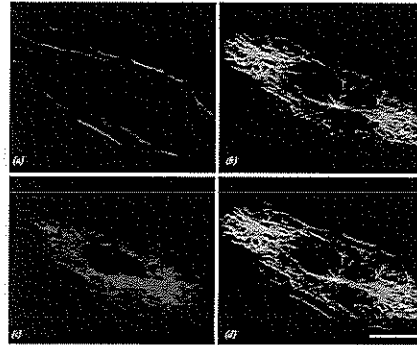


# The Cytoskeleton

- cytoskeleton คือโครงร่างของเซลล์ที่พบใน cytoplasm กล่าวได้ว่าเป็น skeletal system ของเซลล์
- cytoskeleton ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นเส้น 3 ชนิด
  - microtubules
  - microfilaments
  - intermediate filaments
- cytoskeletal filament แต่ละชนิดคือ polymer ของ protein subunits



(a) microfilament  
(b) microtubules  
(c) intermediate filaments

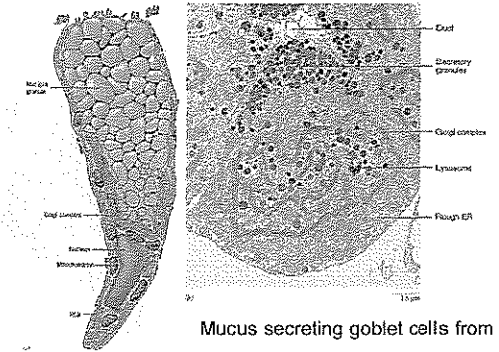
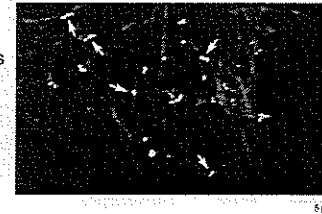
## Properties of microtubules, intermediate filaments and actin filaments

	Microtubules	Intermediate filaments	Microfilaments
subunits ใน polymer	GTP- $\alpha$ - $\beta$ -tubulin	various globular proteins	ATP-actin
sites of incorporation	+ end ( $\beta$ tubulin)	internal	+ end (barbed)
polarity	yes	no	yes
enzymatic activity	GTPase	none	ATPase
motor proteins	kinesins, dyneins	none	myosin
associated proteins	MAPs	plakins	actin-binding proteins
dimension	25 nm outer diam.	10 nm diam.	8 nm diam.
distribution	all eukaryotes	animals	all eukaryotes
primary functions	support, intracellular transport, cell organization	structural support	mobility, contractility

# หน้าที่หลักของ cytoskeleton

- ค้ำจุน มีส่วนในการกำหนดรูปร่างของเซลล์ ด้านแรงที่จะกระทำให้เซลล์เสียรูป
- กำหนดตำแหน่งของ organelles ในเซลล์
- เป็นเส้นทางสำหรับการขนส่งสารและ organelles ภายในเซลล์

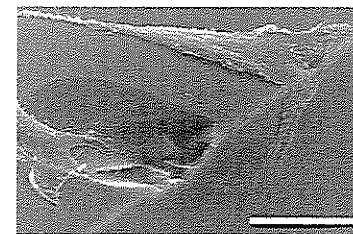
peroxisome ติดอยู่กับ microtubules ซึ่งทำหน้าที่เป็น track สำหรับการขนส่ง peroxisome ใน mammalian cell



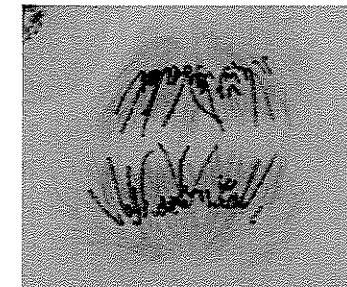
Mucus secreting goblet cells from the rat colon

# หน้าที่หลักของ cytoskeleton

- เป็นเครื่องมือในการสร้างแรงที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์
- เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในกระบวนการแบ่งเซลล์ ช่วยดึงแยกโครโมโซมออกจากกัน



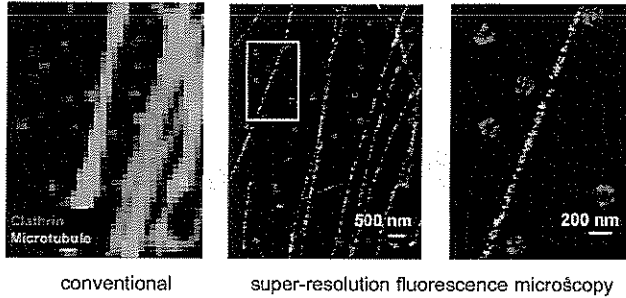
fibroblast เคลื่อนที่ตามขอบ coverslip



## การศึกษา cytoskeleton

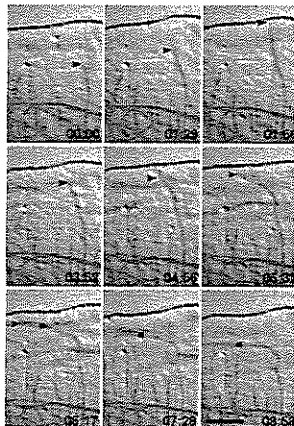
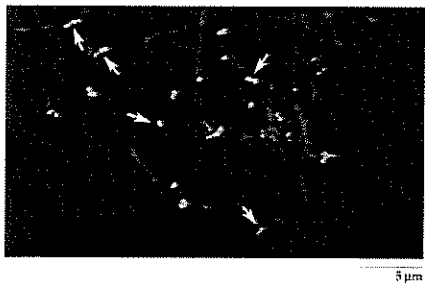
- Electron microscope ทำให้ได้ static images แต่ไม่ให้คำตอบเกี่ยวกับ dynamic structure และ function
- Live-cell imaging คือแนวทางการศึกษาเซลล์โดยติดตามกระบวนการที่เกิดขึ้นในเซลล์มีชีวิต - fluorescence microscope

- สังเคราะห์โปรตีนที่ติดสารเรืองแสง (fluorescently labeled) ในเซลล์เป็น fusion protein
- label protein subunit ด้วยสารเรืองแสงแล้วนำเข้าเซลล์



## การศึกษา cytoskeleton

- peroxisome มี peroxisomal protein ที่ fused กับ fluorescent protein
- microtubules ถูกย้อมด้วย fluorescently labeled antibody

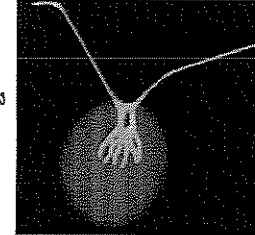


ฉีด fluorescently labeled tubulin เข้าเซลล์ ทำให้ติดตามการเปลี่ยนแปลงความยาวของ microtubule ได้ ในขณะที่ tubulin ถูกนำเข้ามาต่อเป็น polymer

## การศึกษา cytoskeleton

- fluorescence microscopy สามารถใช้ในการระบุตำแหน่งของโมเลกุลที่สนใจ โดยใช้ fluorescently labeled antibody ให้จับกับโปรตีนที่สนใจศึกษา

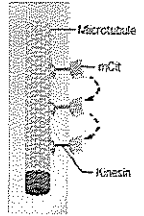
เซลล์สาหร่ายที่ถูกจับด้วยโปรตีน centrin ซึ่งถูก labeled ด้วยสาร fluorescent



ใช้ laser based fluorescence microscopy – TIRF (total internal reflection microscopy)

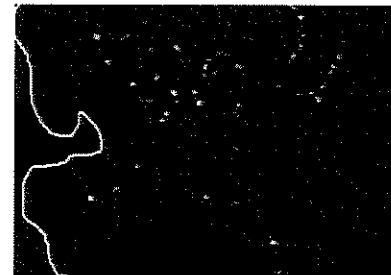


- นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาติดตาม single molecule ทั้ง *in vitro* และใน living cell ได้ เช่น การศึกษา motor protein kinesin โดยการตัดต่อยีนเข้ากับ GFP ที่ชื่อ mCit จากนั้น fusion gene ถูกนำเข้าเซลล์ ทำให้เซลล์สร้าง kinesin ที่เรืองแสงได้ เมื่อนำ motor protein ที่เรืองแสงสีเขียวมารวมกับ microtubule ที่ย้อมสีแดง นักวิจัยได้สังเกตเห็นว่า kinesin เคลื่อนที่ตาม microtubule



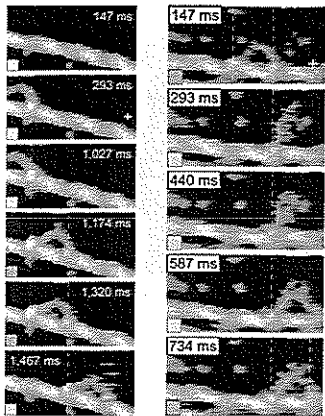
## การศึกษา cytoskeleton

- นักวิทยาศาสตร์สามารถใช้เทคนิคทำนองเดียวกันนี้ในการติดตาม kinesin ภายใน living cell ได้เช่นกัน

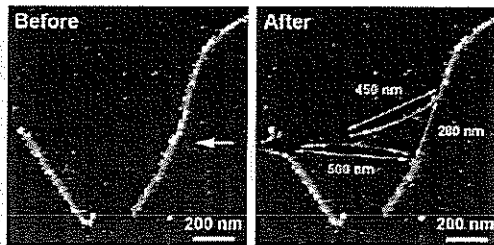


- Light microscopic fluorescence techniques ทำให้ติดตาม single molecule ได้ แต่ไม่ทำให้เห็นรายละเอียดของโมเลกุลได้
- EM และ crystallography ใช้ศึกษาโครงสร้างเป็นให้ข้อมูลเหมือน snapshot
- AFM (atomic force microscope) ให้ high resolution เหมือน EM แต่สามารถใช้ศึกษากระบวนการที่เกิดขึ้นแบบ real time ได้ - ปลาย tip ขนาด nanosized จะ probe ไปบนผิว molecule

## การศึกษา cytoskeleton



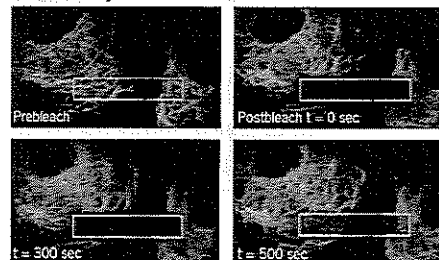
ภาพจาก high speed AFM ในการติดตามการเคลื่อนที่ของ myosin โมเลกุลเดียว



การใช้ AFM ในการศึกษา mechanical properties ของ cytoskeleton โดยการใช้ AFM tip ดึงส่วนหนึ่งของ intermediate filament เพื่อศึกษาว่ายืดได้มากเพียงใด การศึกษาทำให้ทราบว่า intermediate filament มีความสามารถในการยืดได้ (extensibility) สูงกว่า microfilament และ microtubule

## การศึกษา cytoskeleton

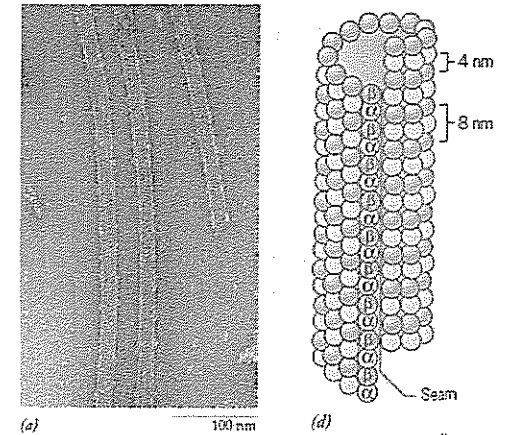
- microtubules และ actin filaments เป็น polymer system ที่ dynamic มากภายในเซลล์
- dynamic = ever-changing การศึกษา dynamic ใช้เทคนิค FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)
- ฉีดเซลล์ด้วย fluorescently labeled tubulin หรือทำเซลล์ให้สร้าง GFP-tubulin ศึกษาเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่ติดลำเลเซอร์ซึ่งสามารถโฟกัสในพื้นที่เล็กๆ ได้
- เลเซอร์จะทำให้ fluorescence หายไป การเกิดสัญญาณ fluorescence ขึ้นมาใหม่เป็นการแสดง dynamic ของ cytoskeleton



เซลล์ในระยะ interphase แสดง microtubule recovery

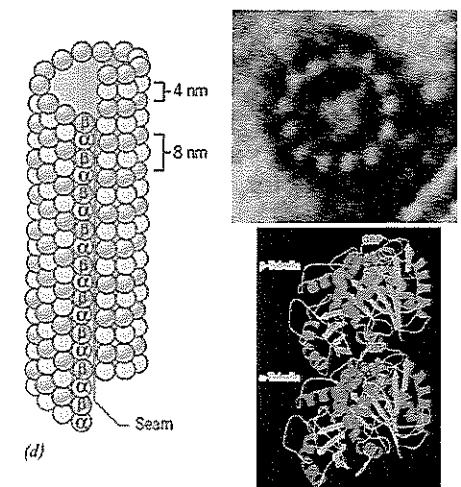
## Microtubules: structure and composition

- microtubules เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นหลอด พบใน eukaryotic cell เกือบทุกชนิด
- พบเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างหลายชนิด เช่น mitotic spindle ในเซลล์ที่กำลังแบ่งนิวเคลียส และเป็นแกนกลางใน cilia และ flagella
- มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 nm ผนังท่มีความหนา 4 nm
- ผนังท่อประกอบด้วย globular protein เรียงกันเป็นแถวตามยาว เรียกว่า protofilament



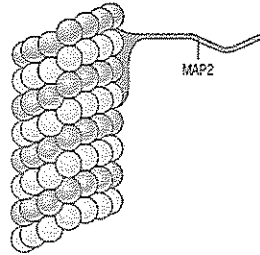
## Microtubules: structure and composition

- แต่ละ microtubule มี 13 protofilament โครงสร้างของ microtubule คงอยู่ได้เพราะ noncovalent interaction ระหว่างแต่ละ protofilament
- แต่ละ protofilament ประกอบด้วย dimeric building block ของ  $\alpha$ -tubulin และ  $\beta$ -tubulin อย่างละ 1 subunit (เป็น heterodimer)
- protofilament มีทิศทาง ทุกสายใน microtubule มีทิศเดียวกัน
- polarity ของ microtubule: ปลายด้านหนึ่งเป็น  $\beta$ -tubulin = plus end ปลายอีกด้านหนึ่งเป็น  $\alpha$ -tubulin = minus end
- $\alpha$ -tubulin และ  $\beta$ -tubulin globular protein มีโครงสร้างคล้ายกัน



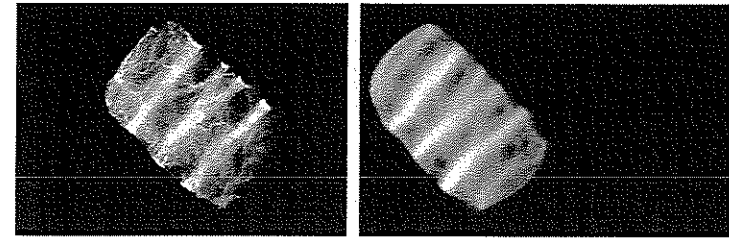
## Microtubule-associated proteins: MAPs

- MAPs คือโปรตีนที่พบติดอยู่กับ microtubules
- MAPs ที่ถูกศึกษาพบเป็นกลุ่มแรก = classical MAPs มักประกอบด้วย 1 domain ติดอยู่ข้าง microtubule และโปรตีนอื่น
- MAPs บางชนิดพบว่ามึบทบาทในการจับและเรียงตัวของ microtubule
- phosphorylation และ dephosphorylation บนกรดอะมิโนบางตัวของ MAPs เกี่ยวข้องกับความสามารถในการจับกับ microtubules
- ในผู้ป่วย Alzheimer's disease ว่า MAP ชื่อ tau ถูก phosphorylate มากเกินไป ไม่สามารถจับกับ microtubule ได้



brain MAPs มี 3 tubulin binding site และ tail ที่ interact กับ cell component อื่น

## microtubule ทำหน้าที่ค้ำจุนและจัดระเบียบเซลล์

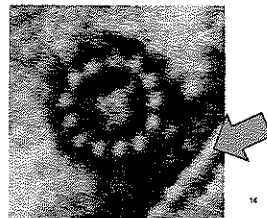
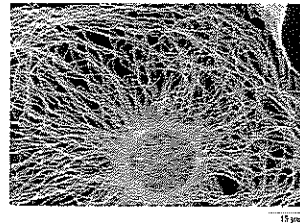


(a) ย้อม microtubule (b) ย้อม cell wall cellulose 20 μm

cell wall cellulose ถูกสร้างขึ้นในแนวขนานกันกับ cortical microtubule และทั้ง cellulose microfibril และ microtubules นี้มักพบในแนวตั้งฉากกับแกนด้านยาวของเซลล์ จึงมีส่วนร่วมในการทำให้เซลล์ยาวออกเนื่องจากผลของแรงดันเต่งในเซลล์ และแรงต้านการขยายข้างจากโครงสร้างนี้

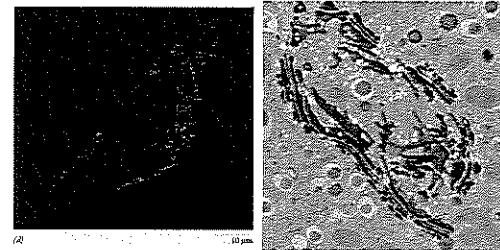
## microtubule ทำหน้าที่ค้ำจุนและจัดระเบียบเซลล์

- เซลล์หนูรูปร่างแบน มี microtubule แผ่เป็นรัศมีออกมาจากบริเวณรอบนิวเคลียส
- columnar epithelial cell มี microtubule เรียงตามแนวความสูงของเซลล์ ช่วยค้ำจุนรูปร่างสูงยาวของเซลล์
- ในเซลล์พืช microtubule มีบทบาทในการกำหนดรูปร่างผ่านการมีผลกระทบต่อกรสร้าง cell wall ในระยะ interphase พบว่า microtubule จะอยู่ใต้ cell membrane (forming cortical zone) คาดว่ามีบทบาทในการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ cellulose



## microtubule ทำหน้าที่ค้ำจุนและจัดระเบียบเซลล์

- เซลล์ที่ถูก treat ด้วย microtubule disrupting drug มีตำแหน่งของ membranous organelles, ER และ Golgi complex ผิดปกติไป
- nocodazole, colchicine ทำให้เกิดการสลาย microtubule



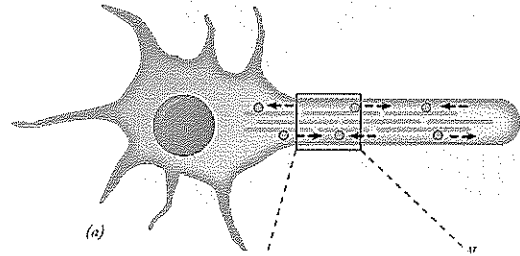
ตำแหน่งปกติของ Golgi complex จะเป็นบริเวณกลางเซลล์

## บทบาทของ microtubule ในการขนส่งภายในเซลล์

- การยับยั้ง cytoskeletal element ในเซลล์ทำให้การขนส่งในเซลล์หยุดลง
- ศึกษา intracellular mobility ใน nerve cell เป็นตัวอย่าง – axonal transport
- axon ของ motor neuron ยาวมาก ยื่นออกจาก spinal chord ไปยังอวัยวะส่วนปลาย สารที่ cell body ของ neuron สร้างได้ อาจส่งไปโดยมี membrane หุ้มหรือไม่ก็ได้
- โครงสร้างหรือสารที่เคลื่อนจาก cell body

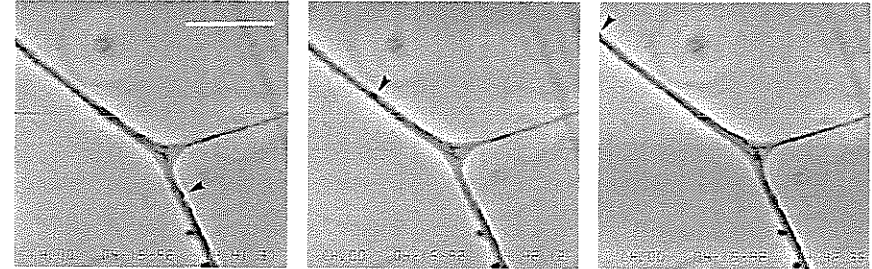
ไปปลาย axon เรียกว่าเคลื่อนไปใน anterograde direction

- การเคลื่อนที่จาก synapse ไป cell body เรียกว่าการเคลื่อนที่ในทิศ retrograde direction



## บทบาทของ microtubule ในการขนส่งภายในเซลล์

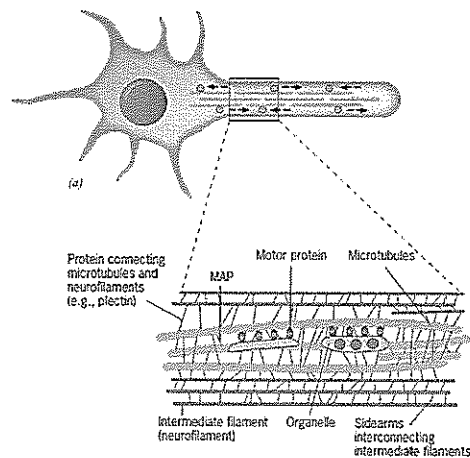
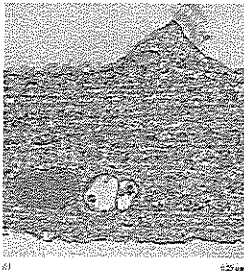
- microtubule ทำหน้าที่เป็นเหมือน track ให้ motor protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างแรงในการเคลื่อนย้ายโครงสร้างหรือสารไปในเซลล์



- Autophagic vacuole เคลื่อนที่ใน retrograde direction ไปตาม microtubule

## บทบาทของ microtubule ในการขนส่งภายในเซลล์

- ส่วน axon เต็มไปด้วย cytoskeletal structures: มัดของ microfilaments, intermediate filaments และ microtubules
- microtubule ทำหน้าที่เป็นเหมือน track ในการขนส่งภายในเซลล์

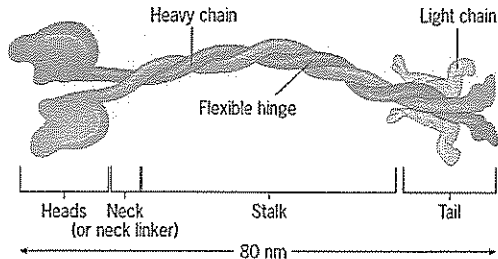


## motor proteins ที่ microtubules

- Motor protein ของเซลล์เปลี่ยน chemical energy (ใน ATP) เป็น mechanical energy ทำให้เกิดแรงที่ใช้ในการเคลื่อนไหวหรือเคลื่อนย้าย
- สิ่งที่ถูกขนส่งหรือเคลื่อนย้ายโดยอาศัย motor protein เช่น ribonucleoprotein particles, vesicles, mitochondria, lysosomes, chromosomes และ cytoskeletal filaments อื่น
- Motor protein superfamilies: kinesins, dyneins และ myosins
- kinesins และ dyneins เคลื่อนไปบน microtubules
- myosin เคลื่อนไปบน microfilaments
- ไม่พบ motor protein ที่ใช้ intermediate filament tracks
- Mechanical cycle is coupled with chemical cycle.

## Motor protein: kinesins

- Kinesins ถูกพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 โดย Ronald Vale และคณะ จากการศึกษา axon ในหมึก = kinesin-1
- Superfamily ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ kinesin เรียกว่า kinesin related proteins (KRPs) superfamily ประกอบด้วย kinesin-1 ถึง kinesin-14 family

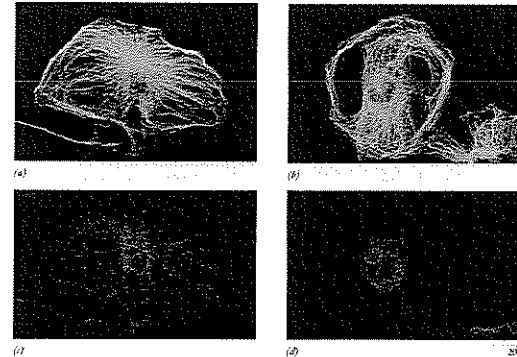


Kinesin-1 molecule เป็น 4 tetramer ประกอบด้วย 2 identical heavy chain และ 2 identical light chain ส่วนหัวทำหน้าที่จับ Microtubule และ hydrolyze ATP (จึงเรียก motor domain) ส่วน tail จับกับสิ่งที่เคลื่อนย้าย

21

## Motor protein: kinesins

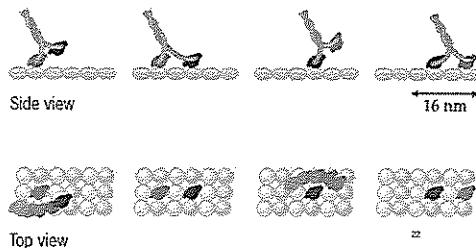
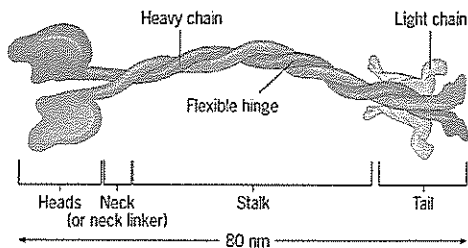
- เซลล์ส่วนใหญ่มี microtubule เรียงตัวในลักษณะที่ plus end ชี้ออกจากกลางเซลล์ ทำให้ kinesin superfamily ทำการขนส่งไปยังทิศทางเข้าหา plasma membrane



เขียว - microtubules, แดง - mitochondria  
(a) และ (c) ปกติ  
(b) และ (d) ขาด kinesin KIF5B (เป็น kinesin-1 family member) มี mitochondria กระจุกอยู่กลางเซลล์

## Motor protein: kinesins

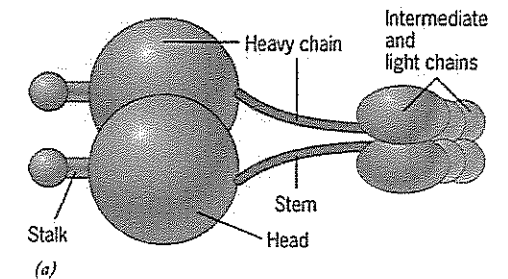
- Kinesins เป็น plus end-directed microtubular motor
- เคลื่อนที่ไปใน hand-over-hand mechanism เหมือนคนไต่เชือกโดยไม่ตก
- KRPs ส่วนใหญ่เคลื่อนไป plus end แต่ small family kinesin-14 เคลื่อนไป minus end
- Kinesin-13 ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ บางครั้งเรียกโปรตีนกลุ่มนี้ว่า microtubule depolymerase



22

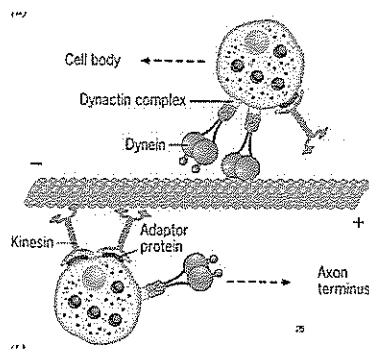
## Motor protein: dynein

- dynein เป็นโปรตีนที่จับกับ microtubule ที่ถูกค้นพบเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1963 ในฐานะโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของ cilia และ flagella
- 20 ต่อมา สกัดได้ dynein จากเซลล์สมอง - cytoplasmic dynein
- cytoplasmic dynein มี 2 ชนิด
- เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ ประกอบด้วย 2 identical heavy chain และ variety ของ intermediate และ light chain ส่วน globular head ขนาดใหญ่กว่า kinesin เป็นส่วนสร้างแรงในการเคลื่อนที่มี stalk ซึ่งส่วนปลายทำหน้าที่จับ microtubule



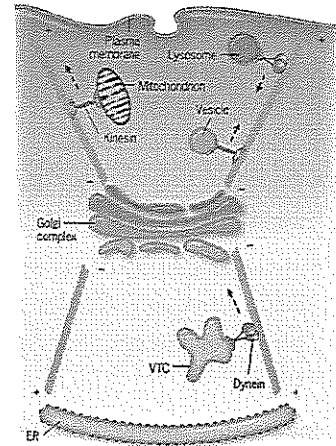
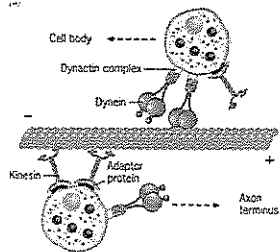
## Motor protein: dynein

- dynein เคลื่อนที่ไปในทิศทางเข้าหา minus end ของ microtubule
- พบในสัตว์แต่ไม่พบในพืชซึ่งพบว่ามี minus end-directed kinesin (kinesin-14)
- บทบาทของ cytoplasmic dynein
  1. เป็นโมเลกุลสร้างแรงที่ใช้ในการกำหนดตำแหน่งของเส้นใย spindle และเคลื่อนย้าย chromosome ในการแบ่งนิวเคลียส
  2. เป็น minus end-directed microtubular motor กำหนดตำแหน่งของ centrosome และ Golgi complex และเคลื่อนย้าย organelle, vesicles และ particles ต่างๆ



## Motor protein: dynein

- ใน neural cell พบว่า cytoplasmic dynein เกี่ยวข้องกับการ retrograde movement ของ membranous organelle และ anterograde movement ของ microtubules
- ใน fibroblast และ nonneural cell พบว่าเกี่ยวข้องกับการขนส่ง membranous organelles จากบริเวณขอบเซลล์มายังกลางเซลล์
- Multisubunit protein dynein เป็นโปรตีนที่พบระหว่าง dynein กับสิ่งที่ dynein ขนส่งอยู่



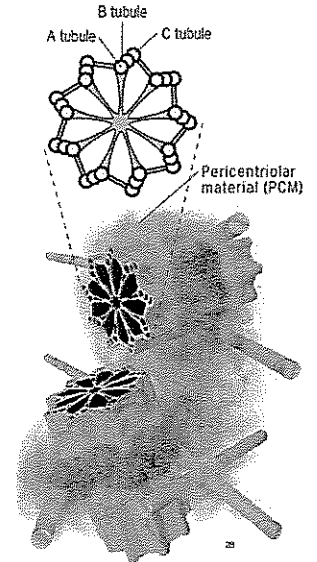
kinesin mediated and dynein mediated transport of vesicles and organelles in a nonpolarised cultured cell <sup>25</sup>

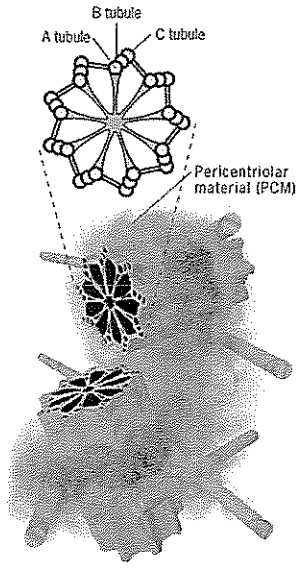
## Microtubule organizing centers (MTOCs)

- Microtubule assembly จาก  $\alpha\beta$ -tubulin dimers ประกอบด้วย 2 ชั้นตอนใหญ่ๆ
  1. nucleation เกิดการสร้าง microtubule ขึ้นส่วนหนึ่ง
  2. elongation การสร้าง microtubule ต่ออย่างรวดเร็ว
- nucleation ในเซลล์เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว โดยสัมพันธ์กับโครงสร้างที่เรียก microtubule organizing center โดย MTOC ที่ถูกศึกษาแล้วอย่างดีที่สุดได้แก่ centrosome
- ในเซลล์สัตว์ nucleation ของ microtubule เกิดขึ้นที่ centrosome
- centrosome ประกอบด้วย centriole 2 อัน ล้อมรอบด้วยสารที่มีรูปร่างไม่แน่นอนซึ่งเติมไปด้วย electron เรียกว่า pericentriolar material (หรือ PCM)

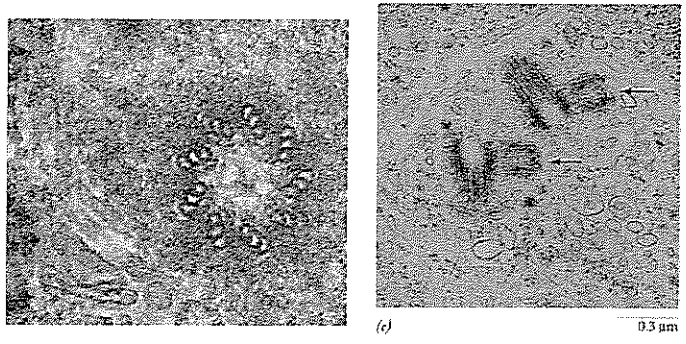
## Microtubule organizing centers (MTOCs)

- centrosome ประกอบด้วย centriole 2 อัน ล้อมรอบด้วยสารที่มีรูปร่างไม่แน่นอนซึ่งเติมไปด้วย electron เรียกว่า pericentriolar material (หรือ PCM)
- centriole มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2  $\mu\text{m}$  และยาว 4  $\mu\text{m}$  ประกอบด้วย 3 fibril ซึ่งแต่ละ fibril นี้มี 3 microtubule: A, B และ C tubules โดย A tubule เท่านั้นที่เป็น microtubule ที่สมบูรณ์ มีแกน radial spoke ยึด tubule เหล่านี้ไว้ด้วยกัน
- มักพบ centriole เป็นคู่เสมอ

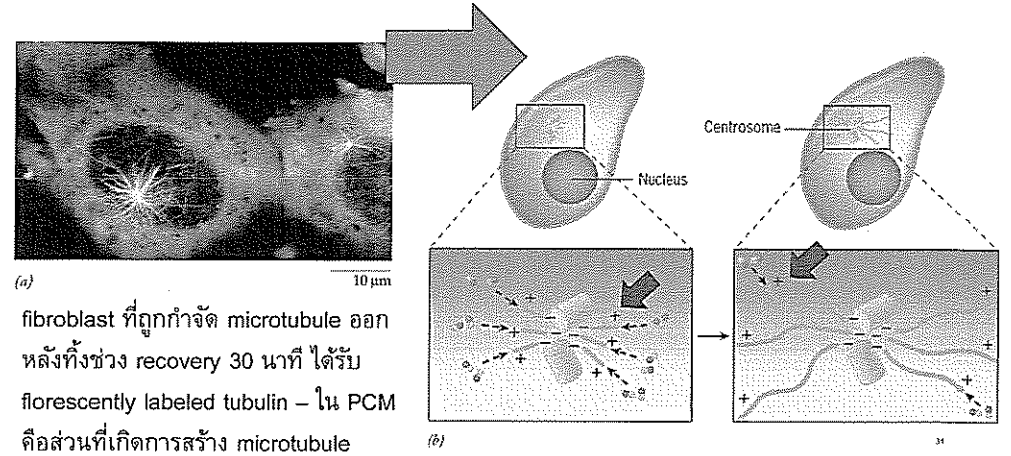




### Microtubule organizing centers (MTOCs)



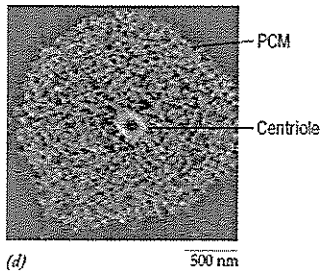
### Microtubule nucleation at the centrosome



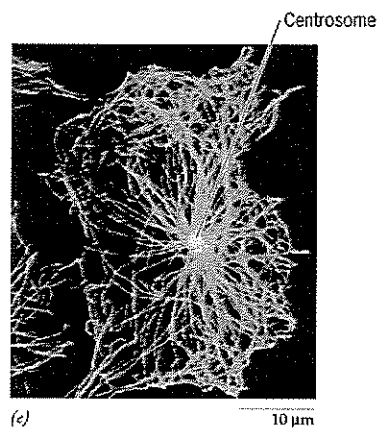
(a) fibroblast ที่ถูกกำจัด microtubule ออก หลังทั้งช่วง recovery 30 นาที ได้รับ florescently labeled tubulin - ใน PCM คือส่วนที่เกิดการสร้าง microtubule

### Microtubule organizing centers (MTOCs)

กำจัดโปรตีนออกจาก PCM พบว่ามีเส้นใยที่เป็น scaffold ที่ไม่ละลายน้ำเหลืออยู่

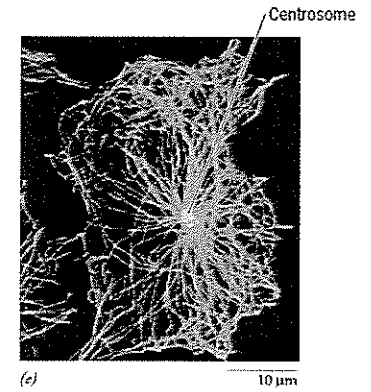


centrosome ในเซลล์สัตว์เป็นทั้งจุดกำเนิดของ microtubule และเป็นศูนย์กลางของ tubular network ของเซลล์



### Microtubule nucleation at the centrosome

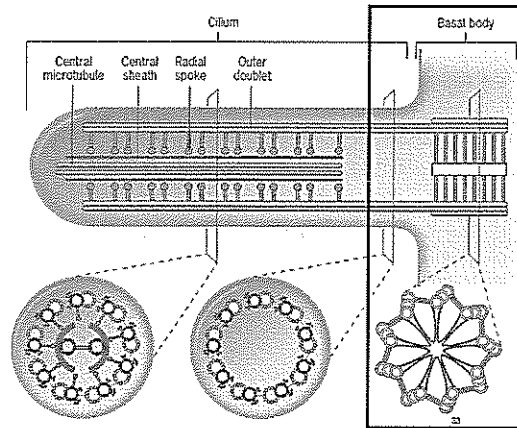
- ตำแหน่งของ centrosome ในเซลล์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน
- microtubule ใน nerve cell ส่วน axon พบว่าไม่มีส่วนที่ติดกับ centrosome ซึ่งอยู่ใน cell body - สร้างขึ้นที่ centrosome แต่หลุดออกแล้วถูกส่งไป axon โดย motor protein
- animal cell บางชนิด เช่น mouse oocyte ไม่มี centrosome เลย แต่ยังสามารถสร้าง meiotic spindle ได้





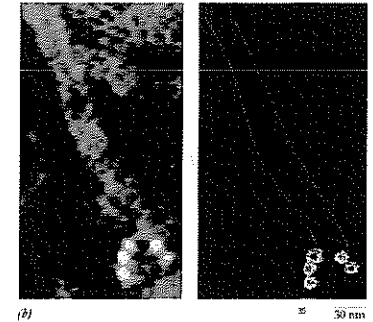
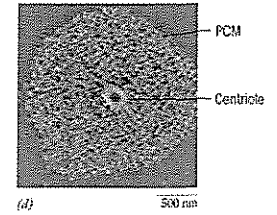
## MTOCs ชนิดอื่น

- Basal body พบที่ฐานของ cilia และ flagellum ทำหน้าที่สร้าง microtubule มีโครงสร้างเหมือน centriole
- เซลล์พืชไม่มีทั้ง centrosome และ centriole หรือ MTOC ที่ชัดเจนอื่นใด แต่สามารถสร้าง microtubule ได้



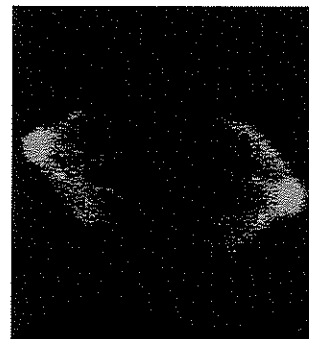
## Microtubule nucleation

- ในการทำความเข้าใจ microtubule nucleation ส่วน PCM ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ
- Insoluble fiber ที่ PCM คาดว่าเป็นที่เกาะจับของโครงสร้างรูปวงแหวนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ microtubule (25 nm) และมี  $\gamma$ -tubulin
- Gold-labeled antibodies ที่จำเพาะกับ  $\gamma$ -tubulin ทำให้พบโครงสร้างรูปวงแหวนนี้ บริเวณเกือบปลาย minus end ของ microtubule ที่ฝังอยู่ใน PCM ของ centrosome ซึ่งเกิด nucleation ขึ้น



## Microtubule nucleation

- บทบาทของ MTOC ที่มีต่อ microtubule:
  - ควบคุมจำนวน
  - กำหนด polarity
  - กำหนดจำนวน protofilament
  - เวลาและตำแหน่งในการสังเคราะห์
- $\gamma$ -tubulin พบ 0.005% ของ total protein ของเซลล์ ปรากฏอยู่ใน MTOC ทุกชนิด รวมทั้งใน PM -  $\gamma$ -tubulin อาจเกี่ยวกับ microtubule nucleation

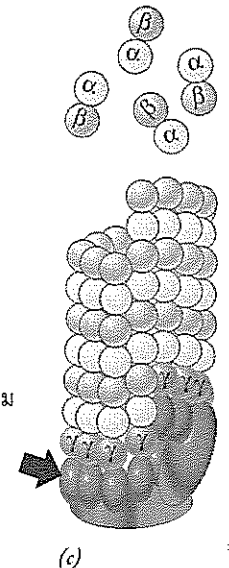


แดง =  $\gamma$ -tubulin  
เขียว =  $\beta$ -tubulin

## Microtubule nucleation

- วงของ  $\gamma$ -tubulin ทำหน้าที่เป็น template สำหรับให้  $\alpha\beta$ -tubulin dimers มาเรียงต่อยาวออกไป
- มีแค่  $\alpha$ -tubulin ที่จับ  $\gamma$ -tubulin ได้ ดังนั้น  $\gamma$ -tuRC จึงกำหนด polarity ของ microtubule และเป็นส่วน cap ของ minus end

nontubulin protein รวมกับ  $\gamma$ -tubulin เป็น  $\gamma$ -tubulin ring complex ( $\gamma$ -tuRC)

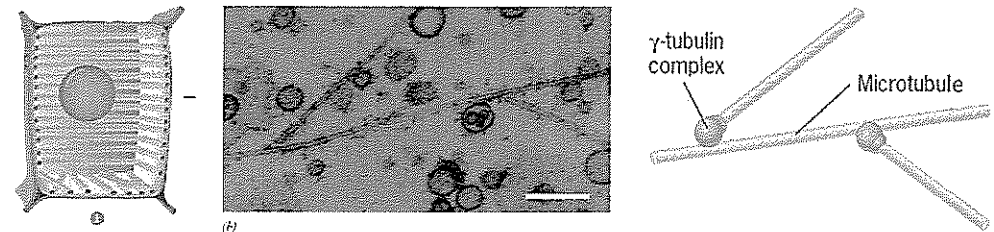


## The dynamic properties of microtubules

- microtubules ต่างๆ มีรูปร่างคล้ายกัน แต่มีเสถียรภาพ (stability) ต่างกัน
- MAPs และ posttranslational modification ที่เกิดกับ tubulin subunits มีผลต่อเสถียรภาพของ microtubule
- microtubule ต่างๆ เกิดการสลาย (disassembly) ได้ยากง่ายต่างกัน เช่น เมื่อเรียงตามความอ่อนไหวต่อการสลายตัว mitotic spindle > microtubule ใน neuron > microtubule ใน centriole, cilia และ flagella
- disassembly ถูกชักนำให้เกิดขึ้นได้ด้วย อุณหภูมิต่ำ, pressure, สารเคมีบางชนิด
- protein building blocks จับกันโดยอาศัย noncovalent association ทำให้ polymerization และ depolymerization เกิดขึ้นได้ตลอดเวลา

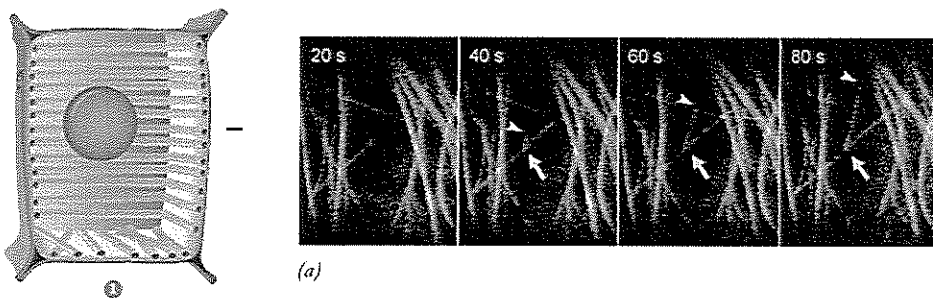
## The dynamic properties of microtubules

- interphase พบ microtubule บริเวณ cortex ของเซลล์ พบ  $\gamma$ -tubulin ตามแนวของ cortical microtubule
- microtubule ใหม่อาจเกิดขึ้นจาก microtubule ที่มีอยู่เดิม
- daughter microtubules ที่สร้างขึ้นจะหลุดออกแล้วไปรวมเข้าในมัด microtubule ที่ขนานกันอยู่ในบริเวณ cortex รอบขอบเซลล์



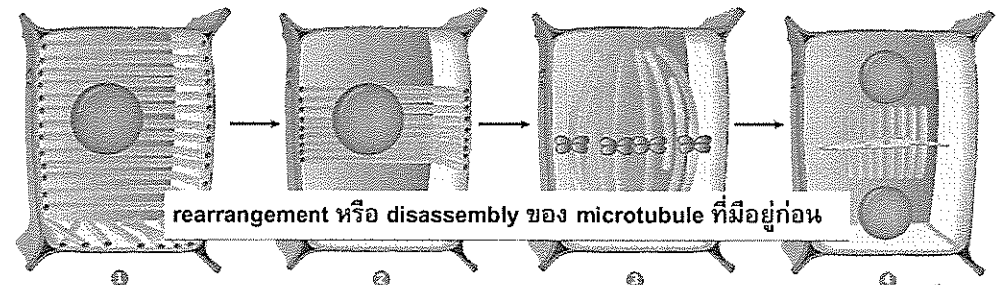
## The dynamic properties of microtubules

- interphase พบ microtubule บริเวณ cortex ของเซลล์ พบ  $\gamma$ -tubulin ตามแนวของ cortical microtubule
- Microtubule ใหม่อาจเกิดขึ้นจาก microtubule ที่มีอยู่เดิม



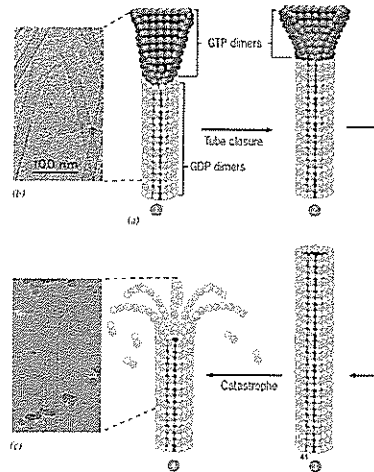
## The dynamic properties of microtubules

- เมื่อเซลล์จะแบ่ง microtubule สลายไป เหลือแต่ preprophase band เหมือนเข็มขัดของเซลล์
- preprophase band กำหนดแนวแบ่งของเซลล์
- preprophase band สลายไปเมื่อเซลล์แบ่ง เกิด spindle fiber ขึ้นแทน
- หลังการแยกโครโมโซม spindle fiber สลาย เกิดมัดของ microtubule ที่เรียกว่า phragmoplast ขึ้นแทน



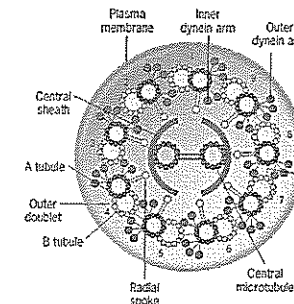
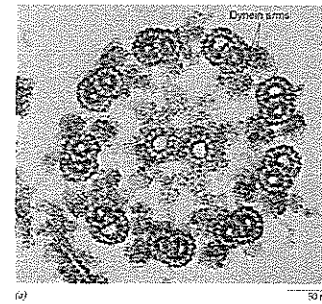
## The dynamic properties of microtubules

- $\beta$ -tubulin มีคุณสมบัติเป็น GTPase ที่ hydrolyse GTP ได้
- GTP hydrolysis เกิดขึ้นหลังจาก tubulin heterodimer เข้าต่อเป็น microtubule แล้ว และ GDP ที่เหลือ จะถูกเปลี่ยนเป็น GTP ใน dimer ที่ถูกปล่อยเป็นอิสระ
- Microtubule ที่ยืดยาวอย่างรวดเร็ว การเติม tubulin เข้าในสายเกิดขึ้นเร็วกว่า GTP hydrolysis
- เมื่อเกิด GTP hydrolysis จะเกิดการสลายตัวของ microtubule
- หากไม่มี stabilizing factors เช่น MAPs จะเกิด disassembly ของ microtubule ขึ้นอย่างรวดเร็วหลังการสร้าง microtubule ขึ้น



## cilia and flagella: structure and function

- ส่วน cilia หรือ flagella มี membrane หุ้ม แกนของ cilia เรียก axoneme มี microtubule ตลอดความยาว เป็น 9+2 microtubular structure (พบตั้งแต่ protist ถึง mammal) มี plus end ที่ปลาย และ minus end ที่ฐาน
- microtubule ที่วงนอกมี A และ B tubule โดย B tubule มี 10-11 protofilaments

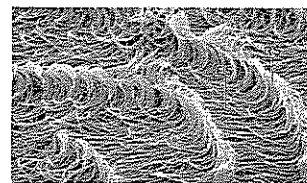
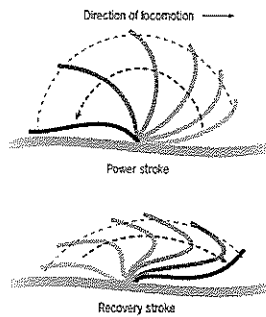
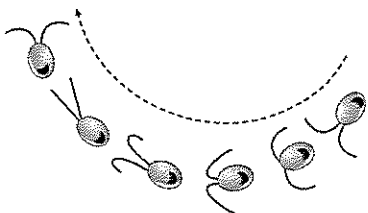
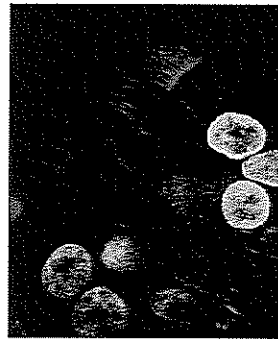
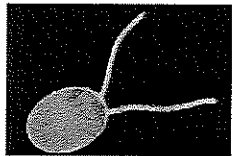


central microtubule หุ้มด้วย central sheath ซึ่งเชื่อมกับ microtubule รอบนอกด้วย radial spoke แต่ละคู่ของ microtubule รอบนอกยึดกันด้วย nexin

4

## cilia and flagella: structure and function

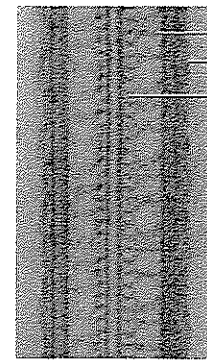
- cilia และ flagella มีโครงสร้างเหมือนกัน (prokaryotic flagella ไม่ได้มีวิวัฒนาการร่วมกันเท่ากับ eukaryotic flagella)



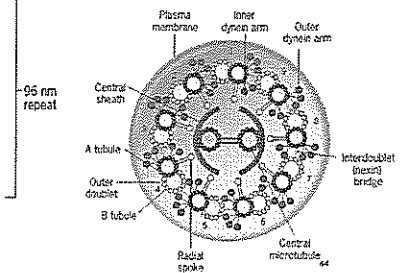
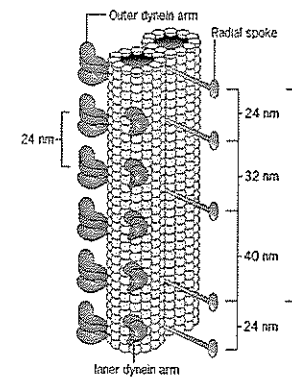
(a) 10  $\mu$ m

## cilia and flagella: structure and function

- outer และ inner arms, radial spoke ติดอยู่กับ A tubule



(a) 60 nm

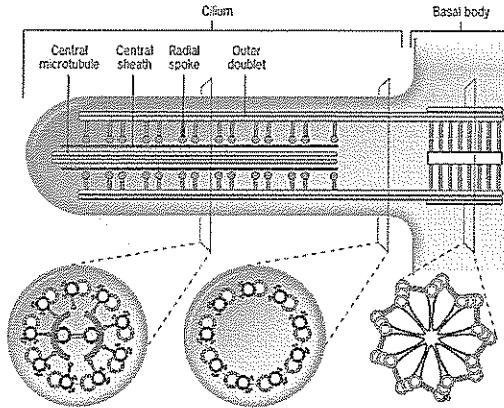
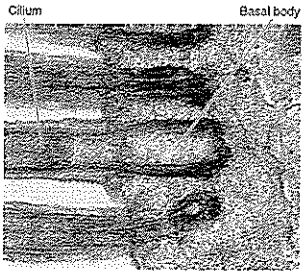


44

## cilia and flagella: structure and function

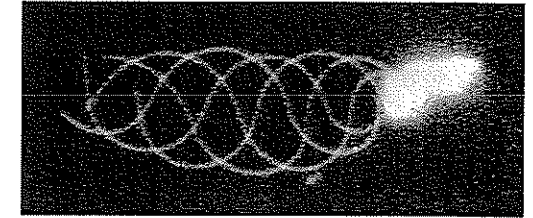
- Cilium และ flagellum เกิดจากส่วน basal body
- การสร้างสาย microtubule ที่ด้านปลาย plus end เกิดขึ้นได้อย่างไร

cilia บน epithelial cell จากท่อน้ำไขของกระดูก



## dynein arms และเคลื่อนไหวของ cilia และ flagella

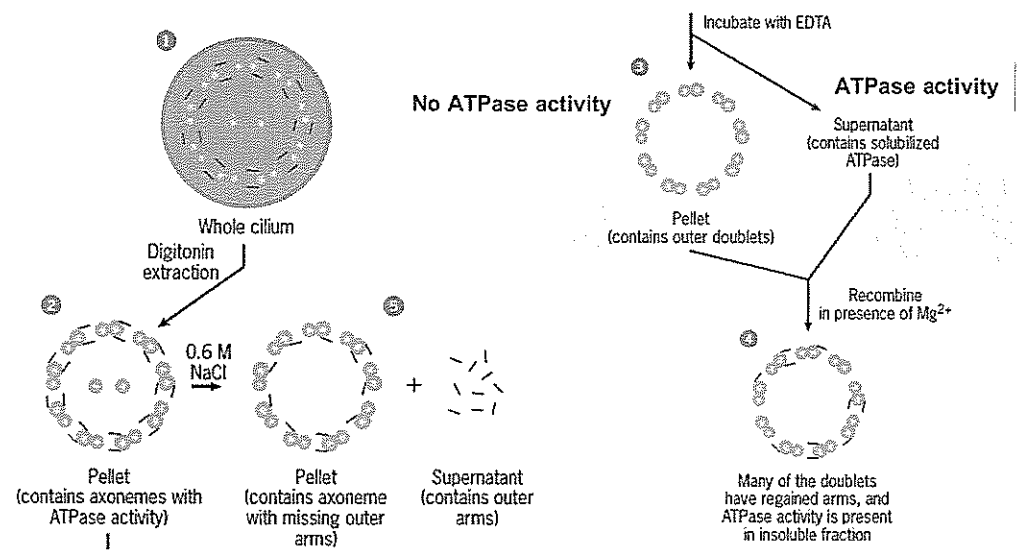
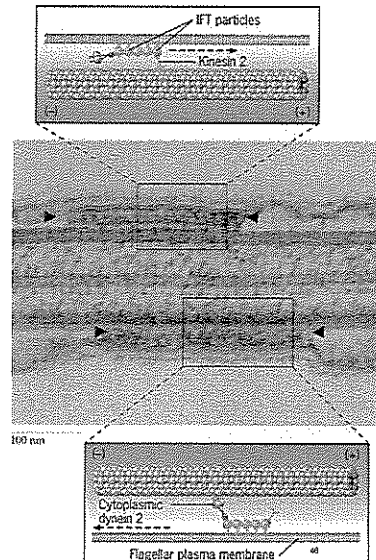
- sperm ที่ไม่มี plasma membrane ยังคงสละทิศทางได้เมื่อมี ATP อยู่ในสารละลาย แสดงว่าส่วน axoneme คือส่วนที่มีบทบาทในการเคลื่อนไหวนี้
- การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน chemical energy เป็น mechanical energy ทำในหลอดทดลอง พบว่า ส่วน dynein arm ของ axoneme คือส่วนที่มีความสำคัญ
- dynein นี้คือ ciliary หรือ axonemal dynein



Sperm ยังสละทิศทางได้ แม้ไม่มี plasma membrane

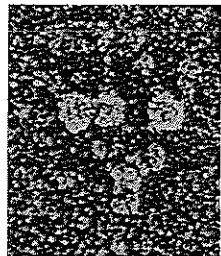
## Intraflagella transport (IFT)

- เป็นกระบวนการสำคัญต่อการสร้างและรักษา cilia และ flagella
- kinesin 2 เคลื่อนย้าย IFT particles พร้อม building materials ไปตาม microtubule รอบนอก เพื่อนำไปใช้ในการต่อปลายสาย microtubule ให้ยาวออก
- Kinesin 2 และ axonemal protein ถูกส่งกลับมายัง basal body บน microtubule เดิม แต่อาศัย dynein

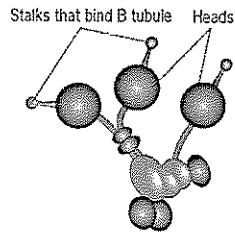


## กลไกการเคลื่อนไหวของ cilia และ flagellar

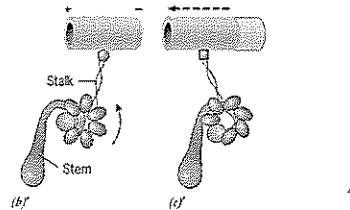
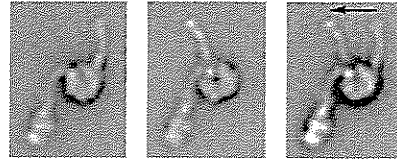
- axonemal dynein มี 3 heavy chain รวมกับ intermediate และ light chain
- การหมุนของส่วน head สร้างแรงที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ cilia และ flagellar



(a) 20 nm

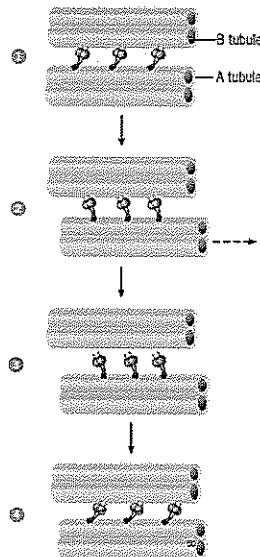


flagellar dynein heavy chain before and after power stroke



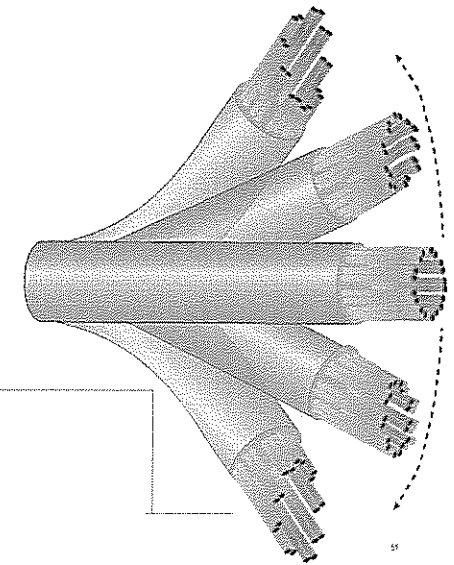
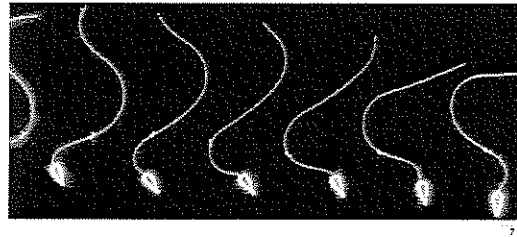
## กลไกการเคลื่อนไหวของ cilia และ flagellar

- ใน intact axoneme ส่วน stem ยึดอยู่กับ A tubule ส่วน head และ stalk ยื่นไปจับ B tubule ของคู่ microtubule ข้างๆ
- dynein molecule เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้ microtubule คู่ล่างเคลื่อนไปทาง basal end
- dynein arms หลุดจาก B tubule ของ microtubule คู่บน
- ทุกอย่างเริ่มใหม่ซ้ำอีก
- Elastic protein nexin ที่ยึดแต่ละคู่ microtubule ใน axoneme เข้าด้วยกัน มีความสำคัญในการจำกัดระยะทางที่แต่ละคู่ microtubule จะ slide จากกัน แรงต้านจาก nexin ทำให้ axoneme บิดตัว
- ณ เวลาใด dynein ข้างหนึ่งของ axoneme จะ active อีกข้างจะไม่ active



## กลไกการเคลื่อนไหวของ cilia และ flagellar

- sliding microtubule theory ได้รับการยอมรับมากขึ้นโดยหลักฐานจากการศึกษาต่างๆ



## Intermediate filaments

- มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-12 nm
- จนถึงปัจจุบัน พบ intermediate filament เฉพาะในเซลล์สัตว์
- เป็นเส้นใยแข็งแรง มีความยืดหยุ่น ให้ความแข็งแรงแก่เซลล์ที่มีแรงเชิงกลมากกระทำ พบใน neuron, muscle cell, epithelial cell ที่บุช่องในลำตัว
- IF มีองค์ประกอบทางเคมีที่มี polypeptide หลากหลายมาประกอบเข้าด้วยกัน
- IF ของมนุษย์ประกอบด้วย polypeptide ที่ถูก encode จากยีนร่วม 70 ยีน
- Polypeptide subunit ของ IF แบ่งออกได้เป็น 5 major classes
- Class I-IV – cytoplasmic filaments, Class V – พบเรียงตัวอยู่ด้านในของ nuclear envelope

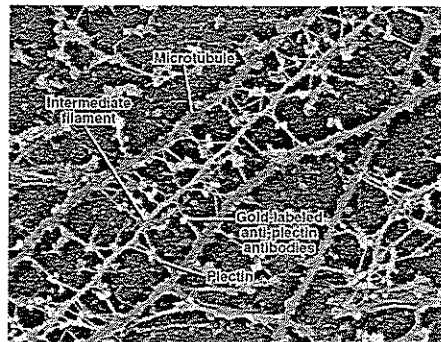
Table 9.2 Properties and Distribution of the Major Mammalian Intermediate Filament Proteins

IF protein	Sequence type	Primary tissue distribution
Keratin (acidic) (28 different polypeptides)	I	Epithelia
Keratin (basic) (26 different polypeptides)	II	Epithelia
Vimentin	III	Mesenchymal cells
Desmin	III	Muscle
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	III	Astrocytes
Peripherin	III	Peripheral neurons
Neurofilament proteins		Neurons of central and peripheral nerves
NF-L	IV	
NF-M	IV	
NF-H	IV	
Nestin	IV	Neuroepithelia
Lamin proteins		All cell types (Nuclear envelopes)
Lamin A	V	
Lamin B	V	
Lamin C	V	

- IF มีองค์ประกอบทางเคมีที่มี polypeptide หลากหลายมาประกอบเข้าด้วยกัน
- Polypeptide subunit ของ IF แยกออกได้ เป็น 5 major classes
- Class I-IV – cytoplasmic filaments, Class V – พบเรียงตัวอยู่ด้านในของ nuclear envelope

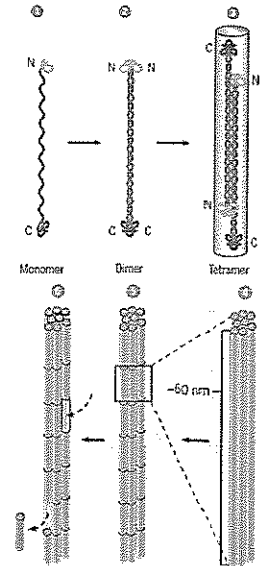
## Intermediate filaments

- IF แผ่ไปใน cytoplasm และมักมีส่วนเชื่อมกับ cytoskeleton ชนิดอื่น
- ในเซลล์หลายชนิดพบโปรตีน plectin เป็นสะพานเชื่อม
- IF polypeptide ที่หลากหลายมีการจัดเรียง โครงสร้างคล้ายกัน จึงเป็น filament ที่คล้ายกัน
- Polypeptide ของ IF ทุกชนิดประกอบด้วย central, rod-shaped,  $\alpha$ -helical domain



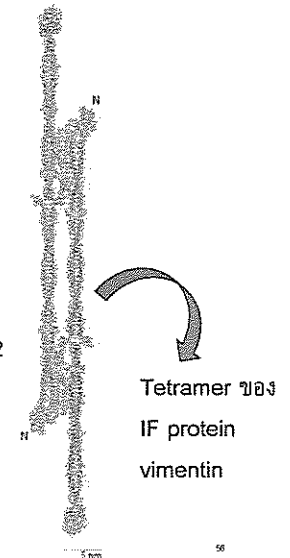
## Intermediate filament - architecture

- central rod-shaped helical domain ขนานข้างด้วย globular domain
- polypeptide 2 สาย มาพันกันเป็น dimer โดย  $\alpha$ -helical rod ของ polypeptide 2 สายพันกันคล้ายเชือกยาวประมาณ 45 nm
- polypeptide ใน dimer เรียงตัวทางเดียวกัน dimer จึงมี polarity ด้านหนึ่งมี C-termini อีกด้านมี N-termini
- basic building block ของ IF คือ tetramer ที่เกิดจากการรวมกันของ 2 dimer ที่มีวางตัวสลับทิศกัน tetramer จึงไม่มี polarity
- 8 tetramer แนบติดกันเป็นหน่วยที่มีความยาว 60 nm
- IF ยาวออกโดยการมาต่อกันของ 60 nm unit
- ไม่พบว่า assembly ของ IF ต้องอาศัย ATP หรือ GTP

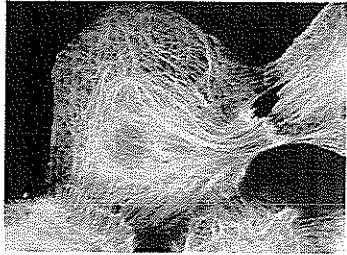


## Intermediate filament - architecture

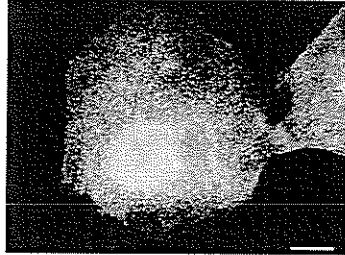
- central fibrous domain ขนานข้างด้วย globular domain
- polypeptide 2 สาย มาพันกันเป็น dimer โดย  $\alpha$ -helical rod ของ polypeptide 2 สายพันกันคล้ายเชือกยาวประมาณ 45 nm
- polypeptide ใน dimer เรียงตัวทางเดียวกัน dimer จึงมี polarity ด้านหนึ่งมี C-termini อีกด้านมี N-termini
- basic building block ของ IF คือ tetramer ที่เกิดจากการรวมกันของ 2 dimer ที่มีวางตัวสลับทิศกัน tetramer จึงไม่มี polarity
- 8 tetramer แนบติดกันเป็นหน่วยที่มีความยาว 60 nm
- IF ยาวออกโดยการมาต่อกันของ 60 nm unit
- ไม่พบว่า assembly ของ IF ต้องอาศัย ATP หรือ GTP



## Microfilament assembly and disassembly

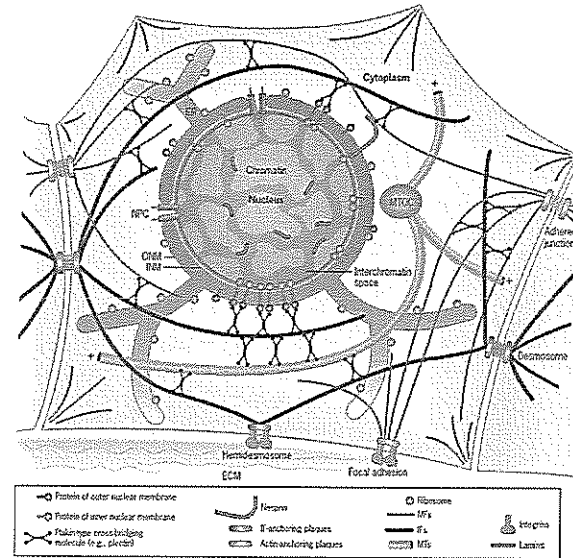


- การกระจายตัวของ IF ใน epithelial cell
- IF ค่อนข้างทนต่อสารเคมี และละลายยากกว่า cytoskeleton ชนิดอื่น ขณะเดียวกันก็มีลักษณะ dynamic



- ฉีด biotin-labeled keratin เข้า epithelial cell พบว่าเกิดการแทรกของ keratin เข้าด้านในสาย ไม่ได้ต่อเข้าที่ด้านปลาย
- Assembly และ disassembly ของ subunit ถูกควบคุมโดย phosphorylation และ dephosphorylation

57

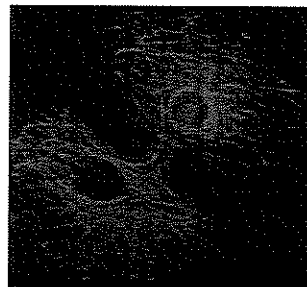


- Organization ของ IF ใน epithelial cell
- IF แผ่ไปทั่วเซลล์
- IF ยึดกับ nuclear envelope และด้านในของ plasma membrane
- IF เชื่อมกับ cytoskeleton ชนิดอื่น
- Plakin protein family เช่น plectin ทำหน้าที่ยึด IF เข้ากับ cytoskeleton ชนิดอื่น

58

## หน้าที่ของ intermediate filaments

- keratin filament เป็นโปรตีนโครงสร้างของ epithelial cell
- IF ที่มี keratin ติดกับ nuclear envelope แผ่ไปใน cytoplasm และมีส่วนติดกับ plasma membrane
- IF มีส่วนที่เชื่อมต่อกับ microtubule และ microfilament ทำให้เกิด integrated cytoskeleton
- IF ทำหน้าที่เป็น scaffold สำหรับการจัดระเบียบภายในเซลล์ และรับแรงทางกลที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์

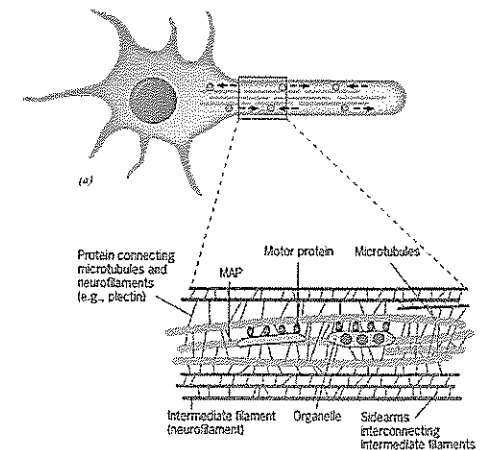


การกระจายตัวของ IF ที่มี keratin ในเซลล์ผิวหนัง (keratinocytes)

59

## หน้าที่ของ intermediate filaments

- พบ IF ใน cytoplasm ของ neuron ตามความยาวของ axon เรียก IF นี้ว่า neurofilaments
- neurofilaments ประกอบด้วยโปรตีน NF-L, NF-H และ NF-M (type IV group)
- NF-H และ NF-M มี sidearm ช่วยรักษาระยะห่างระหว่าง IF
- ช่วงของ neuron differentiation ที่ axon ยืดยาวออก จะพบ microtubule มาก เมื่อยาวเต็มที่แล้วจะเกิด neurofilament เพิ่มมากขึ้น
- โรคทางสมอง เช่น Parkinson's disease พบการจับตัวกันของ IF



## หน้าที่ของ intermediate filaments

- จากการศึกษาหน้าที่ของ IF โดยการยับยั้งยีนพบว่า deletion ในยีนที่สร้าง K14 (type I keratin polypeptide) ซึ่งปกติพบที่ epidermis พบว่าอ่อนแอต่อแรงสัมผัส
- หนูมี phenotype เหมือนคนที่เป็นโรค epidermolysis bullosa simplex (EBS)
- คนป่วยมี mutation ในยีนที่ encode homologous K14 polypeptide
- IF ให้ mechanical strength แก่เซลล์

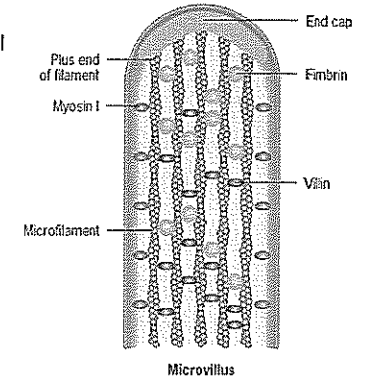


## หน้าที่ของ intermediate filaments

- คนที่เป็นโรค desmin-related myopathy ไม่สามารถสร้าง desmin polypeptide ที่ปกติได้ มีกล้ามเนื้อโครงร่างและกล้ามเนื้อหัวใจอ่อนแอ มี cardiac arrhythmia และอาการหัวใจวาย (desmin เกี่ยวข้องกับการเรียงตัวของ myofibril ในเซลล์กล้ามเนื้อ)
- การขาด IF บางชนิด ไม่ส่งผลเสียร้ายแรงอะไร เช่น หนูที่ขาด vimentin ใน fibroblast, macrophage และ white blood cell แสดงความผิดปกติเพียงเล็กน้อย
- IF มี tissue-specific functions

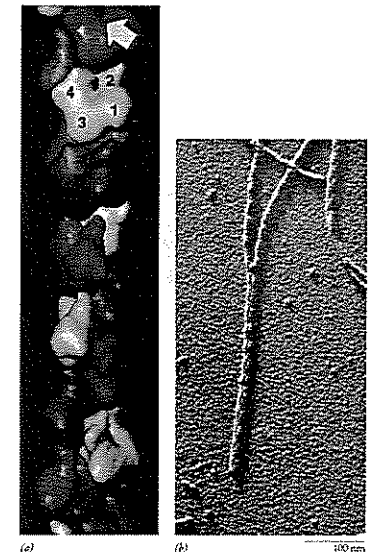
## Microfilament

- การเคลื่อนที่ของเซลล์: การเคลื่อนที่ของเซลล์ในระยะการเจริญ การเคลื่อนที่ของ white blood cell การยืดออกของ epithelial cell ที่ปากแผลเพื่อปิดแผล axon เคลื่อนหา synaptic target – ทั้งหมดนี้ขึ้นกับ microfilament
- microfilament เกี่ยวข้องกับ intracellular movement ด้วย เช่น การส่ง vesicle, phagocytosis และ cytokinesis
- เซลล์พืชอาศัย microfilament ในการขนส่ง vesicle และ organelle มากกว่า
- Microfilament กำหนดรูปร่างของเซลล์ และให้การต้านทานแก่ส่วนของเซลล์ที่ยื่นออกมา



## Structure of microfilament

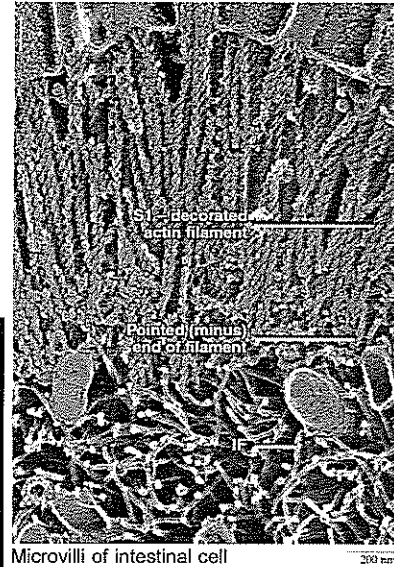
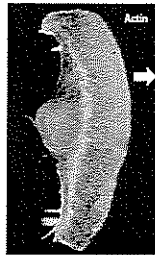
- เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 nm
- ประกอบด้วย globular subunit actin
- เมื่อมี ATP จะเกิด polymerization ของ actin เป็น helical filament ที่ค่อนข้างยืดหยุ่น
- Actin filament เป็นโครงสร้างสองสาย พันกัน เรียก filament แบบนี้ว่า actin filament, F-actin, microfilament
- Actin filament มี polarity มี ATP binding cleft ที่ minus end
- อาจพบการจัดเรียงตัวที่หลากหลาย – เรียงเป็นระเบียบ จับกันเป็น network หลวมๆ หรือเป็นมัดยึดกับอะไรสักอย่าง





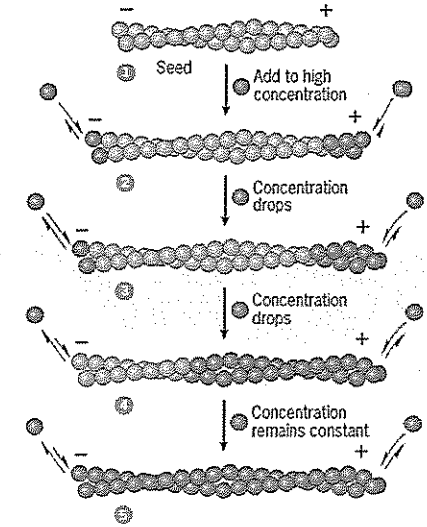
## Structure of microfilament

- actin จับกับโปรตีน myosin
- ส่วนหนึ่งของ myosin ได้แก่ S1 จะจับไปตามความยาวของ microfilament
- เมื่อ S1 จับกับ microfilament ทำให้เห็น polarity ของ filament ด้านหนึ่งจะชี้แหลมเหมือนหัวลูกศร ด้านหนึ่งจะเป็นเหมือนเงี่ยง (barbed)
- actin เป็นโปรตีนที่มีการอนุรักษ์ในกลุ่ม eukaryote
- กระบวนการต่างๆ ของ actin มักต้องมีความเกี่ยวข้องกับ motor protein โดยเฉพาะ myosin superfamily



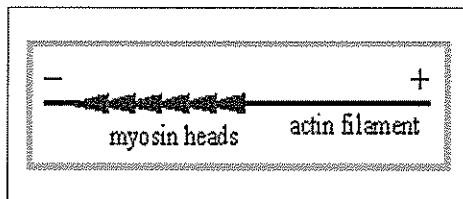
## Microfilament assembly and disassembly

- assembly และ disassembly ขึ้นกับความเข้มข้นของ actin monomer
- ATP-actin monomer มีมาก การต่อสายเกิดขึ้นที่ปลายทั้งสอง
- ATP-actin ลดลง plus end ที่จับ actin ได้ดีกว่าเกิดการต่อสายยาวออกเท่านั้น ด้าน minus หยุดต่อสาย
- Free monomer ลดลง การต่อด้าน plus end ยังคงเกิดขึ้น แต่เกิด disassembly ออกจากด้าน minus
- ความยาวของ filament และความเข้มข้นของ monomer คงที่ ณ จุดหนึ่ง
- Thread milling process

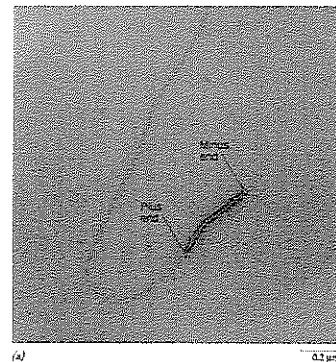


## Microfilament assembly and disassembly

- actin เป็น ATPase โดย ATP เกิด hydrolysis หลังจาก actin monomer เข้าต่อในสาย polymer แล้ว
- มีช่วง nucleation และ elongation
- การต่อสายเกิดขึ้นได้ทั้งสองปลาย แต่เกิดได้ดีไม่เท่ากัน



เมื่อติด S1 ทำให้บอกได้ว่าด้านที่ยาวเร็วกว่าคือ plus end

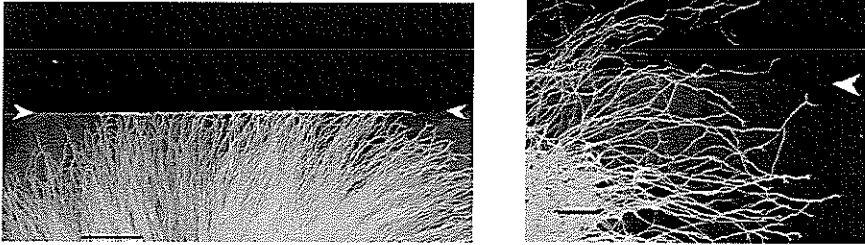


## Myosin: the molecular motor of actin filaments

- Motor protein ที่ทำงานร่วมกับ actin filament คือ myosin superfamily
- Myosin (ยกเว้น myosin VI) เคลื่อนที่ไปยัง plus end ของ microfilament
- สกัต์ myosin ได้จาก eukaryotic cell หลากหลาย – protist, plants, non muscle cells os animals, vertebrate cardiac and smooth muscle tissues
- มีส่วนหัวเป็น motor domain ที่เป็น heavy chain และพบ light chain อื่นอยู่ในโครงสร้างด้วย
- Myosin แบ่งเป็น สองกลุ่มใหญ่
  - conventional (type II)
  - unconventional (type I, type III-XVIII)
- พบ myosin 40 ชนิด จาก 12 classes ในมนุษย์

## Conventional (type II) myosin

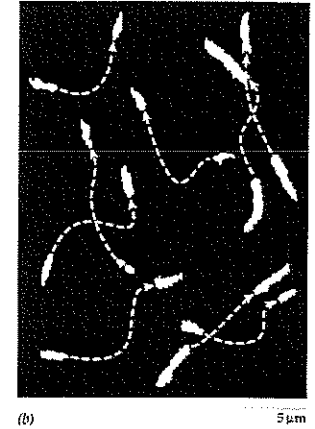
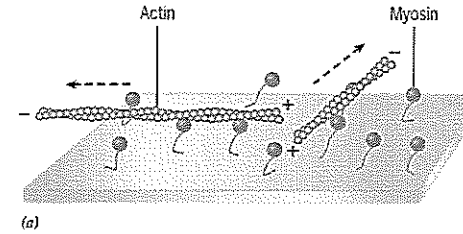
- ถูกศึกษาและเป็นที่เข้าใจมากที่สุด
- เป็น primary motor ที่มีบทบาทในการหดตัวของกล้ามเนื้อ แต่ก็พบใน nonmuscle cell เช่นเดียวกัน



เซลล์ที่ขาด myosin IIB ไม่เกิดการงอกของ growth cone ตามการมีอยู่ของโปรตีนจาก extracellular matrix

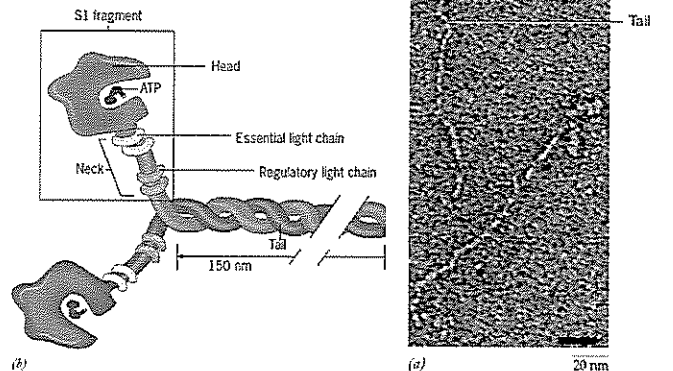
## Conventional (type II) myosin

- แคลส่วน S1 fragment ก็เพียงพอที่จะเคลื่อนย้าย actin filament ไปได้
- ส่วน neck ช่วยในการเคลื่อนที่
- ส่วน tail มีประโยชน์เชิงโครงสร้าง ทำให้ myosin จับกันเป็น filament ได้



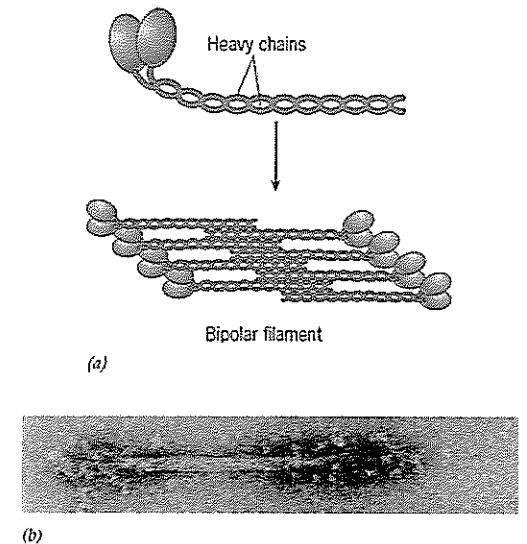
## Conventional (type II) myosin

- ประกอบด้วยส่วน head (2 globular heads), neck (1 ตู๋), tail (single long-rod shaped)
- motor activity ขึ้นกับส่วนหัว



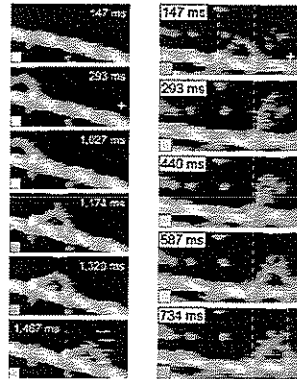
## Conventional (type II) myosin

- โมเลกุลของ myosin II จับกันเป็น bipolar filament
- ส่วนหัวที่ปลายตรงข้ามสามารถดึง actin filament มาหากันได้อย่างที่เกิดขึ้นในเซลล์กล้ามเนื้อ
- assembly ของ myosin นี้เกิดขึ้นตามความจำเป็น และความต้องการของเซลล์ในบริเวณหนึ่งๆ



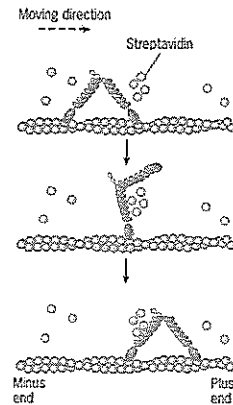
## Unconventional myosin

- มี single head และไม่รวมกันเป็น filament แต่ทำงานเป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ
- ที่พบชนิดแรกใน ค.ศ. 1973 คือ myosin I เป็นสะพานเชื่อม actin filament กับ lipid bilayer ของ plasma membrane ใน microvillus
- ที่ศึกษากันดีที่สุดคือ myosin V ทำงานบน actin filament ถ้ายับกับ kinesin และ dynein



(a)

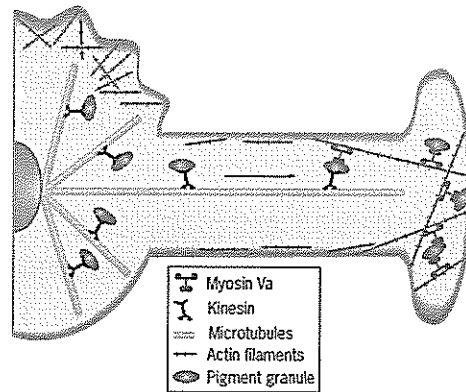
(b)



(b') hand over hand

## Unconventional myosin

- myosin I, V และ VI จับกับ vesicle และ organelle เพื่อตรึงโครงสร้างให้อยู่ในบริเวณนั้น หรือเพื่อ transport โครงสร้างนั้น
- บาง vesicle พบว่ามี microtubule-based motors และ microfilament-based motor (unconventional myosin)
- การขนส่งระยะไกลเกิดขึ้นโดย microtubule แต่เมื่อถึงปลาย microtubule จะมีการส่ง vesicle ต่อให้ microfilament สำหรับการขนส่งระยะใกล้

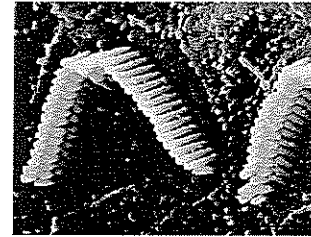


การขนส่ง pigment granules (melanosome) โดย myosin Va ส่ง melanosome ให้กับส่วน hair follicle

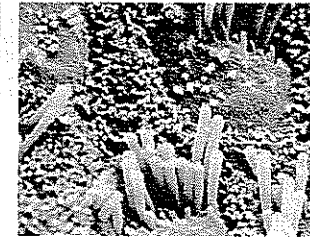
74

## Unconventional myosin

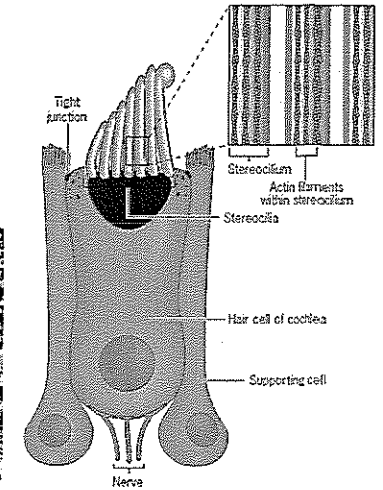
- hair cell ในหูชั้นในมีส่วนของขนที่ค่อนข้างแข็ง หรือ stereocilia อยู่ด้านบนของเซลล์ ไม่มี microtubule แต่มีมัดของ actin filament มีปลาย plus end อยู่ปลายขน
- บน actin filament นี้มี unconventional myosin หลายชนิด จับอยู่ เมื่อ myosin gene เกิดการกลาย stereocilia ผิดปกติ



(f)

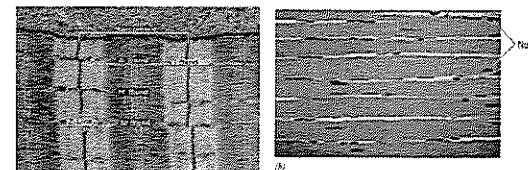


(g)



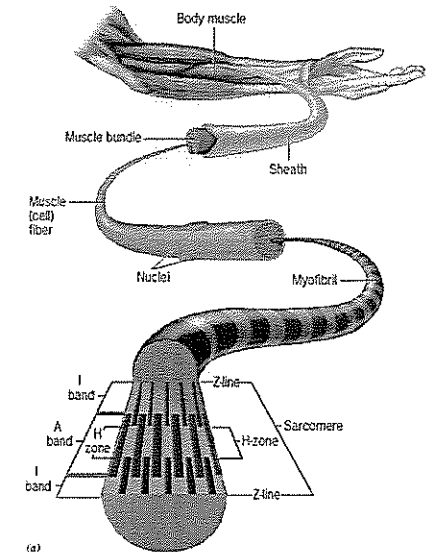
## Muscle contractility

- muscle cell 1 เซลล์ หน้า 10-100  $\mu\text{m}$  ยาว 100 mm มี nucleus หลายร้อยอัน
- skeletal muscle fiber ถูกเรียกว่า muscle fiber แต่ละ muscle fiber ประกอบด้วยมัดของ myofibril
- ใน myofibril มีหน่วยที่เกิดการยืดหด เรียกว่า sarcomere
- ภายใน sarcomere แต่ละหน่วยเกิดจากองค์ประกอบของ filament 2 ชนิด เรียกว่า thick และ thin filaments



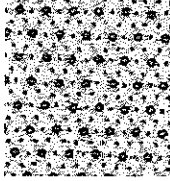
(a)

(b)

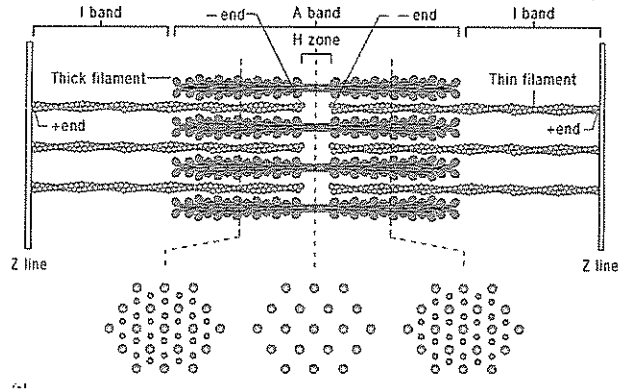


(a)

## Muscle contractility

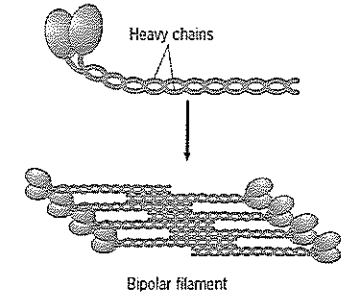
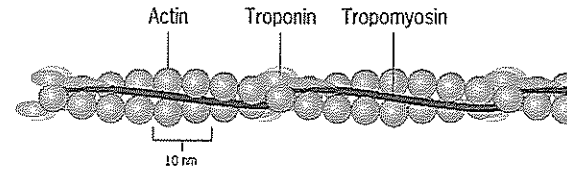


- ภาพตัดขวางของ myofibril แสดงให้เห็น thin filament อยู่รอบ thick filament ใน 6 มุม และแต่ละ thin filament จะอยู่ระหว่าง thick filament 2 เส้น
- ภาพตัดตามยาว แสดงให้เห็นส่วนที่ยื่นออกจาก thick filament เป็นระยะห่างสม่ำเสมอ ทำหน้าที่ในการจับกับ thin filament ที่อยู่ใกล้ๆ



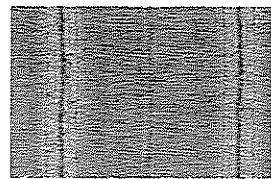
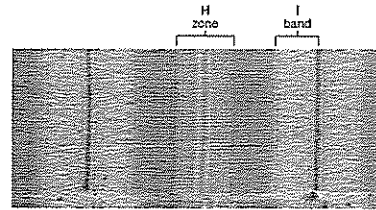
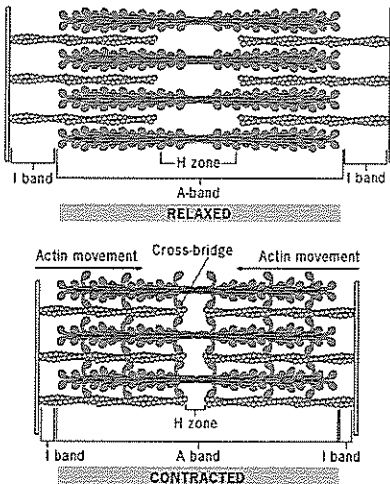
## The sliding filament model ของการหดของกล้ามเนื้อ

- บน thin filament นอกจากมี actin แล้วยังมีโปรตีนอีก 2 ชนิด: troponin และ tropomyosin
- tropomyosin เป็นโมเลกุลยาวประมาณ 40 nm พาดอยู่ในร่องบน thin filament
- troponin เป็น globular protein complex มีส่วนที่ติดกับ actin และ tropomyosin
- ส่วน thick filament มี myosin II molecule หลายชนิด ส่วนกลางไม่พบหัวของ myosin



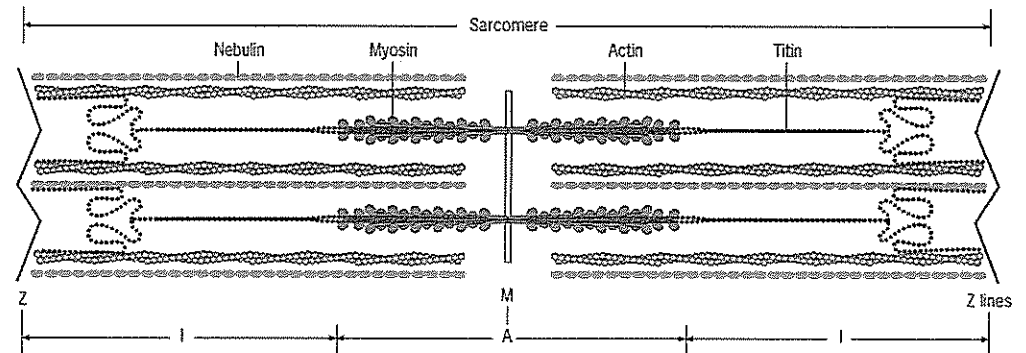
## The sliding filament model ของการหดของกล้ามเนื้อ

- Skeletal muscle ทำงานโดยการหดของ sarcomere ซึ่งเกิดจากการเลื่อนของ thin filament เข้าหาส่วนกลางของ sarcomere



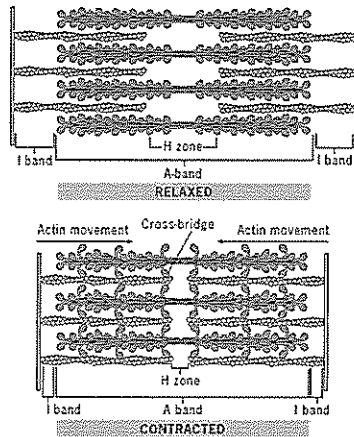
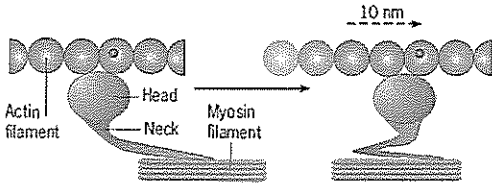
## The sliding filament model ของการหดของกล้ามเนื้อ

- โปรตีนที่พบมากเป็นอันดับ 3 ใน skeletal muscle คือ titin ซึ่งทำหน้าที่เปรียบได้กับ molecular spring มีบทบาทในการป้องกันการขาดของ sarcomere เมื่อกล้ามเนื้อยืด และรักษาค่าตำแหน่งที่เหมาะสมของ myosin filament เมื่อกล้ามเนื้อหด



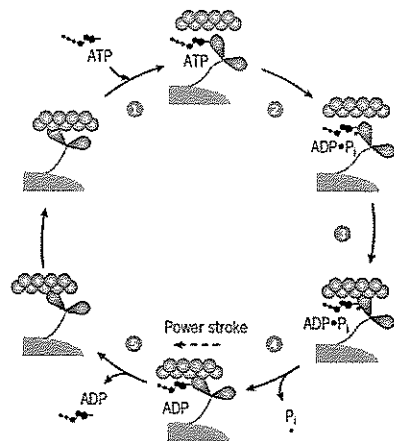
## The molecular basis of contraction

- ช่วงหดตัว myosin head กางออกแล้วจับกับ actin filament
- เกิด conformational change ที่ myosin head ทำให้เกิดการผลัก actin filament เข้าไปในทิศสู่บริเวณกลาง sarcomere
- ATP hydrolysis ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง myosin head แต่แรงที่เกิดขึ้นถูกทำให้เพิ่มขึ้นด้วยแรงจากส่วน neck
- มีการศึกษาใน myosin ที่มีความยาว neck ต่างกัน



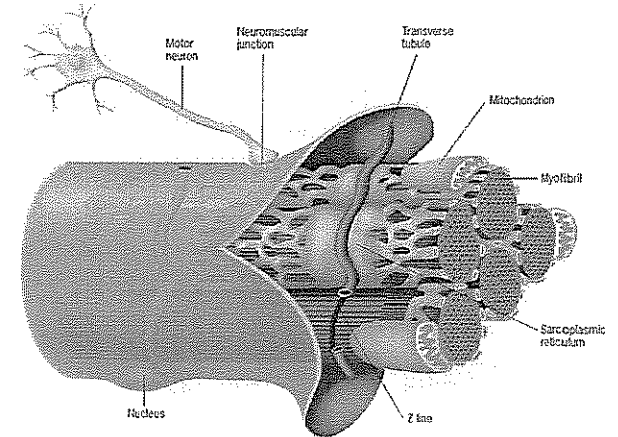
## The energetics of filament sliding

- ATP จับ myosin ส่งผลให้ myosin head หลุดจาก actin filament
- ATP hydrolysis เกิดขึ้น ADP และ Pi ยังคงติดกับ myosin head
- myosin ที่ absorb พลังงานไว้จับกับ actin filament แล้วปล่อย phosphate ออก ทำให้เกิด conformational change ที่ส่งผลให้เกิดการเลื่อนตำแหน่งของ actin filament เข้าบริเวณกลาง sarcomere
- เกิดการปล่อย ADP แล้วจับ ATP ใหม่
- ไม่มี ATP ไม่เกิดการปล่อย actin filament ของ myosin head ทำให้เกิด rigor mortis



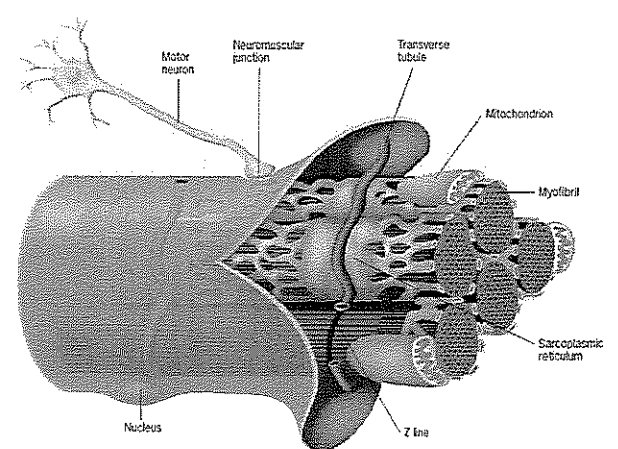
## การกระตุ้นและการหดตัวของกล้ามเนื้อ

- muscle fibers ทำงานเป็นกลุ่มของ motor unit โดย fiber ใน motor unit ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณจากแขนงของ neuron ตัวเดียวกัน ทำให้เกิดการหดตัวพร้อมกัน
- ปลาย axon ที่สัมผัส muscle fiber คือ neuromuscular junction
- Nerve impulse ที่มาถึง muscle fiber จะเข้าไปยังข้างในเซลล์โดยอาศัย transverse (T) tubule



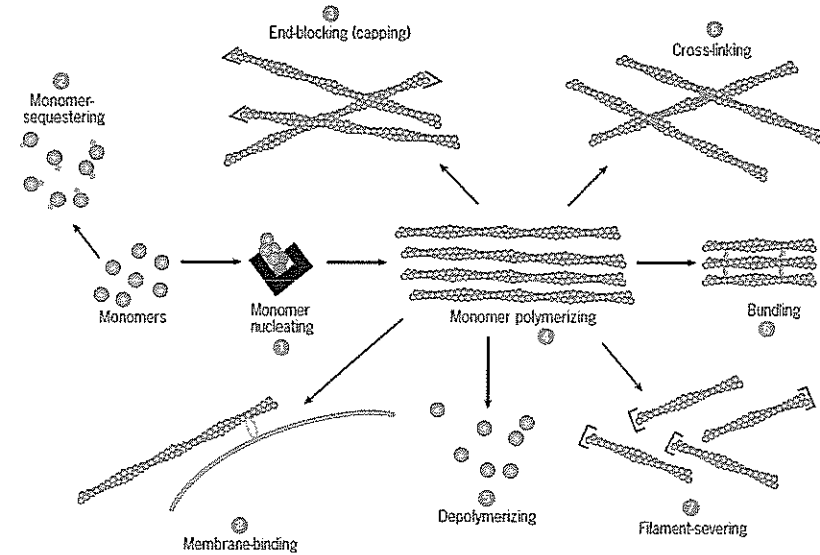
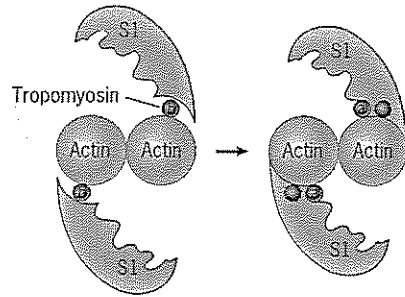
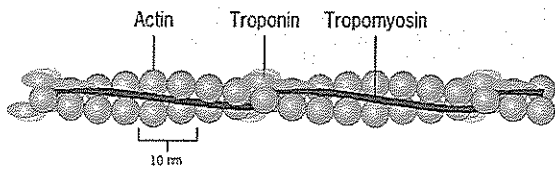
## การกระตุ้นและการหดตัวของกล้ามเนื้อ

- T tubule ติดกับ cytoplasmic membrane คือ sarcoplasmic reticulum (SR) ซึ่งวางตัวรอบ myofibril
- 80% ของโปรตีนที่ฝังอยู่ใน SR ประกอบด้วย  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase molecule ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนย้าย  $\text{Ca}^{2+}$  ระหว่าง cytosol และ SR lumen
- คลายตัว  $\text{Ca}^{2+}$  ใน cytoplasm ต่ำ
- หดตัว  $\text{Ca}^{2+}$  ใน cytoplasm เพิ่มขึ้น



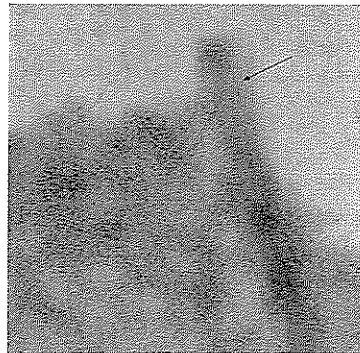
## บทบาทของ tropomyosin ในการหดตัวของกล้ามเนื้อ

- เมื่อ sarcomere อยู่ในสภาพ relaxed โมเลกุลของ tropomyosin ทำให้ myosin binding site บน actin ทำงานไม่ได้ ซึ่งตำแหน่งของ tropomyosin อยู่ใต้การควบคุมของ troponin
- เมื่อระดับของ  $Ca^{2+}$  สูงขึ้น  $Ca^{2+}$  จะจับกับ subunit ใน troponin ทำให้เกิด conformational change ใน troponin แล้ว troponin เกิดการเคลื่อนที่
- tropomyosin เคลื่อนที่ด้วย การขยับนี้ทำให้ actin กับ myosin จับกันได้



## Nonmuscle motility

- เป็นเหตุการณ์ที่องค์ประกอบมักพบอยู่บริเวณ cortex ของเซลล์
- Motility เช่น การยื่นส่วนของเซลล์จับสิ่งนอกเซลล์ การยื่นของเซลล์เพื่อการเคลื่อนย้ายที่ การหดของเซลล์ใน cytokinesis – ทั้งหมดนี้ ขึ้นกับ assembly ของ microfilament ที่ cortex
- Actin filament ไม่สามารถมี interaction ระหว่างกันเพื่อให้เกิดกิจกรรมที่เป็นประโยชน์ได้
- การจัดเรียงตัวและพฤติกรรมของ actin filament ในเซลล์ ขึ้นกับ interaction ระหว่าง actin filament กับ actin binding protein ซึ่งมีหลายชนิด



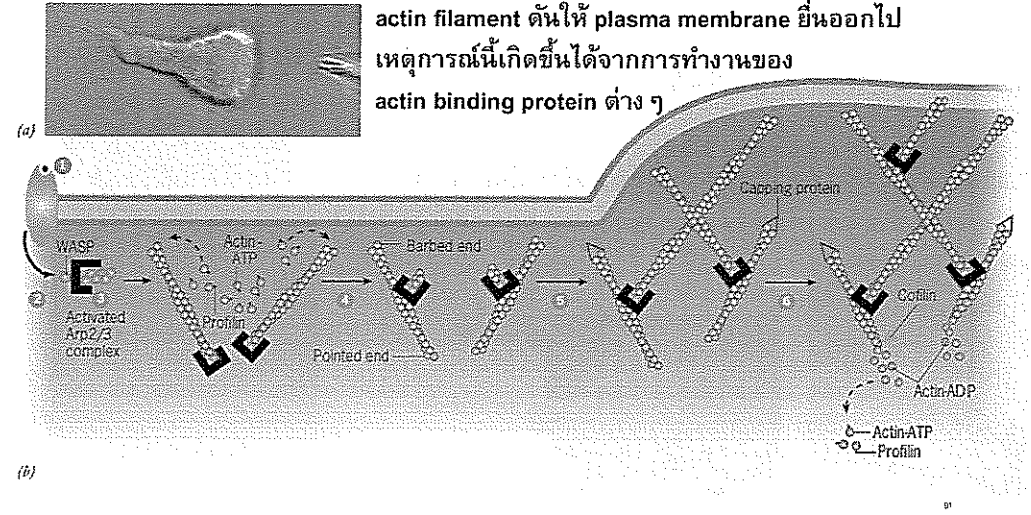
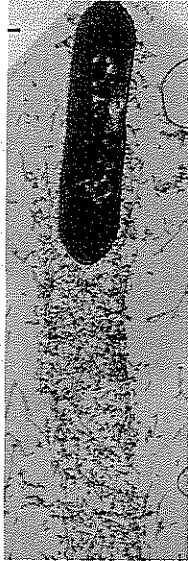
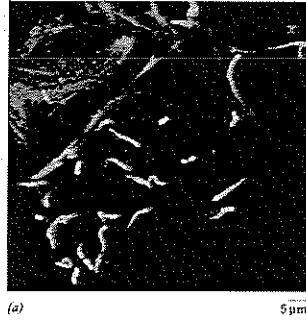
Different arrangement of actin filament within a cell.

## บทบาทของ actin binding protein

- Nucleating proteins – promote ให้เกิด nucleation ของ actin filament
- Monomer sequestering proteins – เมื่อจับ actin-ATP monomer แล้วจะยับยั้ง polymerization จึงควบคุม monomer-polymer equilibrium ในเซลล์
- End blocking (capping) proteins – ควบคุมความยาวของ actin filament หากเติม cap ที่ plus end จะเกิด disassembly จากด้าน minus end หากด้าน minus ถูก cap ด้วย จะไม่เกิด depolymerization
- Monomer polymerizing proteins
- Actin filament depolymerizing proteins
- Cross-linking proteins – ส่งเสริมให้เกิดโครงสร้างสามมิติของ actin filament
- Filament severing proteins – ทำให้เกิดการหักของ actin filament ทำให้ได้ filament เพิ่ม
- Membrane binding proteins – การยื่นออกหรือเว้าเข้าของ plasma membrane ต้องอาศัยการยึดติดระหว่าง actin filament กับ membrane

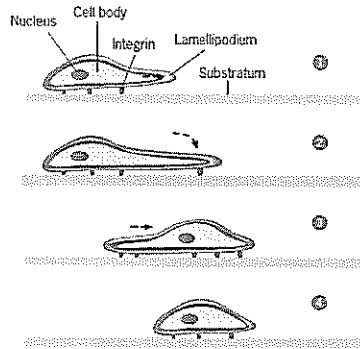
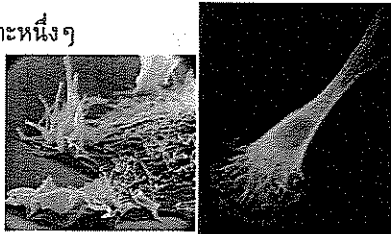
## Actin polymerization ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ได้

- *Listeria monocytogens* เคลื่อนที่ไปใน cytoplasm โดยอาศัยแรงจาก actin filament ที่สร้างขึ้นด้านท้ายเซลล์
- Surface protein ของแบคทีเรียกระตุ้น nucleating proteins ในเซลล์ host
- Actin filament ให้แรงในการเคลื่อนที่ได้โดยไม่ต้องอาศัย myosin เลย

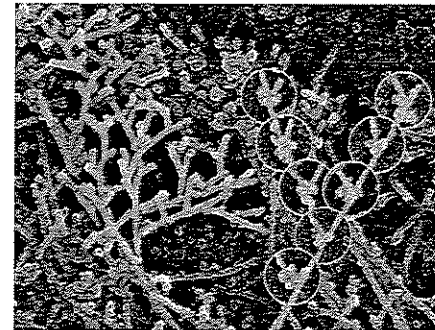


## Cell locomotion

- ส่วนของเซลล์ที่ยื่นออกมาสำหรับการเคลื่อนที่ = lamellipodium
- ใน lamellipodium ไม่พบ vesicle
- การเคลื่อนที่ที่ไม่อาศัย molecular motor ต้องอาศัย actin-binding protein ในการทำให้เกิด assembly และ disassembly ของ actin filament network ณ ตำแหน่งเฉพาะหนึ่งๆ



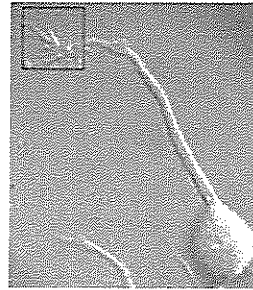
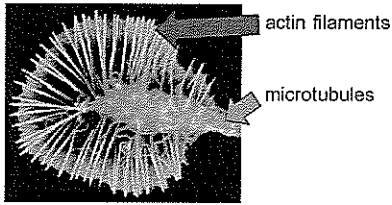
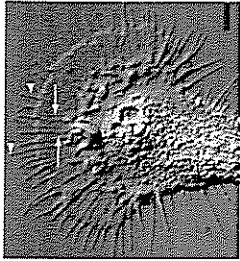
## Lamellipodial extension



- Filamentous actin network อยู่ใต้ plasma membrane
- พบ actin binding protein Arp2/3 ที่จุดที่มีการแตกแขนงของ actin filament
- Lamellipodial movement เป็นกระบวนการที่ dynamic

## Axonal outgrowth

- growth cone คือส่วนปลายที่เคลื่อนที่ได้บน axon ที่กำลังยืดยาวออก
- ส่วนรอบนอกของ lamellipodium มีโครงสร้างเป็นแขนงเรียก filopodia ข้างในเต็มไปด้วย actin filament

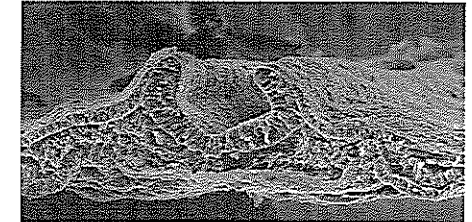


## การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในกระบวนการเจริญ

- การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เกิดจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของ cytoskeleton ภายในเซลล์
- ตัวอย่าง: การเจริญขั้นแรกๆ ของ nervous system ในช่วงท้ายของ gastrulation เซลล์ชั้นนอก (ectodermal cells) ที่ด้าน dorsal ของตัวอ่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

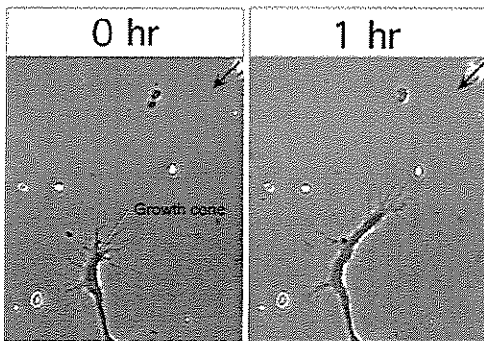
สูงยาวเพราะ microtubule  
การหดแคบที่ด้านบนเกิดจาก  
actin filament

➔ เกิดการม้วนเข้าด้านในของเซลล์ทั้งชั้น

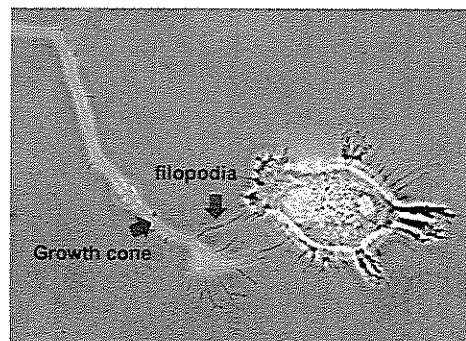


neural plate ม้วนเข้าเป็น neural tube

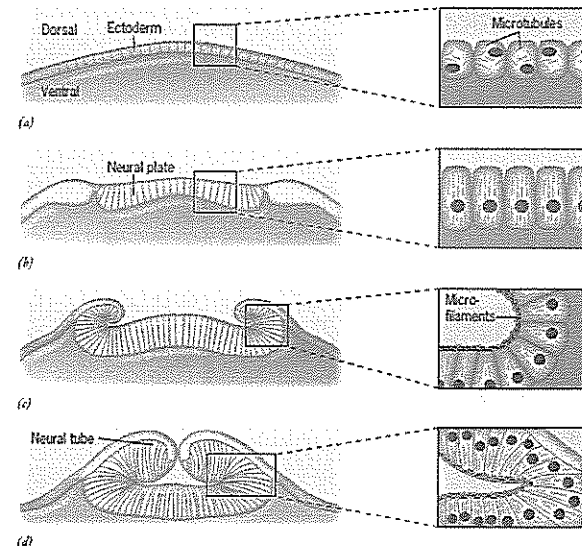
## The directed movements of a growth cone



(a) growth cone เลี้ยวเข้าหาโมเลกุลจากปลาย pipette



(b) growth cone เลี้ยวเข้าหาเซลล์เป้าหมาย

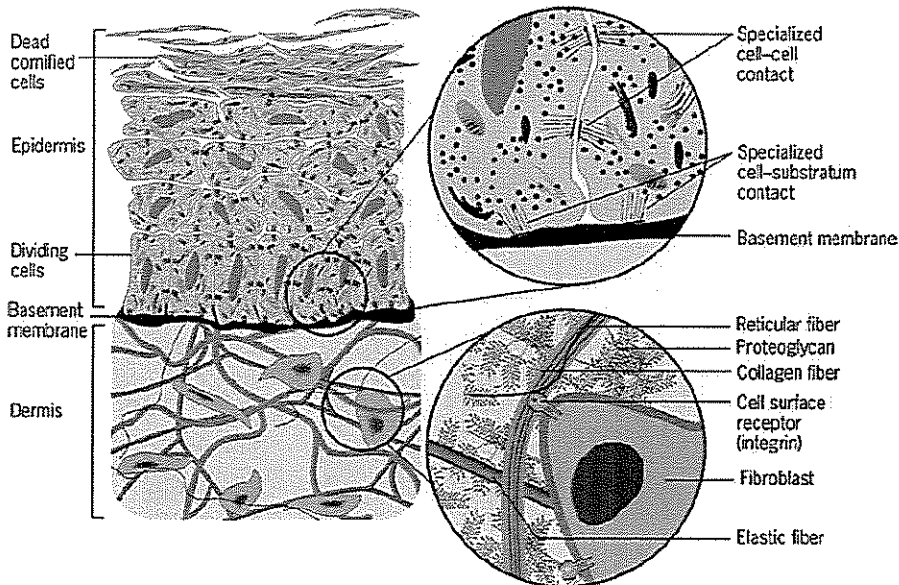


- ectodermal cells ที่บริเวณ mid-dorsal region เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแล้วม้วนเป็น neural tube
- การยืดยาวออกของ microtubule ทำให้เซลล์สูงขึ้น
- แรงจากการหดของ actin filament ทำให้เซลล์มีด้านบนแคบกว่าด้านล่าง เซลล์โค้ง
- ทั้ง layer ของเซลล์เกิดการม้วนตัว



## ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และสิ่งแวดล้อม

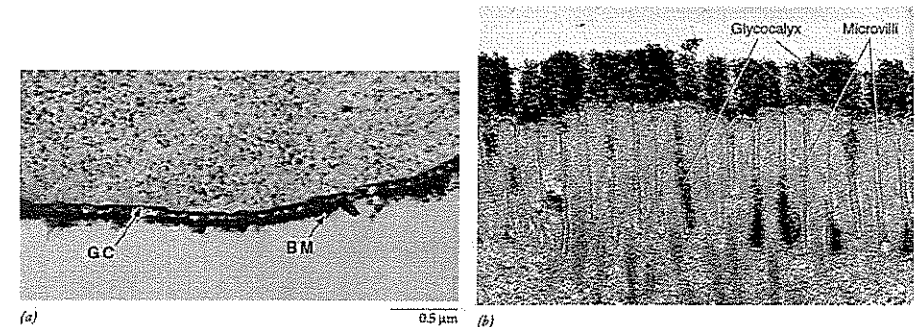
- สิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ เซลล์ในเนื้อเยื่อมีความสัมพันธ์ระหว่างกัน และมีความสัมพันธ์กับ extracellular matrix ที่อยู่รอบๆ เซลล์
  - ปฏิสัมพันธ์นี้ควบคุมกิจกรรมหลายอย่างของเซลล์ – cell migration, cell growth, cell differentiation รวมถึง organization ในเนื้อเยื่อ
  - ตัวอย่าง: ผิวหนัง ประกอบด้วย epithelial tissue ในชั้น epidermis ซึ่งมี epithelial cell เรียงติดกันตั้งบน basement membrane ชั้น dermis มี connective tissue ซึ่งส่วนใหญ่คือ extracellular matrix
- ➔ เซลล์ interact กับสิ่งที่เป็สิ่งแวดล้อมของมัน



## พื้นที่นอกเซลล์

- หากเริ่มพิจารณาจาก plasma membrane ออกมา จะพบว่าโปรตีน หรือ lipid ที่ฝังที่ cell membrane มีสายของน้ำตาลติดอยู่และยื่นออกมา ทำให้เสมือนเซลล์มี cell coat อยู่
- ➔ glycocalyx
- glycocalyx มีความสำคัญต่อ cell-cell และ cell-substratum interaction, ปกป้องเซลล์ และจับกับ regulatory factor

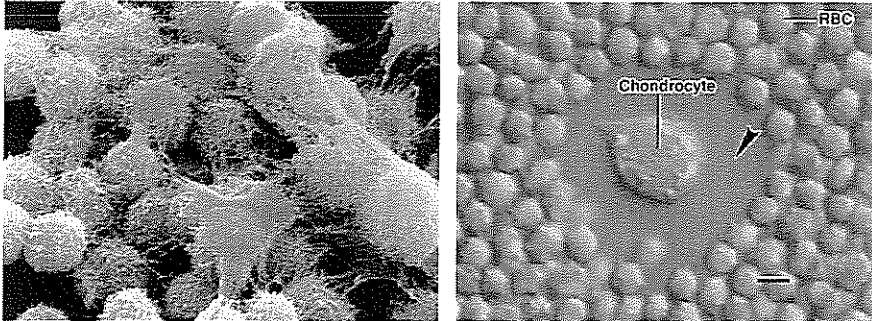
## พื้นที่นอกเซลล์



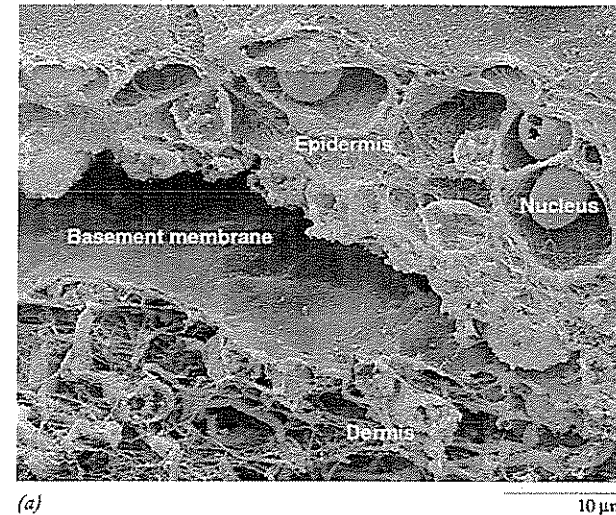
- ectodermal cell ด้าน basal ของ embryo ไข่ แสดง inner glycocalyx และ outer basement membrane
- ด้าน apical ของ epithelial cell จากลำไส้

## Extracellular matrix (ECM)

- ECM: network ของสารต่างๆ นอกเซลล์ ในบริเวณที่อยู่ติดกับเซลล์
- มีบทบาทในการกำหนดกิจกรรมหลายอย่างของเซลล์ ผ่าน physical และ biochemical signals



## Basement membrane (basal lamina)

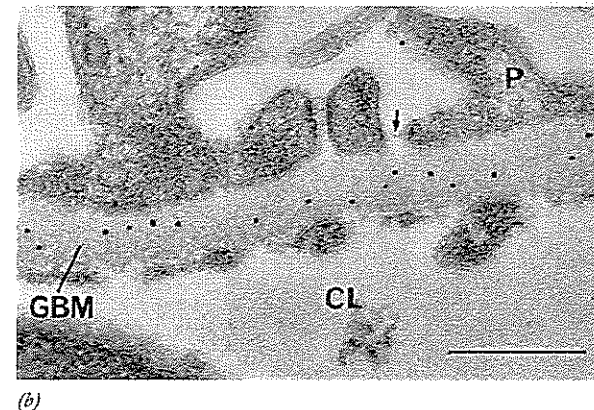


- human skin: เห็น basement membrane กั้นระหว่าง epidermis และ dermis

## Basement membrane (basal lamina)

- เป็น noncellular layer หนาประมาณ 50-200 nm
- พบรอบ nerve fiber, muscles, fat cells
- พบที่ด้าน basal surface ของ epithelial tissue
- พบที่ด้าน basal surface ของ endothelial lining ของหลอดเลือด
- ให้ support แก่เซลล์ที่ตั้งอยู่บน basement membrane
- ส่งสัญญาณเกี่ยวกับการรอดชีวิตของเซลล์
- เป็นพื้นผิวสำหรับ cell migration
- แบ่งกันเนื้อเยื่อต่างชนิดในอวัยวะออกจากกัน
- เป็นตัวขวางการเคลื่อนผ่านของสารโมเลกุลใหญ่

## Basement membrane (basal lamina)



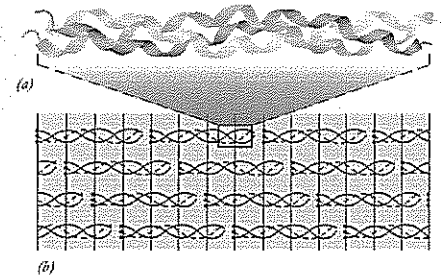
- basement membrane ที่หนาเป็นพิเศษ พบกั้นระหว่างหลอดเลือดใน glomerulus กับท่อไต มีบทบาทในการกรองของเหลวในการผลิตปัสสาวะ

## โมเลกุลที่พบใน extracellular matrix

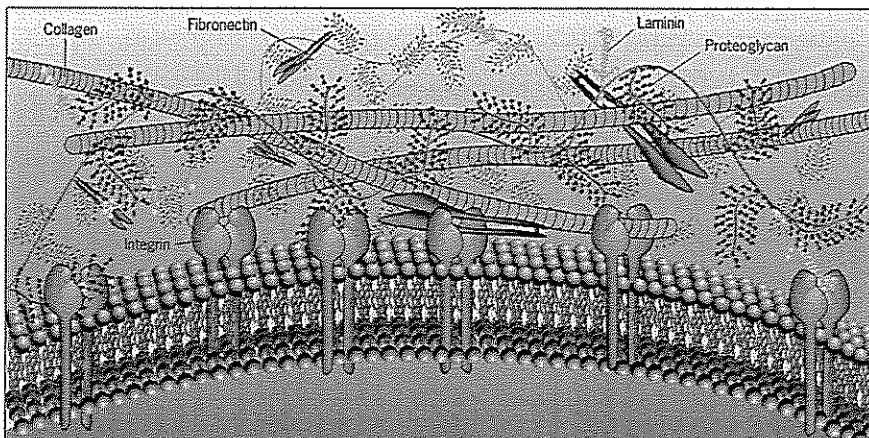
- ECM มีหลายแบบ แต่มักพบองค์ประกอบที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ คล้ายๆ กัน
- โปรตีนใน ECM เป็นเส้นใยยาว (fibrous) สร้างเป็นโครงข่ายสามมิติได้
- โปรตีนใน ECM ทำหน้าที่เป็นเสมือนเครื่องหมายนำทางของเซลล์ เป็นโครงร่าง เป็นลวดยึด และเป็นกาว
- ความผิดปกติที่ ECM ทำให้เกิดโรคได้
- โมเลกุลที่สำคัญและพบใน ECM เกือบทั้งหมด ได้แก่ collagen

## Collagen

- ประกอบขึ้นจากเส้นใย glycoprotein ที่พบใน ECM เท่านั้น
- มีความแข็งแรงในการต้านแรงดึง (tensile strength) พบเป็น 25% ของโปรตีนทั้งหมดในร่างกายมนุษย์
- collagen สร้างจาก fibroblast เป็นหลัก (สร้างได้จาก smooth muscle cell และ epithelial cell เช่นกัน)
- โมเลกุลของ collagen ประกอบขึ้นจาก polypeptide 3 สาย เรียกว่า  $\alpha$  chain พันเป็น triple helix

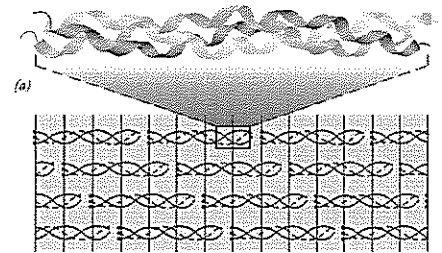


## The macromolecular organization of the ECM



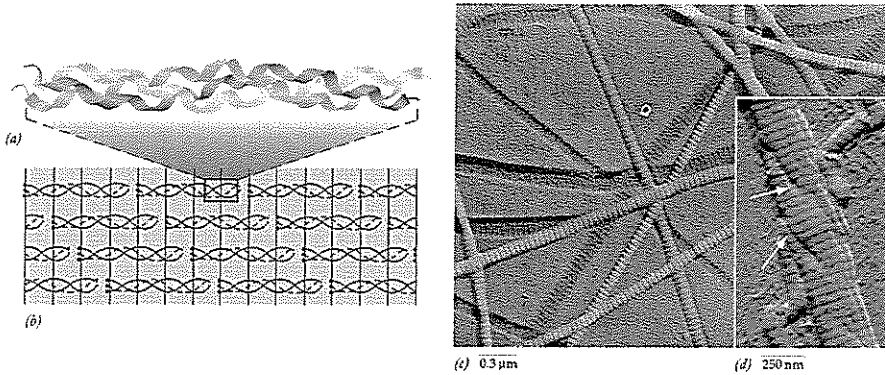
## Collagen

- แต่ละ  $\alpha$  chain ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลจับกันด้วย hydrogen bond ซึ่งเกิดจากการที่ proline และ lysine ในสายถูกเติมหมู่ hydroxyl เข้าไป
- Vitamin C เป็น coenzyme ในการเติมหมู่ hydroxyl เข้าที่ proline และ lysine
- ขาด vitamin C ทำให้ collagen มีโครงสร้างผิดปกติ ทำให้เกิดความผิดปกติของ connective tissue – โรคเลือดออกตามไรฟัน แผลหายช้า กระดูกเปราะ



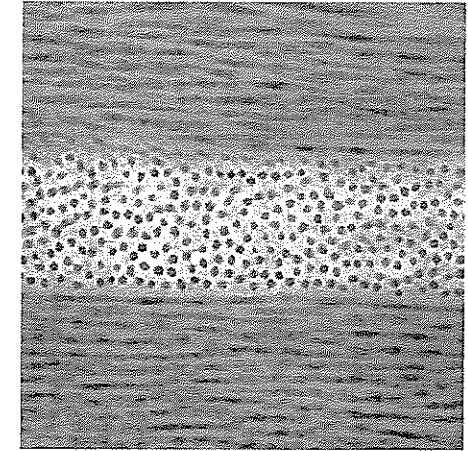
## Collagen

- collagen แต่ละโมเลกุลรวมกันเป็น fiber ขนาดใหญ่
- Levels of organization ของ collagen: collagen molecule (3 helical  $\alpha$  chains) รวมกันเป็นมัด เรียก collagen fibril โดยอาศัย covalent cross links ระหว่างโมเลกุลของ collagen



คุณสมบัติของเนื้อเยื่อบางอย่างขึ้นกับการจัดเรียงตัวของโมเลกุล collagen ในเนื้อเยื่อนั้น

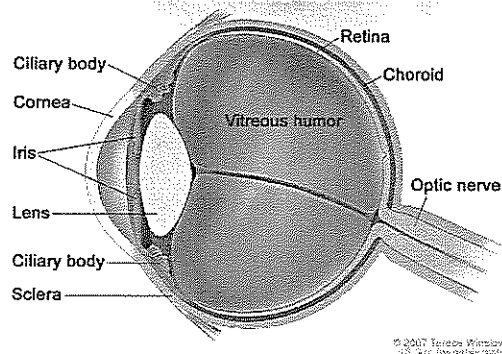
- collagen fibril เรียงเป็นชั้นสลับกัน โดยแต่ละชั้นมีแนวการเรียงของ collagen fiber ตั้งฉากกัน
- ให้ความแข็งแรง
- ลดการกระเจิงแสง ทำให้เกิดความโปร่งแสง



200 nm  
Corneal stroma

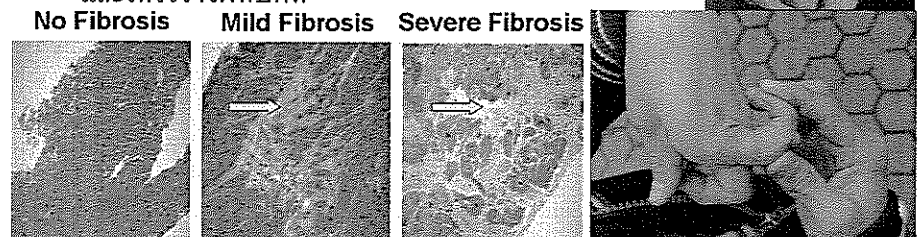
คุณสมบัติของเนื้อเยื่อบางอย่างขึ้นกับการจัดเรียงตัวของโมเลกุล collagen ในเนื้อเยื่อนั้น

- เอ็น เชื่อมกล้ามเนื้อกับกระดูก ต้องต้านแรงดึงช่วงกล้ามเนื้อหดตัวอย่างมาก collagen fibril เรียงตัวในแนวขนานกับแรงดึง
- cornea เป็นชั้นที่ปกป้องดวงตา แต่โปร่งแสง
- ใน cornea ชั้นกลาง (stroma) พบ collagen fibril ขนาดสั้นเรียงอย่างเป็นระเบียบ



ความผิดปกติในการสร้าง collagen fibril ทำให้เกิดโรค

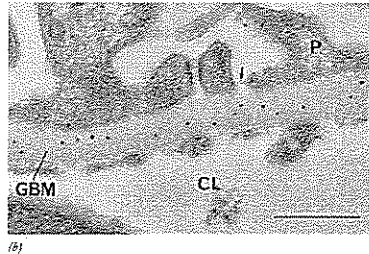
- fibrosis: การสร้าง connective tissue ที่มี collagen มากผิดปกติ
- osteogenesis imperfecta – กระดูกเปราะ ผิวหนังบาง เอ็นอ่อนแอ
- Ehler-Danlos syndromes – hyperflexible joints and highly extensible skin
- การกลายในยีนที่ encode type II collagen – ทำให้กระดูกอ่อนมีความผิดปกติ ส่งผลให้มีสภาพแคระและโครงร่างผิดปกติ



## collagen บางชนิดเป็น nonfibrillar collagen

- เช่น collagen type IV เป็น nonfibrillar collagen พบที่ basement membrane เท่านั้น
- สานกันเป็น network เพื่อให้สารอื่นใน ECM มาเกาะติด และให้ความแข็งแรงช่วยค้ำจุน
- มีส่วนที่ไม่เป็นเกลียวแทรกกระจายในโมเลกุล มี globular domain ที่ปลาย

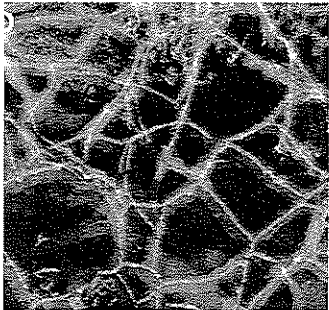
mutation ใน collagen type IV gene ทำให้เป็นโรคไต (alport syndrome) มีความผิดปกติของ Glomerular basement membrane



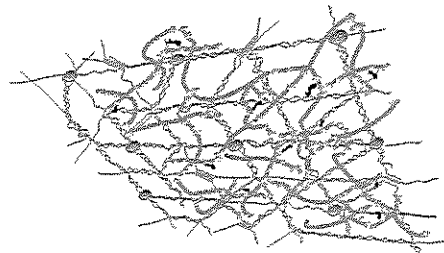
(c)

## collagen บางชนิดเป็น nonfibrillar collagen

- เมื่อกำจัด noncollagenous materials ออกจาก basement membrane จะพบโครงร่างที่เกิดจาก type IV collagen molecule มาเชื่อมกัน (covalently)



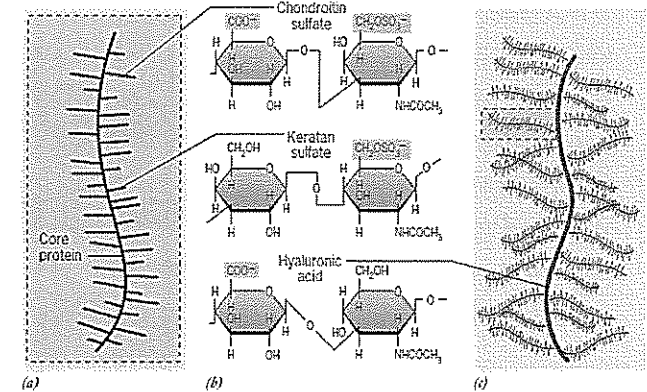
50 nm



A model for basement membrane scaffold (สีชมพูคือ type IV collagen)

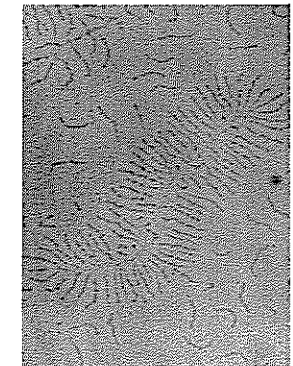
## proteoglycan

- ใน basement membrane และ ECM พบ protein-polysaccharide complex เรียก proteoglycan แต่ละ proteoglycan พบแกนโปรตีนที่มี glycosaminoglycans (GAGs) เกาะอยู่ มีประจุเป็นลบเพราะ sulfate และ carboxyl group
- proteoglycan ใน ECM อาจรวมเป็น complex ขนาดใหญ่โดยติดเข้ากับ hyaluronic acid (nonfulfated GAGs)



## proteoglycan

- จับ cation ได้ดี รวมถึงจับน้ำได้ดี
- ด้านแรงกด ทำงานร่วมกันได้ดีกับ collagen ที่ด้านแรงดึง และเป็น scaffold ให้ proteoglycan
- collagen และ proteoglycans ให้ความแข็งแรงและการป้องกันการเสียรูปแก่ cartilage และ ECM
- กระดูกแข็งพบ collagen และ proteoglycans เช่นกันแต่ความแข็งแรงเกิดจากการแทรกและสะสมของเกลือ calcium phosphate



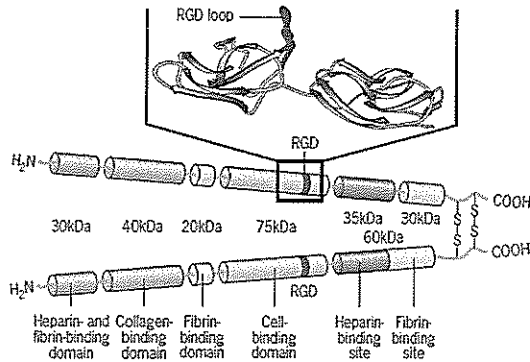
(d) 0.5 μm

A proteoglycan complex isolated from cartilage matrix

## Fibronectin

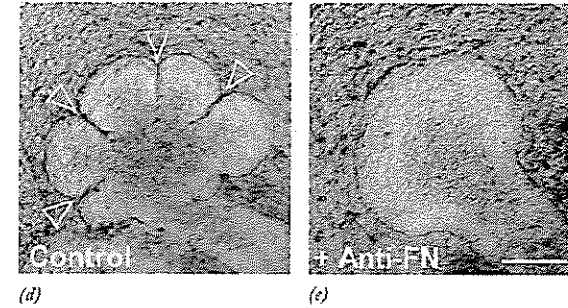
- polypeptide ใน fibronectin มีการพับตัวเป็น modules และรวมกันเป็น functional domains ต่างๆ
- เช่น cell binding site ที่เป็น module ของ arg-gly-asp หรือ RGD ทำหน้าที่จับกับโปรตีน integrin บนเซลล์ ทำให้เกิด signal transduction

- โมเลกุลของ fibronectin ประกอบด้วย polypeptide chain 2 สายที่คล้ายกันแต่ไม่เหมือนกัน



## Fibronectin

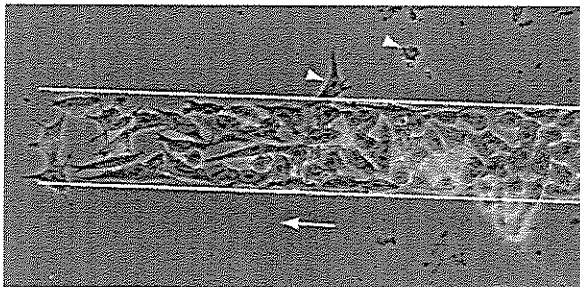
- ตำแหน่งสำคัญที่พบใน fibronectin:
  - Binding site ที่จับองค์ประกอบอื่นใน ECM เช่น collagen, proteoglycan
  - Binding site ที่จับ receptor บนผิวเซลล์



epithelial layer แบ่งเป็นร่องๆ ในการสร้างต่อมน้ำลาย

## Fibronectin

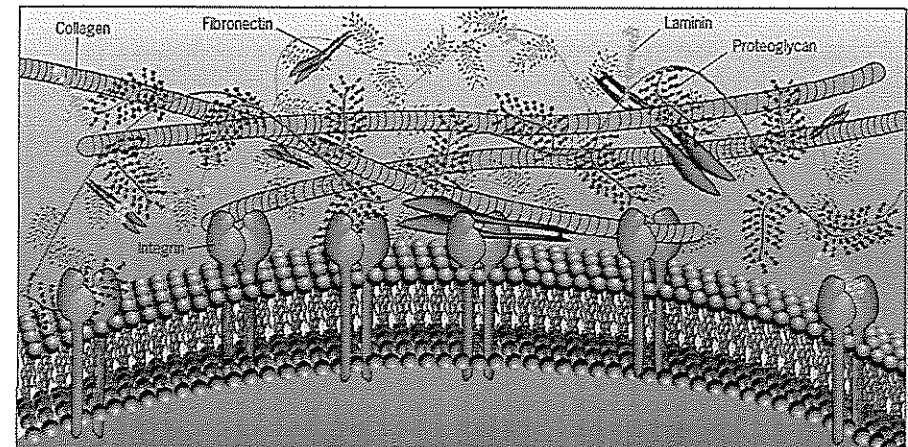
- ตำแหน่งสำคัญที่พบใน fibronectin:
  - Binding site ที่จับองค์ประกอบอื่นใน ECM เช่น collagen, proteoglycan
  - Binding site ที่จับ receptor บนผิวเซลล์



ในกระบวนการเจริญ เซลล์ต่างชนิดต้อง เคลื่อนที่ไปในเส้นทาง ต่างกัน

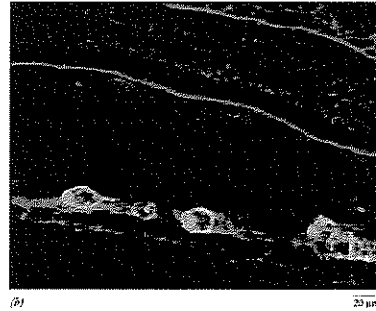
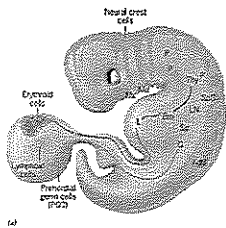
เซลล์เคลื่อนหาบริเวณที่มี fibronectin ซึ่ง guide migration

## Macromolecular organization of the ECM

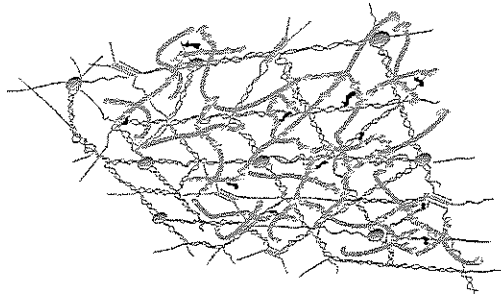


## Laminin

- เป็น ECM glycoprotein ประกอบด้วย 3 polypeptide ประกอบเป็นรูปร่างคล้ายไม้กางเขน
- มีบทบาทใน cell migration, cell growth และ cell differentiation
- Primordial germ cell เคลื่อนผ่านพื้นผิวที่มี laminin มากไปยังอวัยวะสืบพันธุ์ที่กำลังเจริญ
- Laminin นอกจากจับ cell-surface ได้ ยังจับ laminin โมเลกุลอื่นได้ จับ proteoglycan และองค์ประกอบอื่นใน ECM ได้



## A model of the basement membrane scaffold



- collagen – ชมพู
- laminin – เขียว
- collagen และ laminin network เชื่อมกันด้วยโปรตีน entactin
- โครงข่ายใน ECM ให้ความแข็งแรงและความยืดหยุ่นแก่ ECM

## Interactions of cell with ECM - integrin

- receptor family ที่มีบทบาทในการจับของเซลล์กับโมเลกุลใน ECM คือ integrin พบเฉพาะในเซลล์สัตว์
- ประกอบด้วย polypeptide 2 สาย ที่พาดผ่าน membrane:  $\alpha$  chain และ  $\beta$  chain แต่ละ subunit มี globular extracellular head และ leg ที่แทงผ่าน plasma membrane มีปลายเป็น cytoplasmic domain
- กิจกรรมหลักของ integrin: การจับของเซลล์กับพื้นผิว กับเซลล์อื่น และการส่งผ่านสัญญาณระหว่างสิ่งแวดล้อมกับภายในเซลล์ ในทั้งสองทิศทาง

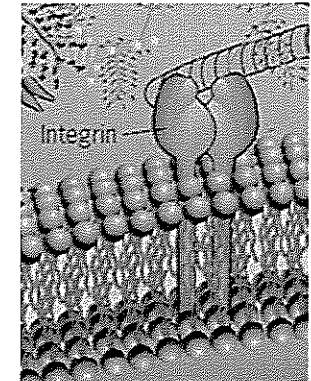


Table 7.1 Classification of Integrin Receptors Based on Recognition of RGD Sequences

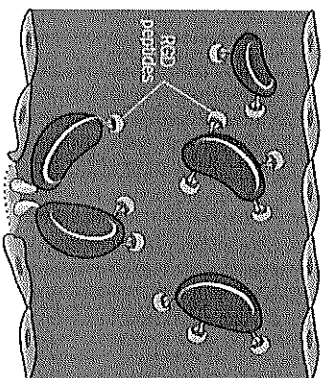
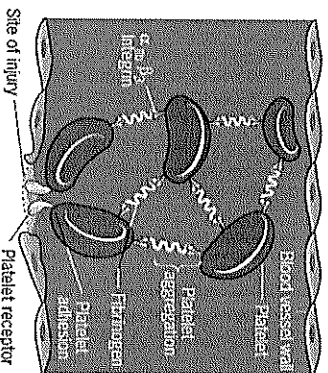
RGD Recognition		Non-RGD Recognition	
Integrin receptor	Key ligands	Integrin receptor	Key ligands
$\alpha_3\beta_1$	Fibronectin	$\alpha_1\beta_1$	Collagen
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	$\alpha_2\beta_1$	Collagen
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectin		Laminin
		$\alpha_3\beta_1$	Collagen
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibronectin		Laminin
	von Willebrand factor	$\alpha_4\beta_1$	Fibronectin
	Vitronectin		VCAM
	Fibrinogen	$\alpha_6\beta_1$	Laminin
$\alpha_v\beta_3$	Fibronectin	$\alpha_1\beta_2$	ICAM-1
	von Willebrand factor		ICAM-2
	Vitronectin	$\alpha_M\beta_2$	Fibrinogen
$\alpha_v\beta_5$	Vitronectin		ICAM-1
$\alpha_v\beta_6$	Fibronectin		

## RGD sequence

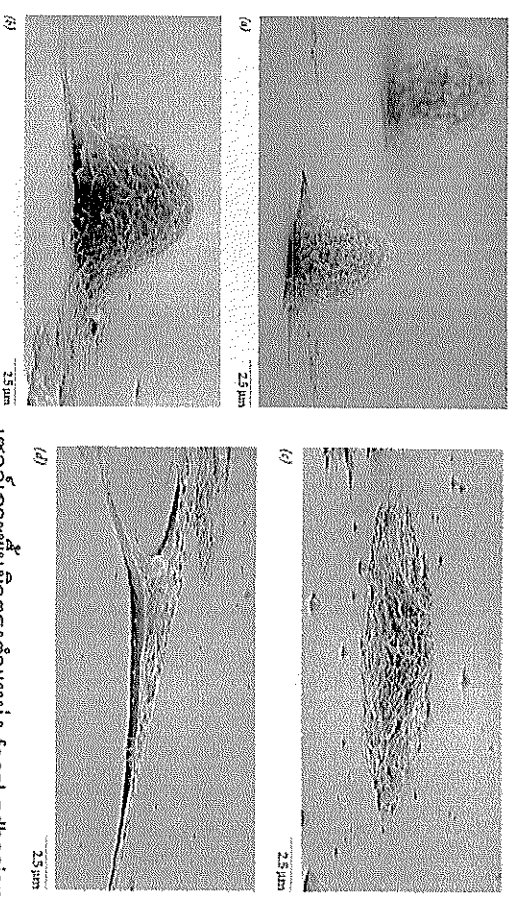
- Extracellular protein ที่จับ integrins ได้จะมี amino sequence arginine-glycine-aspartic acid (RGD)
- พบ tripeptide นี้ใน proteoglycan, fibronectin, laminin และ extracellular protein อื่น
- ความสนใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ RGD sequence ทำให้เห็นหนทางรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับ receptor-ligand interactions

## thrombus อาจยับยั้งได้โดยผ่านการยับยั้ง integrin

- เมื่อมีแผล platelets จะจับตัวกันมาอุดปากแผล แต่การจับตัวนี้หากเกิดในหลอดเลือดจะเป็นอันตราย — thrombus
- Peptide ที่จับ integrin ยับยั้งการจับกันของ platelets ได้

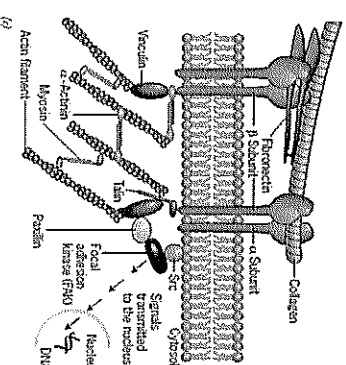
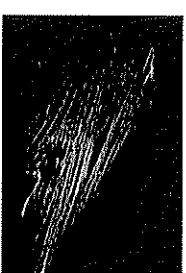


## การยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว



## Focal adhesion

- ที่ plasma membrane มี focal adhesion พบ integrin จำนวนมาก
- Cytoplasmic domain ของ integrin สามารถจับกับ adaptor protein หลายชนิดที่ช่วยเป็นสะพานในการจับระหว่าง integrin กับ cytoskeleton
- focal adhesions ทำให้เกิดการรับรู้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสิ่งแวดล้อม

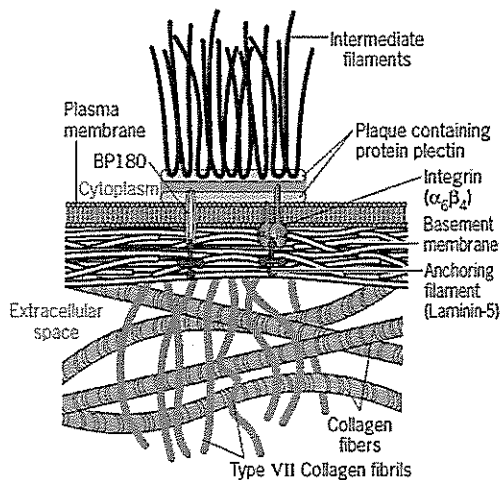




## Hemidesmosome

- การจับของเซลล์แน่นกับ ECM ในร่างกายแน่นที่สุด พบในการจับของ epithelial cell กับ basement membrane
- โครงสร้างที่ช่วยในการยึดเกาะคือ hemidesmosome
- hemidesmosome: แผ่นหนายู่ด้าน inner surface ของ cell membrane มี filaments แทะออกมาทาง cytoplasm
- filament ใน hemidesmosome เป็น filament หนา ประกอบด้วย keratin (filament ที่มี keratin เป็นองค์ประกอบ จัดเป็น intermediate filament)

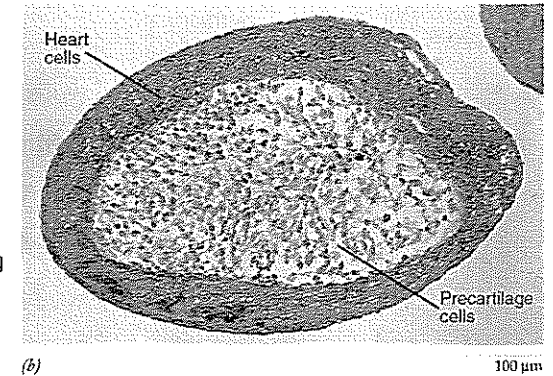
## Hemidesmosome



- Filament เชื่อมต่อกับ ECM โดยอาศัย integrin ที่พาดผ่าน cell membrane
- Integrin ส่งผ่านสัญญาณที่มีผลต่อรูปร่างและกิจกรรมของเซลล์ที่เกาะอยู่บน basement membrane
- Autoimmune disorder บางชนิด ร่างกายสร้าง antibody มาจับโปรตีนที่ hemidesmosome ทำให้ epidermis หลุดออก

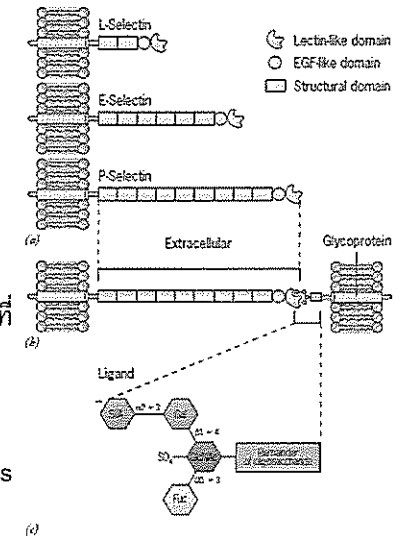
## การจับกันระหว่างเซลล์

- cell-cell recognition – เซลล์ที่ถูกทำให้แยกออกจากกันสามารถกลับไปจับกับเซลล์ชนิดเดียวกันได้
- Family หลักๆ ของ integral membrane protein ที่เกี่ยวข้องกับ cell-cell adhesion: selectins, immunoglobulin superfamily บางตัว, integrin บางตัว และ cadherins



## Selectins

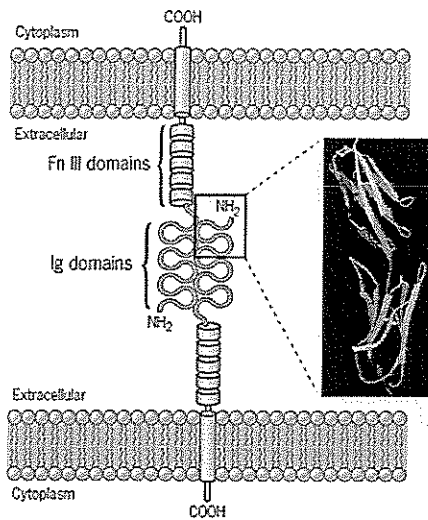
- เป็น family of integral membrane glycoprotein ทำหน้าที่จับน้ำตาลใน oligosaccharide ที่ยื่นออกจากผิวเซลล์ของเซลล์อื่น
- มี cytoplasmic domain, membrane spanning domain, extracellular segment ที่ปลายมี domain ที่ทำหน้าที่เป็น lectin
- E-selection – endothelial cells
- P-selectin – platelets และ endothelial cells
- L-selectin – leukocytes
- ทำให้ leukocyte จับ vessel wall ได้



(c)

การจับกับ ligand ต้องอาศัย calcium

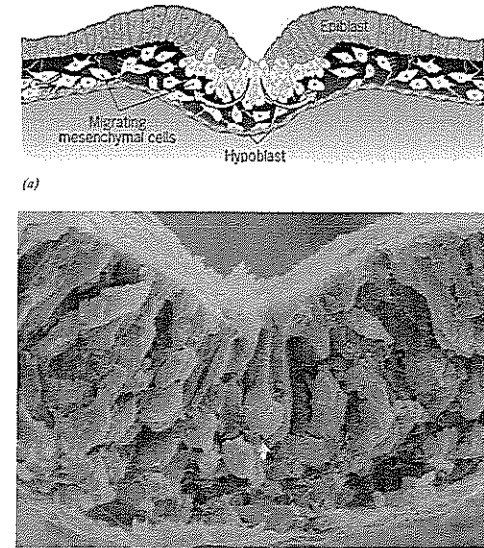
## Immunoglobulin superfamily (IgSF)



- สมาชิกส่วนใหญ่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน แต่บางตัวเกี่ยวข้องกับ calcium independent cell-cell adhesion ระหว่าง lymphocyte กับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น macrophage, lymphocyte อื่น หรือเซลล์เป้าหมาย
- พบว่ามีบทบาทกับ adhesion ระหว่าง nonimmune cell เช่นกัน

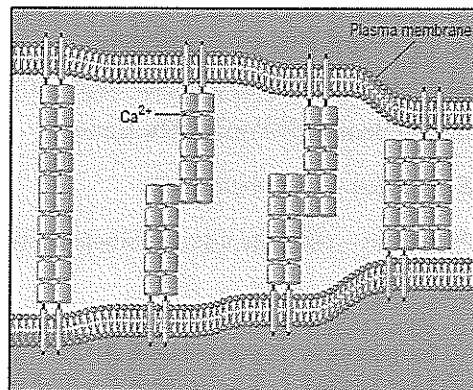
## Cadherins มีความสำคัญในการรวมเซลล์เป็นเนื้อเยื่อ

- การเปลี่ยนแปลงระหว่าง mesenchymal และ epithelial cell เกิดได้โดยการสลายและการสร้าง cadherins

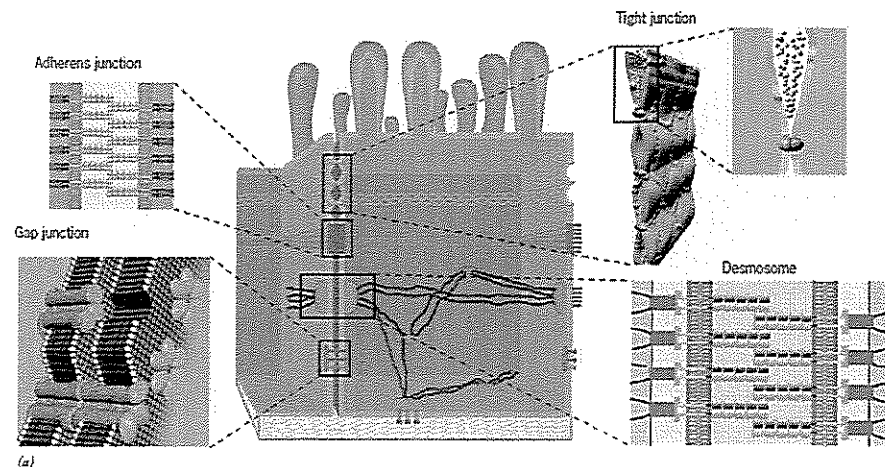


## cadherins

- Family ใหญ่ของ glycoprotein ที่เกี่ยวข้องกับ calcium dependent cell-cell adhesion และส่งสัญญาณจาก ECM ไปยัง cytoplasm
- มักทำให้เซลล์ชนิดเดียวกันจับกัน – cadherin ชนิดเดียวกันจับกัน
- ด้าน cytoplasmic domain พบโปรตีน catenin ที่ช่วยยึด cadherin และส่งสัญญาณให้ cytoplasm และ nucleus

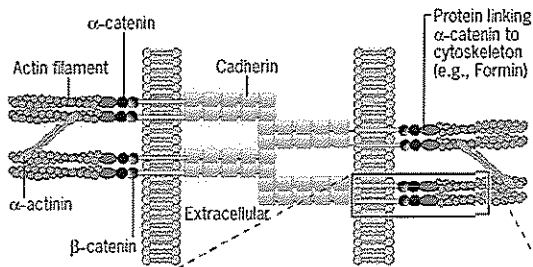


## Adherens junctions และ desmosomes ยึดเซลล์ให้ติดกับเซลล์อื่น

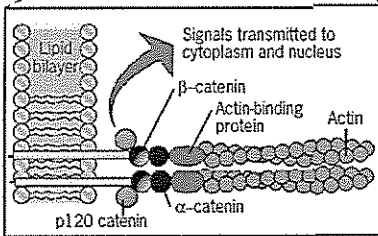


Junctional complex

## Adherens junction

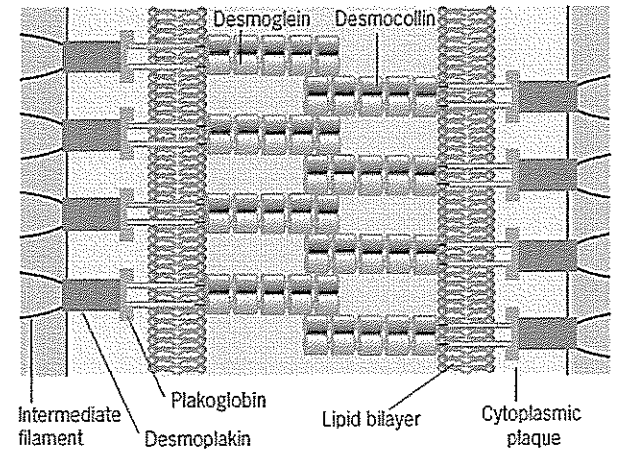


ส่งสัญญาณ  
จาก  
ด้านนอก  
เซลล์เข้าไป  
เซลล์



- พบทั่วไปในร่างกาย พบบ่อยที่ epithelium เป็นเสมือนเข็มขัดรอบเซลล์ คาดอยู่ที่ใกล้ด้าน apical
- เซลล์จับอยู่ด้วยกันโดยอาศัย calcium dependent linkage ระหว่าง extracellular domain ของโมเลกุล cadherin

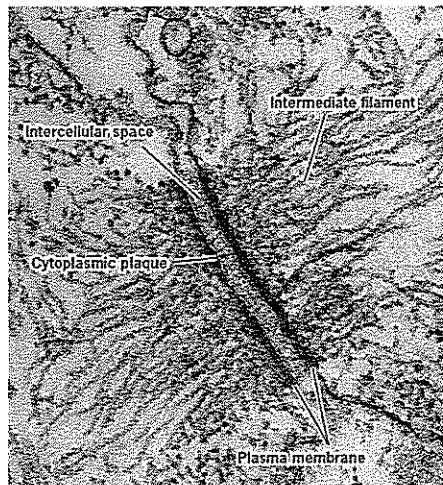
## Desmosomes



- ด้านในของ plasma membrane เป็นที่ยึดเกาะของ intermediate filament (คล้ายใน hemidesmosome)
- Desmosomes ให้ความแข็งแรงของเซลล์ทั้งหมดที่ยึดกันอยู่

## Desmosomes

- เป็น adhesive junction ที่มีรูปร่างเป็น disk พบในเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่พบบ่อยในเนื้อเยื่อที่ได้รับแรงเชิงกล เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ ชั้น epithelium ของผิวหนัง ปากมดลูก
- มี cadherin ซึ่งมี domain structure ต่างจาก cadherin ที่พบใน adherens junction เรียกว่า desmoglein และ desmocollin



## Transmembrane signaling

