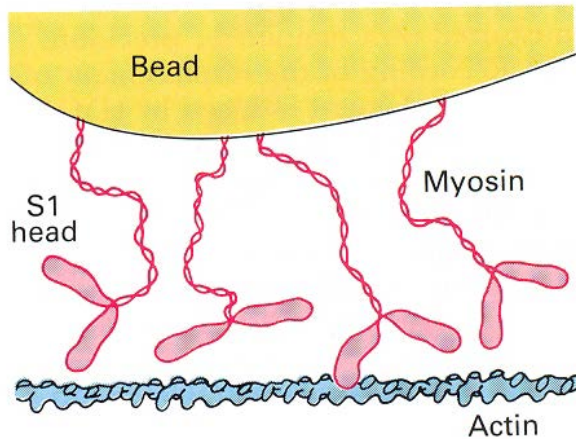
Mehanizem mišične kontrakcije



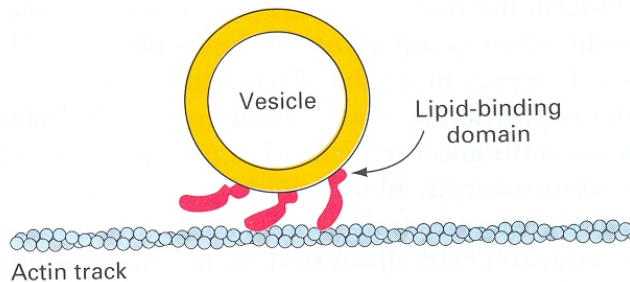
Celoten krog generira silo 3-4 pN → premik tankega filamenta ob debelem za 5-10 nm

Interakcija miozina in aktina – usmerjena sila

In vitro dokazi:



“Korakanje” kroglice s pripetim miozinom po ogrodju aktina



“Korakanje” vezikla po ogrodnen aktinu

Nemišični kontraktilni proteini

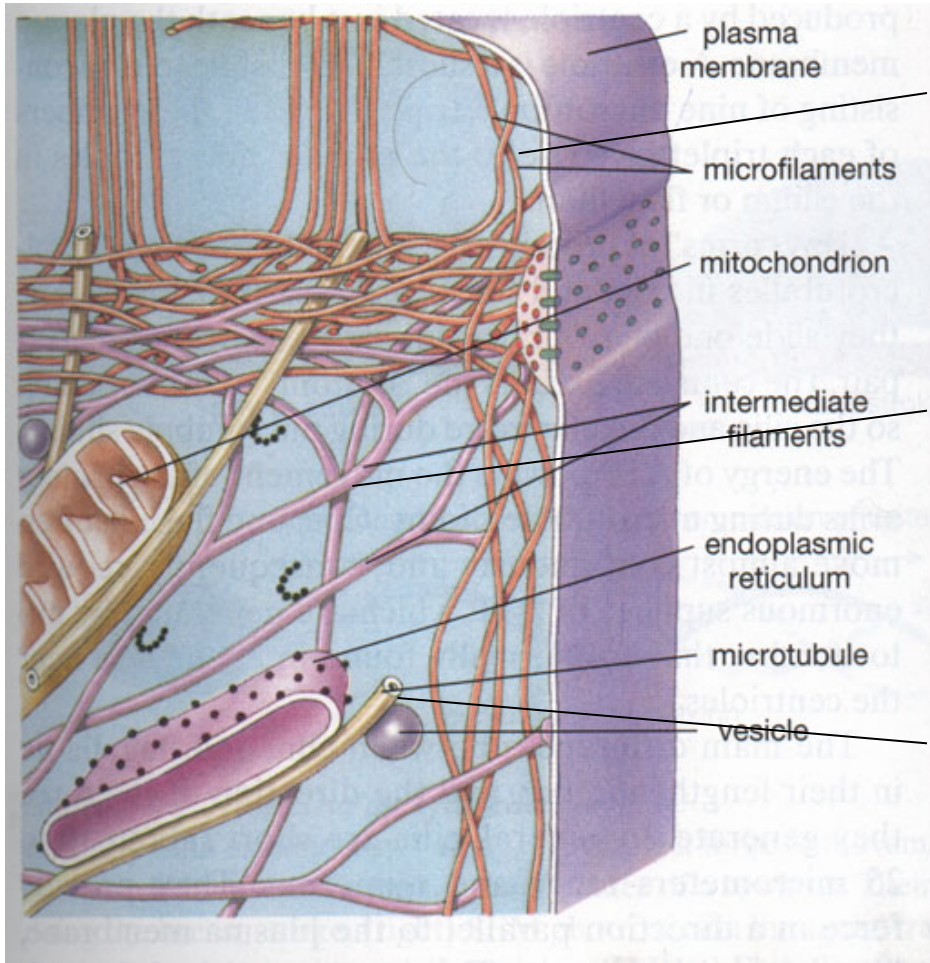
- **V citoskeletu**

- mikrofilamenti – Φ ~7 nm, najpomembnejši **protein aktin**; funkcija konsistenca citoplazme in gibanje v interakciji z **nemišičnim miozinom**
- mikrotubuli – Φ ~24 nm; najpomembnejši **protein tubulin** funkcija – vzdrževanje oblike celice in sodelovanje v znotrajceličnem transportu v interakciji s **kinezinom**

- **Migetalk in bički**

mikrotubuli (**proteini tubulin A in tubulin B**) in **protein dinein** – gibanje migetalk in bičkov

Citoskelet evkariontske celice: prikaz mikrofilamentov in mikrotubul



Mikrofilamenti: 2 zviti verigi proteina **aktina**;
funkcija: oblika celice, gibanje citoplazme,
gibanje organelov

Intermediarni filamenti: protein **keratin**
funkcija: oblika celice,
interakcija s sosednjimi celicami

Mikrotubuli: cevke, nastale iz dimernih
podenot **tubulina**;
funkcija: gibanje organelov
(gibanje bičkov in migetalk)
gibanje kromosomov

Citoskelet: mreža proteinskih vlaken v citoplazmi, ki daje celici obliko, umešča in giblje organele ter sodeluje pri celičnem gibanju

Aktin v ne-mišičnih celicah

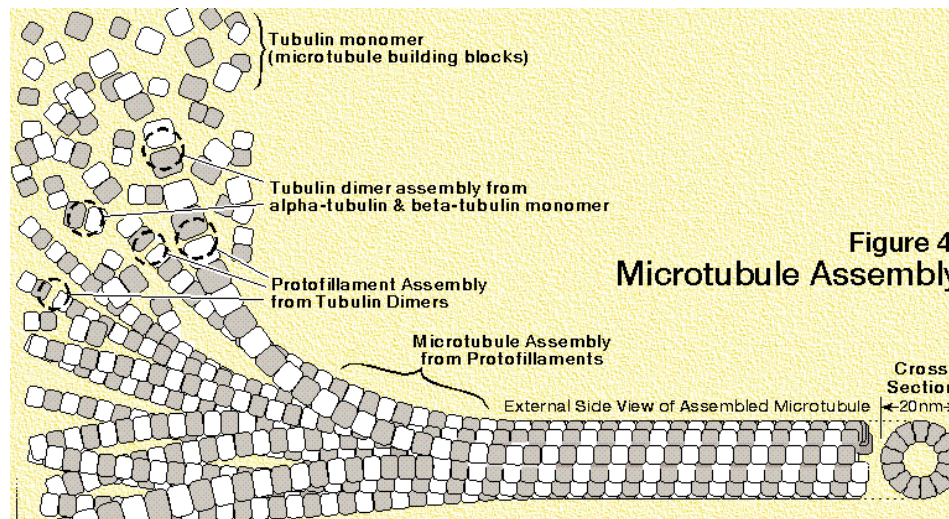
- Pri človeku 6 izoformnih oblik aktina
- Hitra polimerizacija/depolimerizacija G-aktina → od stopnje polimerizacije je odvisna konzistenca citoplazme
- Gibanje makrofagov in nevtrofilcev
- Fagocitoza
- Kontrakcija črevesnih resic
- Sodelovanje pri nastanku delitvenega vretena med mitozo
- Sprememba oblike aktiviranih krvnih ploščic

- Strupi gliv:
 - citokalazin B – inhibira polimerizacijo aktinskih filamentov (se usede na rastoči del filamenta)
 - faloidin (prepreči depolarizacijo)



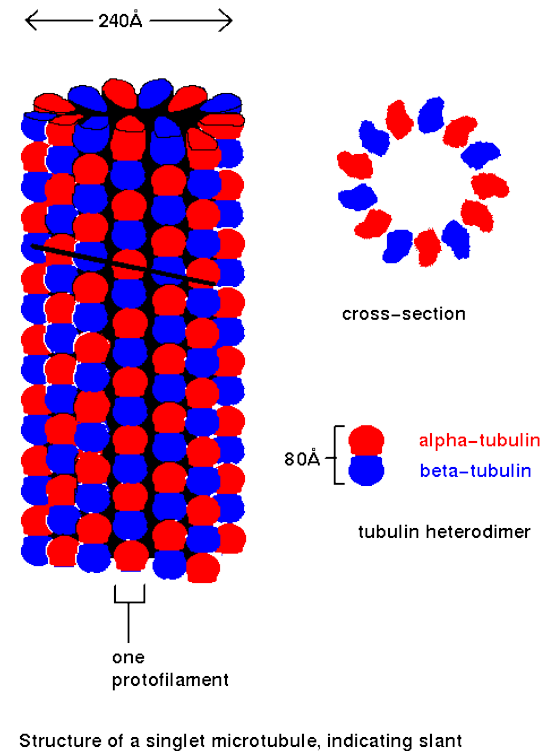
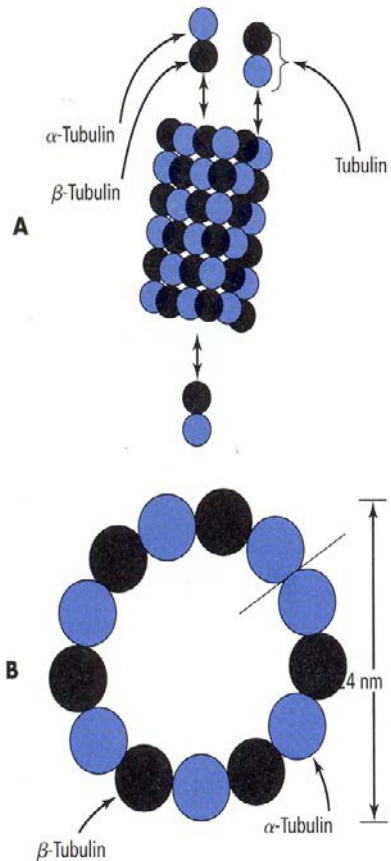
Mikrotubuli

- Nastanejo s polimerizacijo globularnega proteina **tubulina** (2 podenoti: tubulin- α in tubulin- β); polimerizacija poteka v spiralasti razvrstitvi 13 enot/zavoj, do nekaj tisoč molekul tubulina
- Dinamične strukture, asociacija/disociacija enot tubulina
- Mikrotubuli - v vseh celicah z jedri, pomembni za obliko celice
- Sodelujejo v transportnih procesih – med mitozo se kromosomi razmaknejo ob dveh polih mikrotubulov (vlakna mitotskega vretena), sodelujejo pri potovanju veziklov znotraj celice v sodelovanju proteinov z ATPazno aktivnostjo (kinezin)
- Žafranov strup kolhicin inhibira polimerizacijo tubulinov, je inhibitor mitoze - ne nastane delitveno vreteno



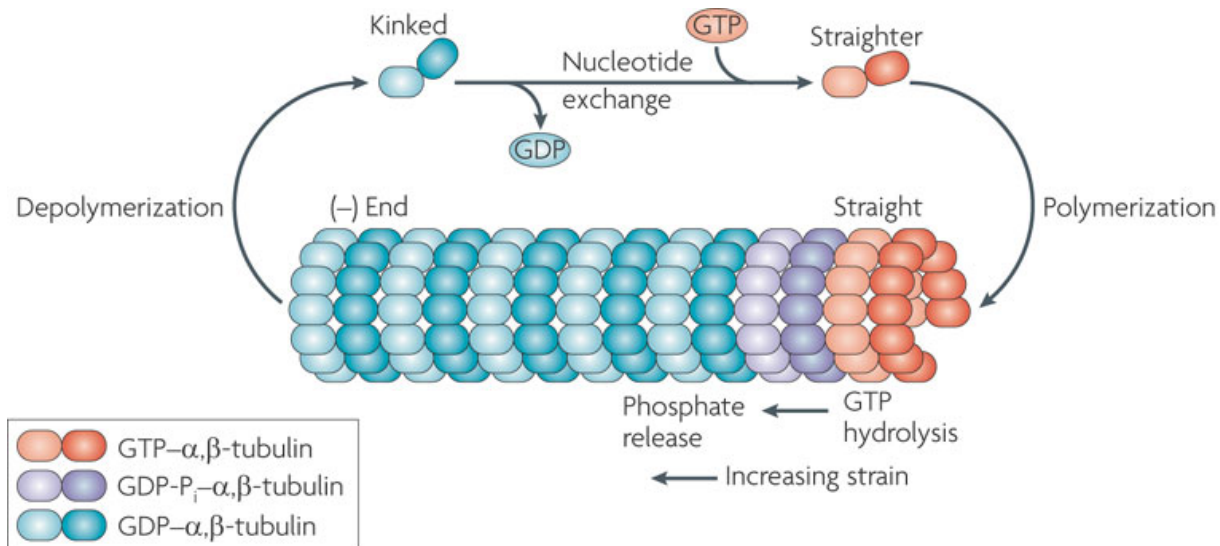
Tubulin v mikrotubulih

- Trdne votle stabilne cevke
- Zunanji premer 24 nm, notranji premer 14 nm
- Nastanejo s polimerizacijo tubulina (alfa in beta podenoti)
- Vijačna ureditev, 13 enot/zavoj
- Dinamično ravnotežje nastajanja/razgradnje polimera
- Mikrotubule vsebujejo vse celice z jedri
- Sodelujejo pri znotrajceličnem gibanju organelov, pri mitozii
- Žafranov strup kolhicin preprečuje polimerizacijo tubulinoov.

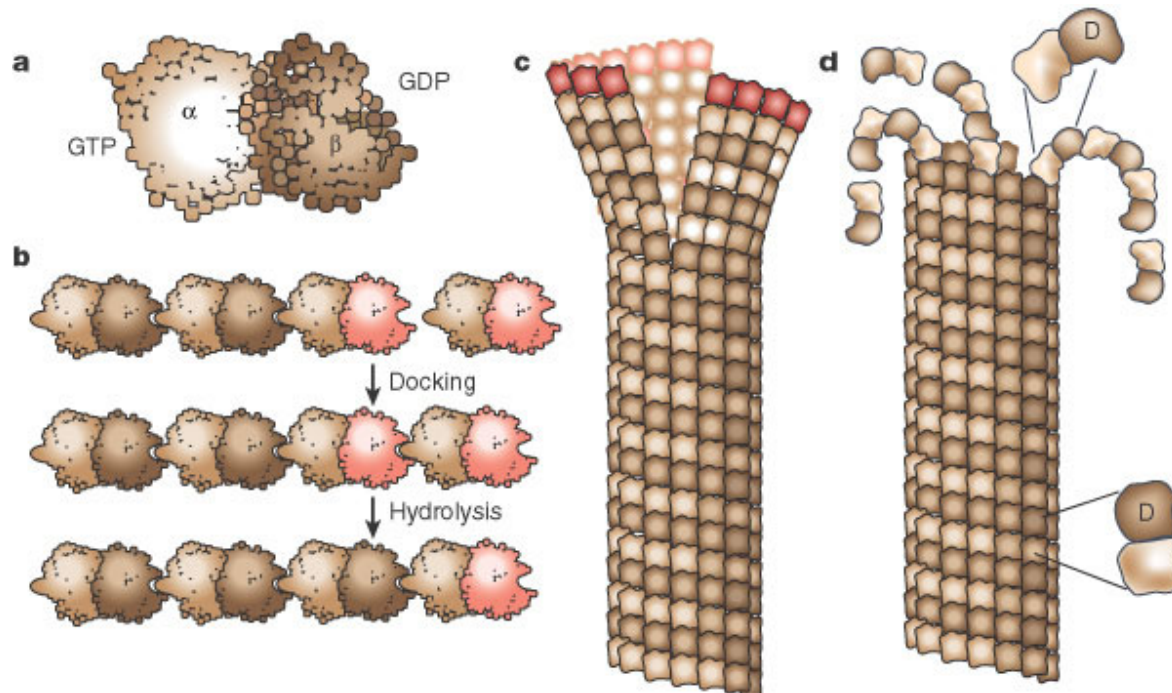


Združevanje molekul tubulina v mikrotubule

- α - in β -tubulin sta majhna, 55 kDa globularna proteina
- α - in β -tubulin vežeta GTP in se pridružita (+) koncu mikrotubula, skupaj z vezanim GTP.
- Ko se dimer priključi mikrotubulu, GTP na β -tubulinu hidrolizira.
- Tubulinski dimeri z vezanim GTP se združujejo v mikrotubule, dimeri z vezanim GDP pa razpadajo.
- Cikel GTP je esencialen za dinamiko tvorbe in razdruževanja mikrotubulov.



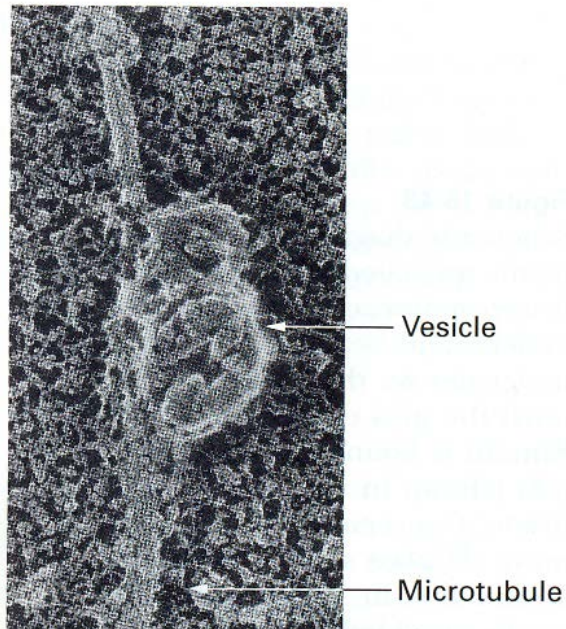
Tvorba in razgradnja mikrotubulov



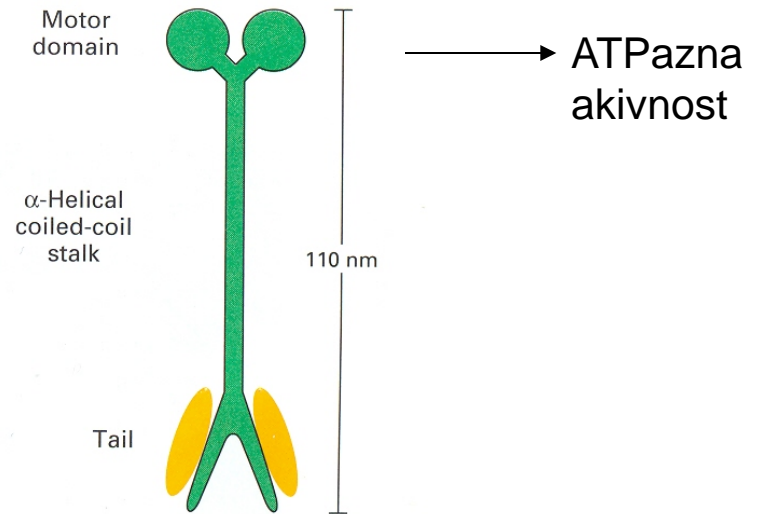
GTP dimer ima konformacijo, ki paše v steno mikrotubula. Hidroliza GTP inducira upogibanje, to pa ni v skladu s steričnimi zahtevami mreže mikrotubula.

Funkcija mikrotubulov: gibanje organelov znotraj celice

El. mikroskopski posnetek
vezikla na mikrotubulu

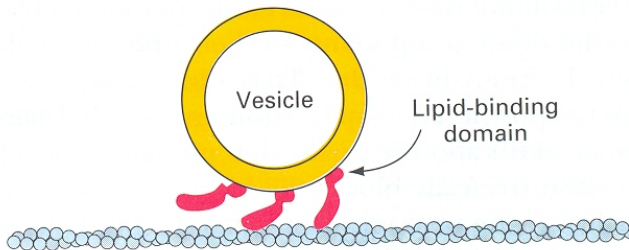


Struktura kinezina

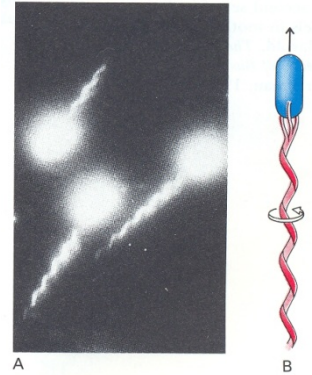


<http://www.youtube.com/watch?v=4AnPVuzF7CA>

<http://www.youtube.com/watch?v=4AnPVuzF7CA>

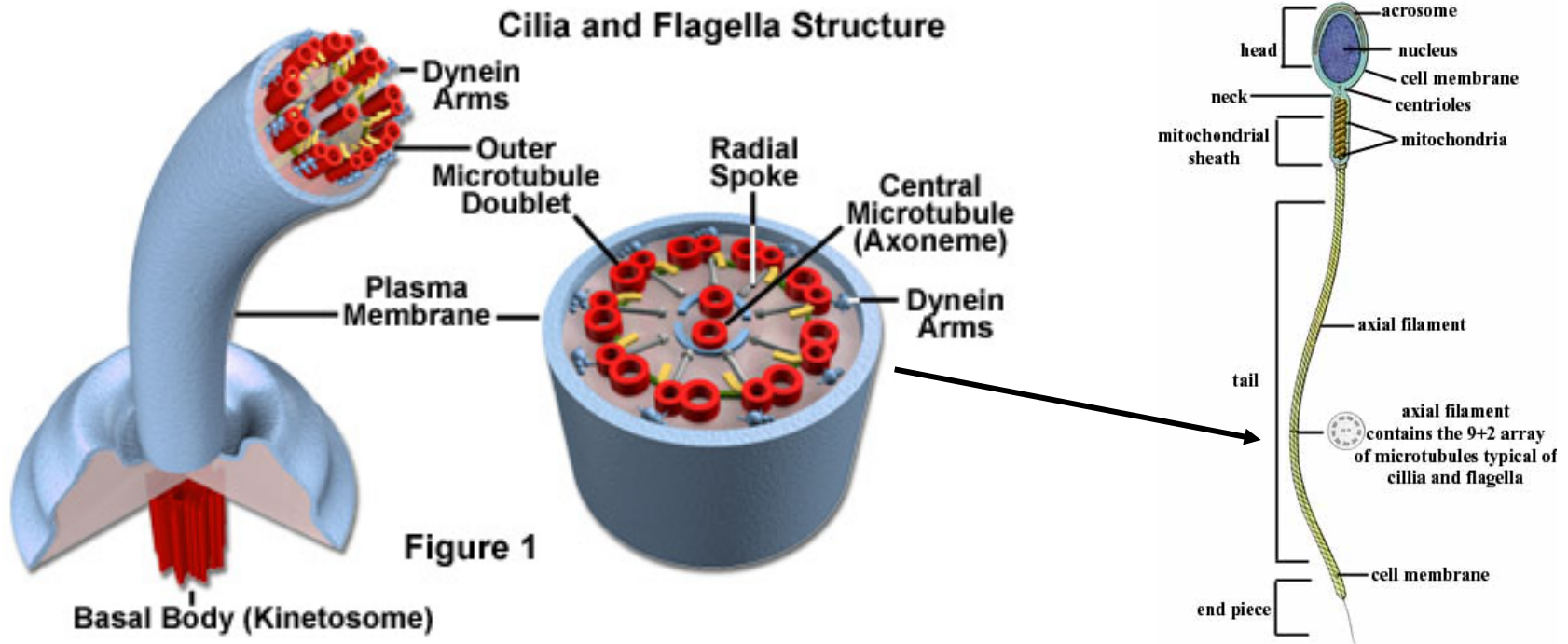


Migetalke (cilia) in bički (flagella)



- Migetalke in bički so “priveski/podaljški” celic, obdani z membrani (nadaljevanje plazmaleme)
- Gibljejo se utripajoče, vrtinčasto
- Migetalke se nahajajo na mnogih epiteljskih celicah: v respiratornem traktu/sapniku, v nosnih sinusih ...
- Edini bički v človeškem telesu – celice spermijev (prokarionti/bakterije se gibljejo večinoma z bički)
- So stabilne strukture, sestavljene iz nespremenljivega števila podenot

Prerez evkariontske migetalke ali bička (9+2)



- Dinein vsebuje v “glavi” ATPazno aktivnost (analogija z miozinom v mišičnih celicah)
- Hidroliza ATP povzroči asociacijo dineina z vlaknom B mikrotubula
- Dineinska ročica koraka po sosednjem dubletu mikrotubula (analogija s premikanjem miozinske glave po fibrilarnem aktinu)

Pregled kontraktilnih proteinov pri evkariontih

izvor in funkcija

strukturno ogrodje

motorični protein

Mišica (progasta, gladka) mišično delo	aktin - polimer globularnih aktinov	miozin (mišični)
Mikrofilamenti citoskeleta gibanje organelov, oblika celice, gibanje citoplazme	aktin - polimer globularnih aktinov	miozin (nemišični)
Mikrotubuli citoskeleta gibanje organelov	mikrotubuli	kinezin
Mikrotubuli (migetalke, bički) gibanje celic	mikrotubuli (razporeditev 9+2)	dinein

Skupne lastnosti:

- spadajo v družino proteinov s P zanko in NTP-azno domeno
- Imajo sposobnost spremembe konformacije zaradi vezave ali hidrolize NTP, kar je ključno za funkcijo molekularnih motorjev