

# HOOFSTUK 5: HET CYTOSKELET

## Introductie

Het **cytoskelet** voorziet de cel van vorm en interne structuur

- **functies:** interne organisatie, celvorm, organelbeweging, celbeweging en celdeling
- ontstaan door **polymerisatie van subunits**, associëren met eiwitten → diversiteit
  - o snelle **turnover** door (de)polymerisatie: sterkte en aanpasbaarheid
  - o cel is in staat snel te reageren op prikkels
- **tensionele integriteit:** dingen kunnen bestaan dankzij de spanning
- skelet: rigide connotatie ↔ allesbehalve! → dynamische aard is net essentieel
- 3 types van cytoskeletaire structuren
  - o **microtubuli** (24 nm) vangen hoofdzakelijk druk (stutten)
    - staan ook in voor organelbeweging en intracellulair transport
  - o **microfilamenten** (7-9 nm) hebben grote trekweerstand (draden)
    - staan ook in voor celvorm en celbeweging
  - o **intermediaire filamenten** (10-15 nm) qua krachtweerstand groot dynamisch bereik = trekresistentie (veren)

## Microtubuli

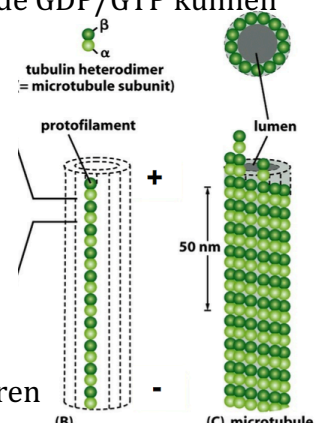
**Microtubuli** vormen de grootste groep cytoskeletaire structuren. Onderscheid in twee types:

1. **cytoplasmatische microtubuli:** staan in voor vorm van axonen, gepolariseerde cellen, spoelfiguur van delende cel, transport vesikels/organel
2. **axonemale microtubuli:** deel van het axonema van cilia en flagellen

## Structuur

**Cytoplasmatische microtubuli MT:** holle cilinders van 24 nm uit 13 parallelle protofilamenten

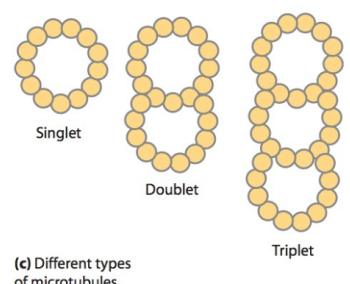
- **protofilament:** heterodimeer van  $\alpha$ -tubuline en  $\beta$ -tubuline die beide GDP/GTP kunnen binden
  - o alle protofilamenten in dezelfde richting → gepolariseerd (+ en - uiteinde)
- **singlet MT:** één volledig protofilament
  - o ook **doublet, triplet:** protofilament + 1 of 2 incomplete MT



## Polymerisatie

MT worden gevormd door **reversibele polymerisatie** van tubuline dimeren

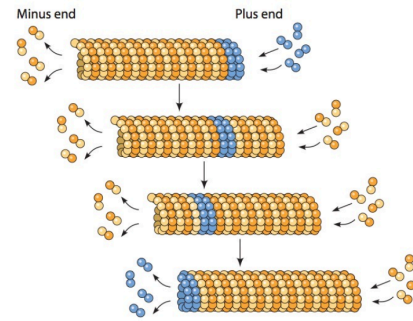
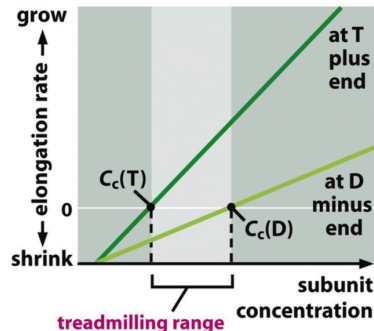
- polymerisatie gaat gepaard met hydrolyse van GTP
- **nucleatie:** vorming van MT oligomeren als kiem voor MT groei (traag)
- **elongatie:** daaropvolgende additie van subunits (snel)



(c) Different types of microtubules

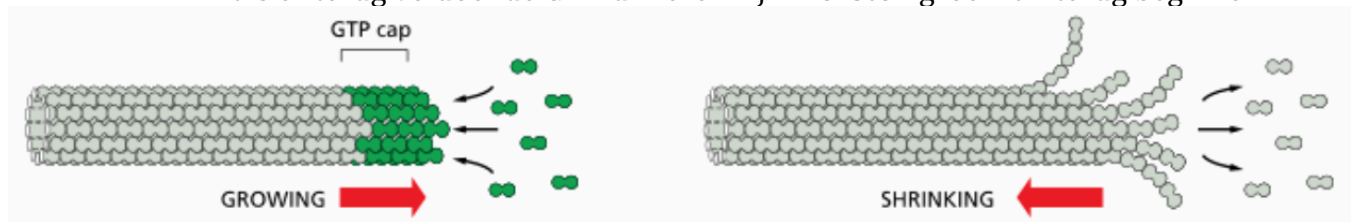
### Kritieke concentratie ( $C_c$ )

- in de **plateau fase**: concentratie subunits wordt limiterend: laat MT groei op zijn einde komen  
 → opbouw staat hier in evenwicht met afbraak  
 → MT groei als  $C > C_c$  en depolymerisatie als  $C < C_c$
- $C_c$  is hoger voor het - uiteinde dan voor het + uiteinde → + zijde groeit sneller aan
  - **treadmilling**: als  $C_c^- > C > C_c^+$  aanwas aan +, afbraak aan - → het lijkt alsof MT beweegt



### Dynamische instabiliteit

- elk heterodimeer bindt twee GTP moleculen: GTP op  $\beta$ -subunit wordt **gehydrolyseerd**
- het gevormde GDP-gebonden tubuline is te zwak voor polymerisatie
  - een eindstandige **cap** van GTP gebonden tubulines **verschafft** het filament **stabiliteit**
  - als concentratie van GTP tubulines vermindert  
 → groei vertraagt, maar hydrolyse van GTP gaat gewoon verder  
 → als enkel GDP gebonden tubulines overblijven: **catastrofe**: snelle depolymerisatie  
 → als er terug voldoende GTP-dimeren zijn: **herstel**: groei kan terug beginnen



**anti-mitotische drugs**: verstoren de spoelfiguren van delende cellen en blokkeren de mitose

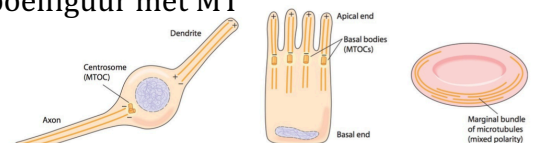
### Microtubuli-organiserende centra MTOC

Polymerisatie wordt sterk gecoördineerd en gelimiteerd tot bepaalde domeinen: **de MTOC**

- MTOC **initieert polymerisatie** en dient als **verankeringsplaats**
  - - uiteinde is verankerd: + uiteinde richting plasmamembraan  
 → meeste dynamiek gebeurt aan de periferie van de cel
- **centrosoom**: dierlijk MTOC, 2 loodrecht op elkaar staande centriolen
  - errond zit **pericentriolair materiaal**: bevat proteïnecomplexen uit  $\gamma$ -tubuline =  **$\gamma$ -tubuline ring complex** ( $\gamma$ -TuRC) die zorgt voor nucleatie van nieuwe MT
  - **centriool**: 9 paar triplet MT, ook in basaal lichaam van ciliën en flagellen

Distributie van MT wordt bepaald door MTOC & hangt samen met de celfunctie

- **Zenuwcellen**:
  - axonale MT met - uiteinde vast aan centrosoom
  - dendritische MT: niet gehecht aan centrosoom en gemengde polariteit
- **Gecilieerde epitheelcellen**: hebben verschillende MTOC's: de basale lichaampjes
- **Rode bloedcellen**: geen kern, noch MTOC → circulaire band van MT met gemengde polariteit
- **Mitotische cel**: centrosoom ontdubbelt → vorming van spoelfiguur met MT  
 → correcte verdeling van de chromosomen



## Microtubuli-bindende proteïnen

Naast stabilisatie in MTOC's is er ook **regulatie** door **regulatorische proteïnen**

- stabiliserend: langere maar minder dynamische MT  
destabiliserend: kortere, maar dynamischere MT
- **MAP's microtubuli-geassocieerde proteïnen** (stabiliserend)
  - o binden op regelmatige plaatsen
  - o faciliteren de interactie met andere filamenten en cellulaire structuren
  - o bvb. **Tau-proteïne** bundelt de microtubuli in axonen
    - overexpressie in niet-neuronale cellen: axon-achtige extensies
    - neurogeneratieve aandoeningen in verband met dysfunctionele Tau's
      - accumulatie van warrige neurofibrillaire draden (vb. Alzheimer)
- **+TIP proteïnen**: alternatieve stabilisatie: bindt de + uiteinden
- **destabiliserende proteïnen**
  - o **stathmine**: bindt de heterodimeren en weerhoudt hen van depolymerisatie
  - o **catastrofines**: werken in op de uiteindes van reeds gevormde MT
  - o **katanines**: verknippen MT

## Microfilamenten

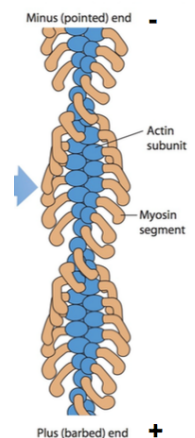
**Microfilamenten** zijn met hun diameter van 7 nm de fijnste cytoskeletaire filamenten

- gekend voor spiercontractie, ook essentieel in celvorm en -beweging
  - o **migratie** via lamellipodia en filopodia, **amoëboïde beweging** en **cytopl. stroming**
  - o celvorm via **cortex vlak** onder plasmamembraan, ook **microvilli**

## Structuur en voorkomen

**Microfilamenten** zijn polymeren van actine, klein U-vormig moleculen dat ATP/ADP kan binden

- actine: individueel (**G-actine**, globulair) of gepolymeriseerd (**F-actine**, filamenteus)
  - o F-actine: twee lineaire strengren rond elkaar gedraaid in een **helix**
  - o **gepolariseerd**: monomeren in dezelfde richting (- pointed end, + barbed end)
  - o twee groepen van actine
    - **spier-specifieke  $\alpha$ -actines**
    - **niet-spier  $\beta$ - en  $\gamma$ -actines**
      - $\beta$  vooral in voorste periferie of **leading edge**
      - $\beta$  vormt de filopodia, lamellipodia en ruffles
      - $\gamma$  is gelokaliseerd in **stress fibers**: contractiele bundels



## Polymerisatie

G-actine monomeren **polymeriseren** op reversibele wijze in microfilamenten

- eveneens gekenmerkt door  $C_c$ , lag-fase, exponentiële fase en plateau fase
- **versnelde dynamiek** aan het + uiteinde
- inbouw van ATP G-actine monomeren leidt tot **hydrolyse** van ATP naar ADP
  - het **groeïende** uiteinde bevat **ATP**-gebonden monomeren
  - ATP is hier geen vereiste voor polymerisatie (ADP G-actine kan ook MF vormen)
- **Treadmilling** is hier de dominante dynamiek

## Actine-bindende proteïnen reguleren stabiliteit en organisatie

Vorm van de protrusie (lamellipodia, filopodia) bepaald door type beweging en organisatie MF

- **lamellopodium**: actineprojectie op leading edge van de kruipende cel
- **filopodium**: zijn een extensie voorbij de leading edge in kruipende cellen
- **stress fibers**: vezels die cellen vastmaken aan onderliggend substraat (actine bundels)
- **cortex**: gelachtige substantie bestaande uit los actinenetwerk

→ gemeenschappelijk kenmerk: allemaal gevormd door **inwerking actine-bindende proteïnen**

### Tabel van regulerende proteïnen

Polymerisatie		zonder uitwendige factoren: groei MF enkel bepaald door cc. ATP G-actine
Thymosine	Inhibitie	thymosine bindt groot deel van G-actine → niet beschikbaar voor incorporatie
Profiline	Promotie	profiline werkt effect thymosine tegen en bevordert polymerisatie
Cofiline	Vrijstelling	cofiline zorgt voor versnelde vrijstelling van G-actine aan – uiteinde
MF afschermen (cappen)		capping proteïns voorkomen additie & verlies aan uiteinde → stabiliseren MF
CapZ	Capping	capZ is capping proteïne aan + uiteinde
Tropomodulines	Capping	tropomoduline is capping proteïne aan – uiteinde
MF crosslinken		actine filamenten vormen vaak een netwerk van onderling verbonden MF
Filamine of Spectrine	Crosslinken	filamine/spectrine zorgen dat cross-linking tot stand komt door eerst het netwerk te verbreken. Komt voor in RBC: donutvorm tot stand door celcortex → spectrine deficiëntie leidt to spherocytose (ipv donut een bolvorm)
MF knippen		sommige proteïnes verbreken netwerk om zachtere structuur te verkrijgen
Gelsolin	Knippen	gelsolin verknijpt netwerk en schermt + uiteindes af → niet beschikbaar voor polymerisatie
Bundelen		sommige MF (zoals in stress fibers) zijn sterk geordend in bundels
α-actinine	Bundeling	α-actinine stimuleert bundelvorming in focale adhesiepunten
Fascin		fascin stimuleert bundelvorming in filopodia
Fimbrin, Villin		fimbrin en villin stimuleert bundelvorming in microvilli van darmmucosa
MF met membranen verbinden		celbeweging: nood aan verbinding MF-membraan om kracht uit te oefenen
ERM	Membraan-aanhechting	eitrine, radixine en moesine ERM zorgen voor de verankering van spectrine-actine netwerk in cortex van RBC
Stimulatie van MF vertakking en groei		boomachtige dendritische vertakkingen
ARP2/3	Vertakking	ARP2/3 vormt door binding dendritische vertakkingen in lamellipodia
WASP	Vertakking	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein activeert ARP2/3, heeft invloed op structurele hervormingen in bloedplaatjes
Formine	Nucleatie	vormen dimeren die relatief tov elkaar kunnen verschuiven en polymerisatie bespoedigen → lange en onvertakte filamenten

Regulerende proteïnes

- complementaire functies voor verschillende eiwitten
- tegengestelde invloed op turnover snelheid

## Celsignalisatie stuurt MF polymerisatie

→ **Signaaltransductie** bepaalt de activiteit van de regulerende proteïnen

### Inositol fosfolipiden

- rekruteren actine-bindende proteïnen naar het membraan
- bv CapZ zal verwijderd worden van MF-uiteindes → terug polymeriseren → turnover verhoogt

### Rho GTP-asen

- groeifactoren induceren dramatischer cytoskeletaire wijzigingen
- familie Rho GTP-asen (Rho, Rac en Cdc42)
  - o Rho induceert stress fibers, Rac lamellipodia en Cdc42 filopodia

# Intermediaire filamenten

**Intermediaire filamenten IF** (10-15 nm) zorgen voor verdeling van trekkrachten binnen de cel  
Unieke eigenschappen die hen onderscheiden van MT en MF

- biochemisch veel heterogener
- vezelachtig in plaats van globulair
- grote trekweerstand
- geen intrinsieke polariteit
- geen transportfunctie
- geen specifieke interactie met motoreiwitten
- lagere uitwisselingssnelheid → stabiel

## Structuur en voorkomen

Het **intermediair filament** bestaat uit

- een goed geconserveerd **centraal staaf-domein** uit **4** segmenten van opgewonden **helices**  
→ helices verbonden door **linkers**
- basiseenheid: **coiled coil** van 2 IF proteïnen parallel gealigneerd  
→ 2 coiled coils aligneren lateraal en antiparallel → vormen **tetrameer protofilament**  
→ protofilamenten interageren lateraal en longitudinaal → **vezelachtige structuur**  
→ **vezelachtige** structuur bestaat uit **8 protofilamenten** in beide richtingen

Grote weefsel specificiteit: laat toe ze te gebruiken als merker, bv. voor tumordiagnostiek

Kl.	Type IF	Weefsel	Functie
I	Zure keratines*	Epitheelcellen	Mechanische sterkte
II	Basische keratines*	Epitheelcellen	Mechanische sterkte
III	Vimentine	cellen van mesenchymale oorsprong, fibroblasten, oog lens	celvorm
	Desmine	sommige neuronen	structurele ondersteuning voor spiercontractie apparaat
	GFA proteïne	Gliacellen en astrocyten	celvorm
IV	Neurofilament proteïnes (NF-L, -M, -H)	neuronen	axon grootte en sterkte
V	Nucleaire lamines Lamin A/C, B1 en B2	binnenzijde van kernmembraan van gedifferentieerde cellen	kernvorm, genregulatie
VI	Nestine*	neurale stamcellen & oog lens proteïne	?

\* **keratine**: tonofilamenten in epitheelcellen die lichaamsopp. bedekken en -holtes aflijnen

\* **nestine**: speciaal neurofilament in embryonaal zenuwweefsel

## IF geven weefsels en cellen mechanische sterkte

IF komen vaak voor in cellulaire regio's die onder mechanische stress staan

- spanningsdragende rol (dit kan ook met de grote trekweerstand van IF)

**mutatie** in keratines → ernstige blaarziekten

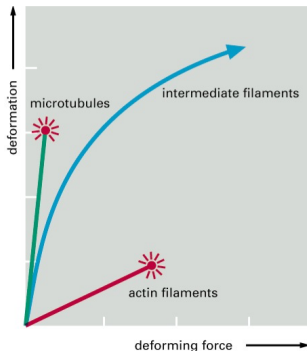
- cellen scheuren door mechanisch trauma en keratine klontering

**nucleaire lamines**: filamenteus netwerk aan de lamina van de interfase celkern (weerstand)

- A-type lamines geeft kern rigiditeit: afwezigheid → afwijkende vorm (bv. in granulocyten)
- lamines ondergaan additie van farnesyl: B1 en B2 behouden deze, maar A niet  
→ **Progeria**: mutatie in LMNA-gen → knipregio verdwijnt en farnesylgroep blijft bewaard

# Cytoskelet is een mechanisch geïntegreerd geheel

**plakines:** deze 'linker proteins' regelen de **mechanische integratie van de drie** (MT, MF en IF)  
→ **integratie:** cel moet weerstaan aan buigkrachten (MT), moet spanning kunnen verschaffen via contractiele elementen (MF) en moet elastisch zijn & weerstaan aan trekkrachten (IF)



## Take-home messages

- Er zijn **3 types cytoskeletaire structuren** met kenmerkende diameter, intracellulaire distributie en mechanische eigenschappen: microtubuli, microfilamenten en intermediaire filamenten.
- Alle cytoskeletaire structuren ontstaan door **polymerisatie**.
- Microtubuli en microfilamenten zijn **gepolariseerd** en heel dynamisch. **Dynamische instabiliteit** komt vaakst voor bij **microtubuli**, **treadmilling** vaker bij **microfilamenten**. (De-)polymerisatie kinetiek wordt gemoduleerd door regulatorische proteïnen.
- Microtubuli worden georganiseerd vanuit een **MTOC** en staan in voor **organelbeweging** en **intracellulair transport**.
- Microfilamenten staan in voor celvorm en -beweging. Lokale reorganisatie van het actine cytoskelet wordt onder meer gestuurd door **Rho GTPasen**.
- Intermediaire filamenten hebben een grote trekweerstand, zijn **weefsel specifiek** en zeer stabiel. Ze geven cellen mechanische sterkte.
- Alle cytoskeletaire filamenten zijn met elkaar verbonden via **linkers**.