**CELBIOLOGIE HOOFDSTUK 12: Het cytoskelet**

1. introductie

* Cytoskelet functie:
  + Interne organisatie en structuur
  + Celvorm behouden
  + Organelbeweging
  + Celbeweging
  + Celdeling
* 3 verschillende types filamenten:
  + **Microtubuli** (24nm)
    - organelbeweging en intracellulair transport
    - holle buizen
    - = de stokken
  + **Microfilamenten** (7-9nm)
    - celvorm en celbeweging
    - = de draden
  + **Intermediaire filamenten** (10-15nm)
    - Trekresistentie
    - = de veren
* Alle filamenten zijn polymeren:
  + Alle filamenten ontstaan door polymerisatie van subunits
    - Modulair: filamenten zijn opgebouwd uit monomeren
  + Snelle turnover door (de)polymerisatie
    - Afbraak en opbouw monomeren -> polymeer
  + Protofilamenten
  + Sterkte en aanpasbaarheid
* Verschillende planten toxines interfereren met polymerisatie
  + Kunnen polymerisatie en depolymerisatie teweeg brengen

2. Polymerisatie kinetiek

2.1 Polymerisatie in vitro

* MT worden gevormd door polymerisatie van tubiline dimeren
  + Wordt in vitro bestudeerd = 0°C = alles ligt stil
* Polymerisatie
  + Temperatuur verhogen
  + Stap 1: nucleatie
    - = vorming van MT oligomeren die als kiem dienen voor MT groei
      * lag fase => gebeurt zeer traag!
  + Stap 2: elongatie
    - = additie van subunits aan beide uiteinden
      * Zeer snel (exponentieel)
  + Stap 3: plateau fase
    - = MT opbouw in evenwicht met afbraak
    - Hierbij wordt de kritieke concentratie Cc bereikt
* Kritieke concentratie Cc (kritieke concentratie) bepaalt filamentvorming (equilibrium on/off)
  + Kritieke concentratie = concentratie waarbij plateau fase wordt bereikt
    - MT groeien/polymeriseren wanneer concentratie hoger is dan Cc
    - MT depolymeriseren als concentratie lager is dan Cc
  + De Cc is hoger voor – uiteinde dan voor + uiteinde
    - 5x snellere groei aan + uiteinde
* GTP hydrolyse in polymeer vermindert stabiliteit
  + GDP = zwakker -> zal voor afbraak zorgen
  + GTp = sterker -> zal voor opbouw zorgen

2.2.2 Polymerisatie in vivo

* Treadmilling (filamenten)
  + = wanneer de concentratie tubuline subunits groter is dan de Cc+, maar kleiner dan de Cc-
    - Cc- > C > Cc+
    - Dan opbouw aan + uiteinde en afbraak aan – uiteinde
    - Lijkt alsof MT voortbeweegt
  + = een ogenschijnlijke verplaatsing vh filament
  + 5x sneller aan – uiteinde
  + ATP/GTP hydrolyse wordt versneld in het polymeer
* Dynamische instabiliteit/dynamic instability (tubuli/filament)
  + = discrete fases van verlenging (rescue) en verkorting (catastrophe)
  + = de groeiende MT heeft een eindstandige cap van GTP gebonden tubilines
    - GTP aan cap verschaft stabiliteit aan het filament = stabiel
    - Achterliggende delen bestaan uit GDP gebonden tubuline = onstabiel/zwak
  + Werking
    - Wanneer de conc GTP gebonden dimeren daalt
      * Verdwijnt de cap
      * Vertraagt de groei, maar gaat de GTP hydrolyse verder
      * Uiteinde ontstaat met enkel GDP = onstabiel -> depolymersiatie
        + = catastrophe = snelle retractie
    - Wanneer terug genoeg GTP dimeren
      * Uiteinde groeit terug
        + = rescue =herstelfase
  + Conformationele verschillen tussen GTP en GDP gebonden tubuline

3. Microtubuli

3.1 Structuur

* Microtubuli (M)
  + = holle cilinder van 24nm
  + Opgebouwd uit 13 parallelle protofilamenten = singlet
    - Doublet/triplet = 1 volledig 13-protofilament + 1 of 2 incomplete MT
  + Basiseenheid v/e protofilament = heterodimeer van α-, β-tubuline
    - α-, β-tubuline heterodimeer binden beide GTP/GDP = energiecarriers!
      * GDP = zwakker
    - Alle heterodimeren in zelfde richting -> gepolariseerd: + en – uiteinde!
  + Conclusie: MT bestaan uit tubuline heterodimeren

3.2 Microtubuli-organiserend centra (MTOC)

* MT-organiserende centra (MTOC)
  + Coördineert de MT polymerisatie
  + Initieert MT vorming
  + Dienst als verankeringsplaats voor 1 vd uiteindes
* Centrosoom > centriolen > γ-tubuline ring complex
* Centrosoom
  + = een MTOC
  + Bestaat uit 2 loodrechte centriolen (microtubuli)
    - Centriolen omgeven door een γ-tubuline ring complex (γ-TuRC)
      * γ-tubuline zorgt voor nucleatie van nieuwe MT aan – uiteinde
    - Centriolen bestaan uit 9 paar triplet MT
    - Centriolen worden teruggevonden in het basaal lichaam van flagella en cilia
* MT zitten met hun – uiteinde verankerd aan MTOC en groeien met + uiteinde naar plasmamembraan

3.3 Microtubuli bindende eiwitten reguleren stabiliteit en organisatie

* Stabiliteit vd MT in cel wordt geregeld door hele reeks regulerende proteïnen met
* Proteïnen:
  + Stabiliserende functie
    - Zorgen voor langere, maar minder dynamische MT
    - Vb: MAPS = microtubuli geassocieerde proteïnen
      * Binden op MT en faciliteren interacties -> stabiliteit
  + Of destabiliserende functie
    - Vb: catastrofines -> kinesine 13
      * Werken in op de uiteindes van de MT
* (De)stabilisatie reguleert lengte en dynamiek
  + Stabiel: lange maar minder dynamische MT
  + Onstabiel: korte maar meer dynamische MT
* Overexpressie van Tau proteïne induceert neuron-achtige cytoplasmatische extensies in non-neuronale cellen
  + Dysfunctioneel Tau veroorzaaky dus verzwakking vd MT in de neuronen
  + Hierdoor verschillende neurodegeneratieve aandoeningen
  + Vb: ziekte van Alzheimer (destabilisatie)

4. Microfilamenten

4.1 Structuur en voorkomen

* Microfilamenten
  + 7 nm breed
    - fijnste cytoskeletaire filamenten
  + Rol in celvorm, beweging, spiercontractie
* Structuur
  + MF zijn polymeren van actine
  + G-actine
    - = individuele vorm
    - Bindt ATP/ ADP
  + F-actine
    - = gepolymeriseerde vorm
    - Bestaat uit 2 strengen in elkaar gedraaid als helix
    - Alle ingebouwde monomeren in zelfde richting -> ook gepolariseerd
      * Gepolariseerd: + en – uiteinde (gevisualiseerd door myosine decoratie)
* Conclusie: microfilamenten bestaan uit actine monomeren
  + F-actine > G-actine

4.2 Polymerisatie

* Turnover gekenmerkt door Cc en treadmilling
  + Lag-fase, exponentiële fase en plateau fase
  + Polariteit zorgt voor versnelde dynamiek aan + uiteinde
* Actine assembleert in verschillende microfilamentstructuren (3 structuren):
  + Stress fibers
    - Contractiele bundels
    - Cellen hangen sterk vast aan het onderliggende substraat
    - Exp: worden vb gevormd als men een cel laat groeien in een fles
      * Substraat glas = hard -> stress!
  + Cortex en lamellipodia
    - Gel-achtig netwerk
  + Filopodia
    - Dense parallelle bundels
* Er zijn verschillende proteïnen die interfereren met de polymerisatie

4.3 Actine-bindende eiwitten reguleren stabiliteit en organisatie

* De 3 structuren (stressfibers, cortex,…) worden gevormd door inwerking van verschillende actine-bindende proteïnen
  + Proteïnen veranderen de morfologie/ stabiliteit
  + Vb: capping proteïnes
    - Voorkomen additie en verlies aan uiteinde -> stabiliseren het filament
    - Zie grafiek: rico = verlaagt
  + Vb: ARP2/3 complex
    - Veroorzaakt boom-achtige netwerken (scharnieren) in lamellipodia
      * Door de binding van ARP2/3
      * ARP2/3 wordt zelf geactiveerd door WASP protein
    - Patiënten zonder WASP
      * Stollingsproblemen
* Complementaire functies voor verschillende eiwitten
* Tegengestelde invloed op turnover snelheid
  + Zie grafieken
  + Proteïnen verhogen de kinetiek -> rico = groter
  + Andere proteïnen stabiliseren filamenten -> rico = kleiner (vlakker)

4.4 Celsignalisatie stuurt gelokaliseerde polymerisatie

* Actine bindende eiwitten reguleren type actine structuur dat gevormd wordt
  + Signaaltransductie bepaald de activiteit van deze proteïnes
* Membraanlipiden en membraanverankerdes spelen rol als GTPasen
  + Inositol-fosfolipiden
    - = signaalmolecule
    - bindt met actine-bindende proteïnen -> hierdoor worden ze naar het membraan gerekruteerd (membraanrekrutering)
  + Rho GTP-asen (Rac, Cdc42, Rho)
    - Wanneer cellen blootgesteld aan groeifactoren -> wijzigingen
      * Rho GTP-asen sturen deze re-organisatie
    - Elk Rho-GTP ase heft een specifiek effect op het actine cytoskelet
      * Rho -> induceert stressfibers
      * Rac -> lamellipodia
      * Cdc42 -> filopodia
    - Zie experiment

5. Intermediaire filamenten

* Intermediaire filamenten
  + Diameter tussen 10-15 nm
  + Trekresistentie/ trekweerstand
* Unieke eigenschappen:
  + Biochemisch heterogener
  + Vezelachtig i.p.v. globulair
  + Grote trekweerstand
  + Geen intrinsieke polariteit
  + Geen transportfunctie
  + Geen interactie met motor proteïnes
  + Lagere uitwisselingssnelheid -> stabiel

5.1 Structuren en voorkomen

* Unieke eigenschappen IF:
  + Biochemisch heterogener
  + Vezelachtig i.p.v. globulair
  + Grote trekweerstand
  + Geen intrinsieke polariteit
  + Geen transportfunctie
  + Geen interactie met motor proteïnes
  + Lagere uitwisselingssnelheid -> stabiel
* Intermediaire filamenten (IF)
  + 10-15nm diameter
  + Grote trekweerstand
    - Stabiel
    - Zie grafiek: breekt niet -> MT en MF breken wel
  + = draadachtig filament
    - Bestaat uit 8 protofilamenten
  + 2 monomeren in parallelle coiled-coil
  + 2 dimeren in verschoven antiparallelle tetrameren
  + Geen polariteit, geen nucleotide bindende site
  + Samenvatting:
    - Intermediare filamenten bestaan uit filamenteuze proteïnen
    - <-> MT en MF
      * Niet gepolariseerd
      * Geen ENcarrier
      * IF is veel stabieler door de trekweerstand
    - = MT en MF
      * Bestaat uit polymeren/ monomeren
* IF kennen een sterke weefselspecififteit
  + IF typing mogelijk omwille van weefselspecificiteit
    - Vb: in tumordiagnostiek
      * Aanwezigheid in een kankercel van IF kan gebruikt worden om oorsprong vd kankercel te bepalen en om uitzaaiing vh tumorweefsel vast te stellen
    - Vb: als IF in weefsel voorkomt waar het moet = OK
      * Als IF in weefsel voorkomt waar het niet hoort = signaal, niet OK

5.2 IF geven weefsels en cellen mechanische sterkte

* IF hebben grote trekweerstand -> kunnen buigen ipv breken
  + Komen vaak voor in celregio’s onder mechanische stress
* Keratines (=IF) geven cellen mechanische sterkte
  + Keratines vormen gecross-linkede netwerken (via disulfidebruggen)
  + Komen vaak voor in huid, nagels, haar en celverbindingen
  + Keratines geven cellagen mechanische weerstand
  + Disruptie (mutaties) van keratines veroorzaakt ernstige blaarziekten
    - Mutaties verzwakkende epidermale cellen -> cellen breken easy hierdoor -> aanleiding tot blaarziektes
  + Cellen scheuren door mechanisch trauma en keratine klontering
* Lamines (=IF) geven celkernen mechanische sterkte
  + Lamines zijn type V nucleaire intermediaire filamenten
  + Vormen de nucleaire lamina
    - Nucleaire lamina geven de kern weerstand tegen mechanische stress
  + Bepalen kernvorm en plasticiteit
  + Afwezigheid van lamines
    - Leidt tot kernen met verhoogde plasticiteit en afwijkingen
* Vb: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome
  + Premature veroudering (gemiddelde sterfte rond 13jaar)
  + Aantasting nucleaire morfologie
  + HGPS is geassocieerd met accumulatie gefarnesyleerd lamine A (**progerine**)
  + Farnersyltransferase inhibitoren (FTI) voorkomen accumulatie en herstellen kernvormen
  + Essentie
    - verkeerde opbouw van lamines -> kern vd cel is vervormd -> syndroom

6. Het cytoskelet is een mechanisch geintegreerde structuur

7. Kernpunten

* 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 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 weefselspecifiek en zeer stabiel. Ze geven cellen mechanische sterkte
* Alle cytoskeletaire filamenten zijn met elkaar verbonden via linkers