

Cytoskelet a jaderná matrix

A fluorescence microscopy image showing several cells. The cytoskeleton is stained in red, forming a dense network of filaments. The nuclei are stained in blue, and the nuclear matrix is stained in green. The cells are interconnected, with some showing prominent actin stress fibers.

Eva Bártová

Biofyzikální ústav AV ČR Brno

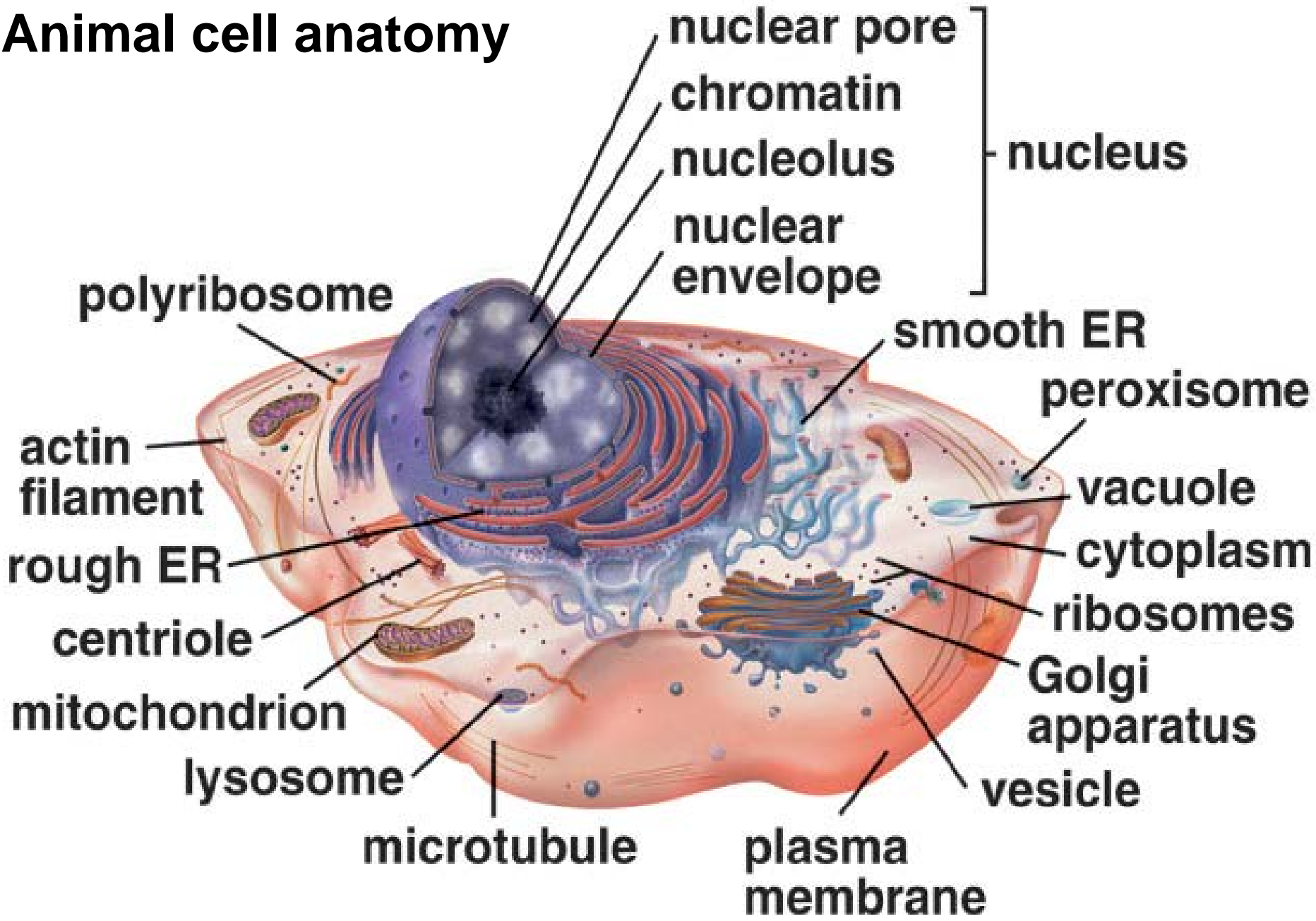
Eukaryotic Cells

All cells are surrounded by a *plasma membrane* made of phospholipids and proteins.

Eukaryotic cells have membrane bound intracellular organelles.

The most prominent is the *nucleus* that controls the workings of the cell.

Animal cell anatomy



Eukaryotické buňky jsou charakteristické velkou morfológickou variabilitou. Tvar buněk je závislý na komplexu sítí proteinových filament, které se rozpínají cytoplasmou. Tato síť filament se nazývá **CYTOSKELET**. Protože je cytoskelet zodpovědný za buněčný pohyb, mohl by se rovněž nazývat cytomusculaturou.

CYTOSKELET SE JEVÍ JAKO ZÁSADNÍ BUNĚČNÝ FAKTOR, KTERÝ HRAJE DULEŽITOU ÚLOHU V EVOLUCI BUNĚK

ODLIŠNÉ AKTIVITY CYTOSKELETU JSOU ZÁVISLÉ NA TŘECH TYPECH PROTEINOVÝCH FILAMENT:

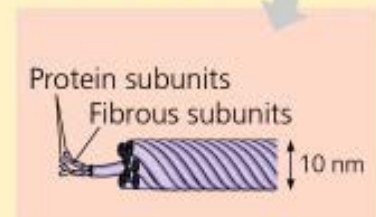
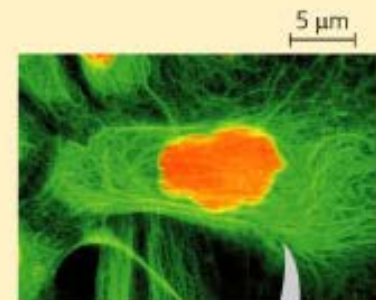
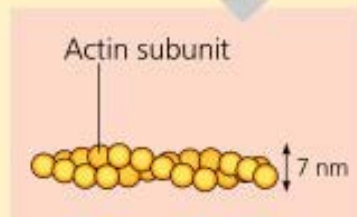
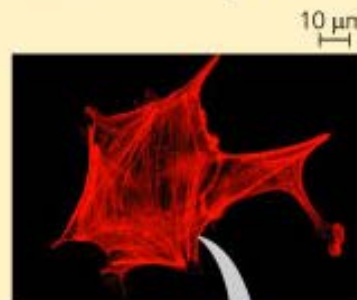
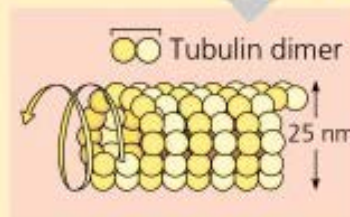
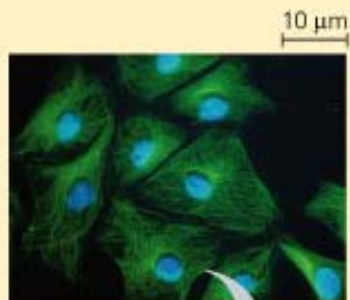
A) AKTINOVÁ FILAMENTA (aktin)

B) MIKROTUBULY (tubulin)

C) INTERMEDIALNÍ FILAMENTA (vimentin, lamin)

Table 7.2 The Structure and Function of the Cytoskeleton

Property	Microtubules	Microfilaments (Actin Filaments)	Intermediate Filaments
Structure	Hollow tubes; wall consists of 13 columns of tubulin molecules	Two intertwined strands of actin	Fibrous proteins supercoiled into thicker cables
Diameter	25 nm with 15-nm lumen	7 nm	8–12 nm
Protein subunits	Tubulin, consisting of α -tubulin and β -tubulin	Actin	One of several different proteins of the keratin family, depending on cell type
Main functions	Maintenance of cell shape (compression-resisting “girders”) Cell motility (as in cilia or flagella) Chromosome movements in cell division Organelle movements	Maintenance of cell shape (tension-bearing elements) Changes in cell shape Muscle contraction Cytoplasmic streaming Cell motility (as in pseudopodia) Cell division (cleavage furrow formation)	Maintenance of cell shape (tension-bearing elements) Anchorage of nucleus and certain other organelles Formation of nuclear lamina



SOURCE: Adapted from W. M. Becker, L. J. Kleinsmith, and J. Hardin, *The World of the Cell*, 4th ed. (San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2000), p. 753.

Eukaryotické buňky jsou tvořeny biliony proteinových molekul, které tvoří přibližně 60% buněčné masy. Existuje 10 tisíc typů proteinů, které vykazují svoji specifickou funkci.

A1) AKTINOVÁ FILAMENTA (mikrofilamenta)

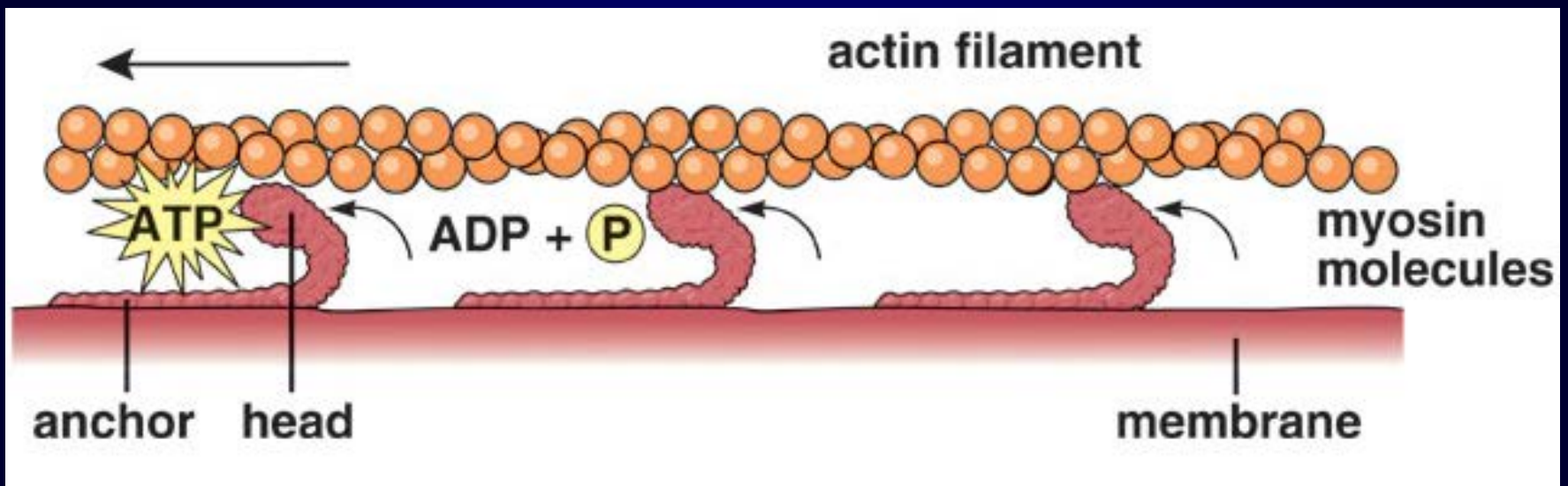
jsou dvoustranné helikální polymery tvořené proteinem aktinem. Jeví se jako flexibilní struktury s průměrem 5-9nm. Jsou organizovány do dvoudimenzionálních sítí. Jsou roztaženy po celé buňce, ale nejvíce jsou roztaženy v kortexu, těsně pod plasmatickou membránou.

B2) MIKROTUBULY

Jsou tvořeny tubulinem, který je uspořádán do dutých cylindrů. Mají průměr 25nm. Mají schopnost rychle se smršťovat a natahovat. Jsou rigidnější než aktinová vlákna. Jedna část mikrotubulů se dotýká tzv. centra organizujícího mikrotubuly (MTOC), které se nazývá CENTROZOM. Centrozomy jsou polární struktury s + a – koncem, jsou schopné rychlého růstu. Několik stovek mikrotubulů vybíhá z centrosomu tak že mohou dosahovat mnoho mikronů. + konec mikrotubulů se tak dotýká kraje buněk.

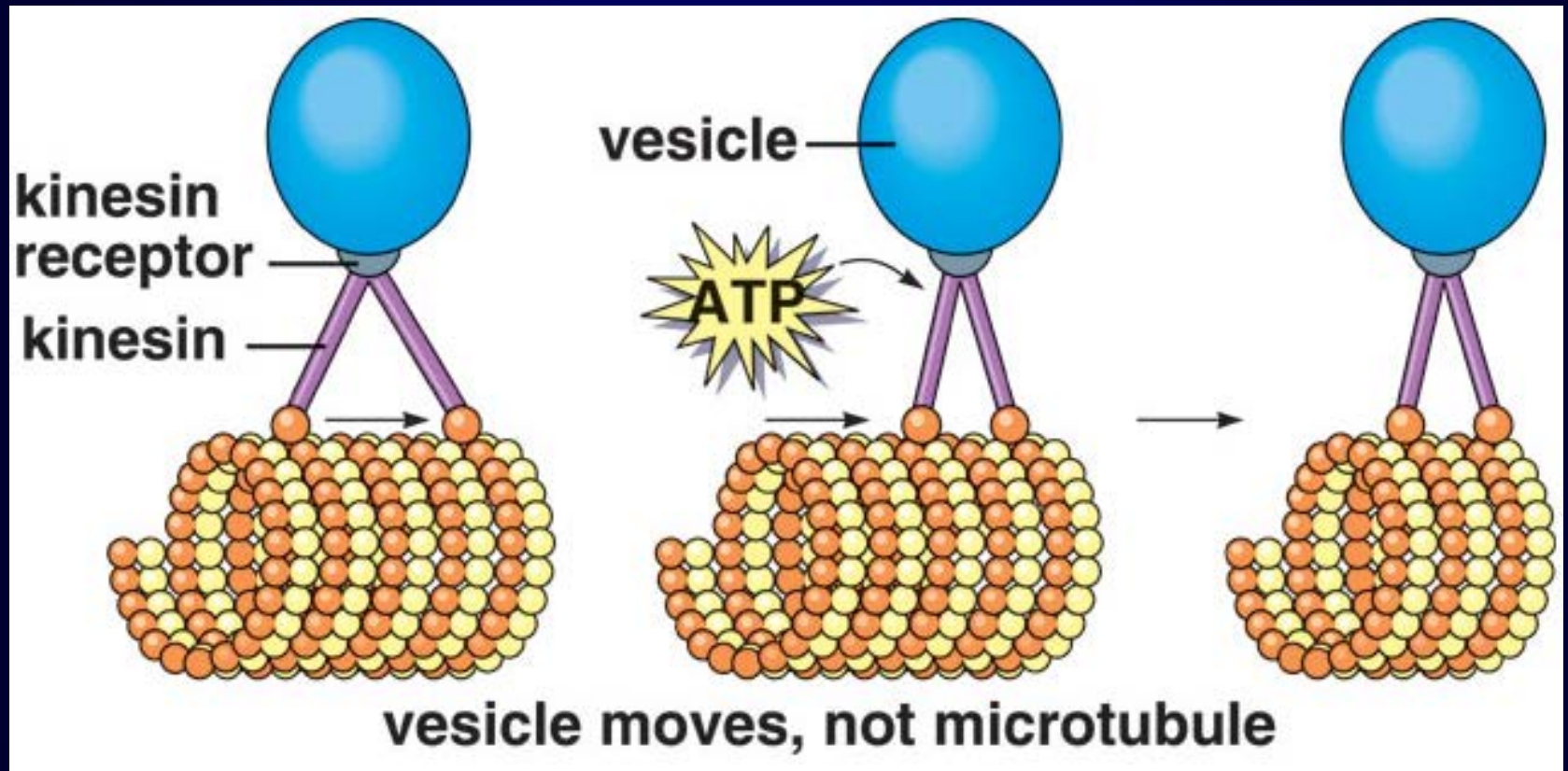
Actin filaments occur in bundles or mesh-like networks.

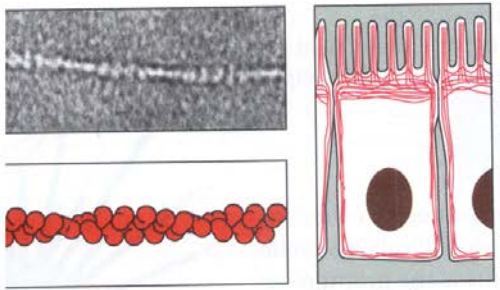
Actin filaments play a structural role in intestinal microvilli and also interact with motor molecules, such as myosin.



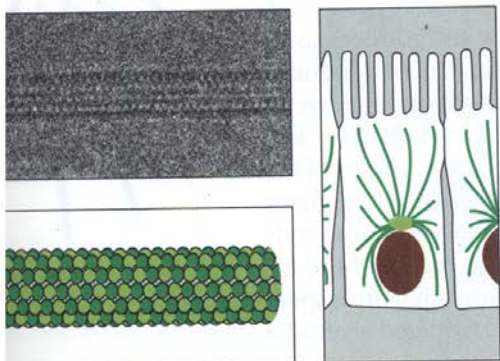
Microtubules are small hollow cylinders made of the globular protein ***tubulin***.

Microtubules help maintain the shape of the cell and act as tracks along which organelles can move.

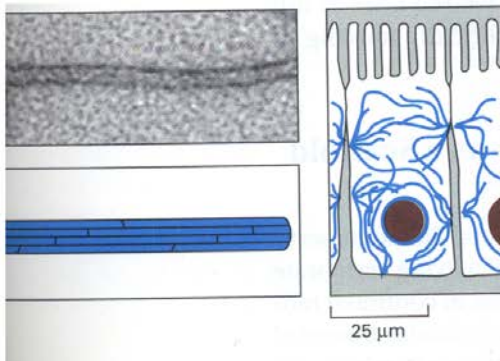




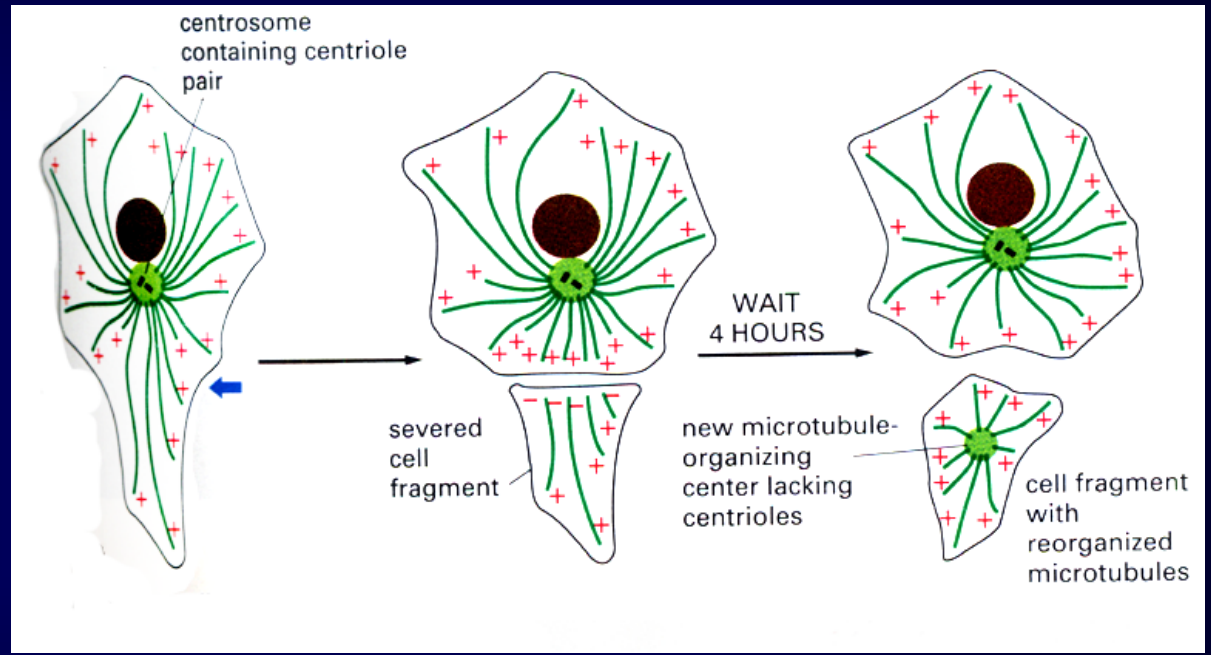
25 μm



25 μm



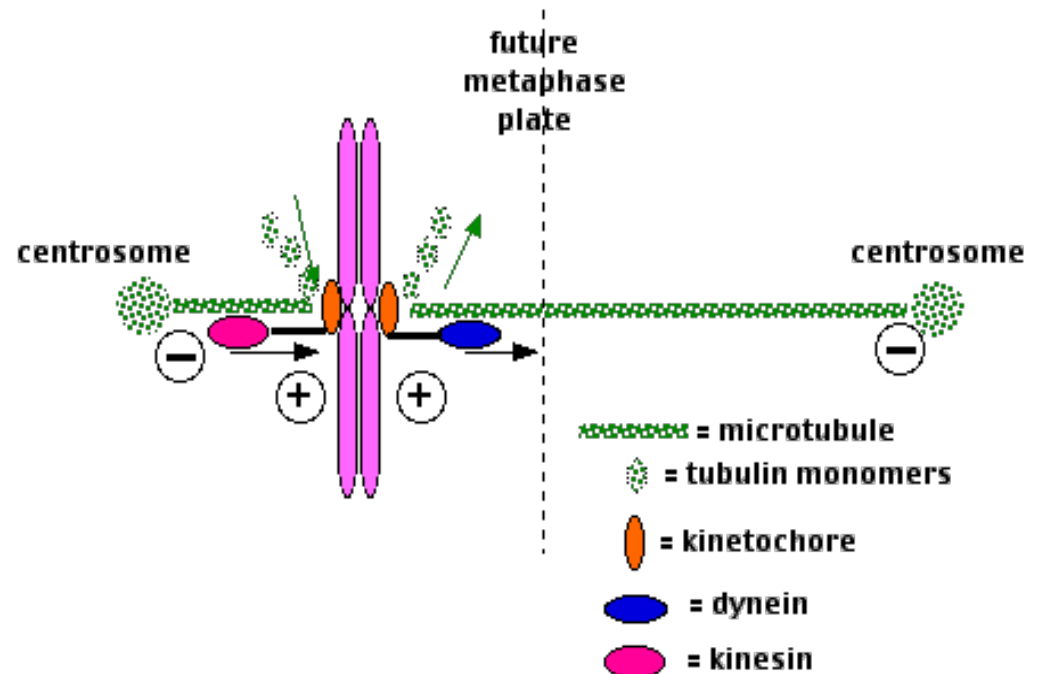
25 μm



Microtubule motors

There are two major groups of microtubule motors:

- kinesins (most of these move toward the plus end of the microtubules) and
- dyneins (which move toward the minus end).
- The rapid transport of organelles, like vesicles and mitochondria, along the axons of neurons takes place along microtubules with their plus ends pointed toward the end of the axon. The motors are kinesins.
- CENTROSOMES located in the cytoplasm attached to the outside of the nucleus.
- Just before [mitosis](#), the centrosome duplicates.
- The two centrosomes move apart until they are on opposite sides of the nucleus.
- As mitosis proceeds, microtubules grow out from each centrosome with their plus ends growing toward the metaphase plate. These clusters of microtubules are called spindle fibers.



Bez přítomnosti **centrozómu** není možné jaderné dělení. Konkrétní funkcí centrozómu je organizování mikrotubulů do prostorové sítě. Během buněčného dělení zajišťuje navázání chromozomů na mikrotubuly. Nachází se v něm asi 100 různých proteinů, které jsou většinou zcela unikátní a neexistují k nim analogické proteiny v jiných částech buňky.

Vyskytuje se v cytoplazmě těsně u jaderné membrány (karyolema), která je v jeho okolí mírně prohloubena, a před mitózou se duplikuje. Dva centrozomy tvoří póly dělicího (mitotického) vřeténka, jehož vytváření a orientaci zajišťují. V živočišných buňkách (na rozdíl od rostlinných) jsou centrozomy pozorovatelné po celou dobu mitózy.

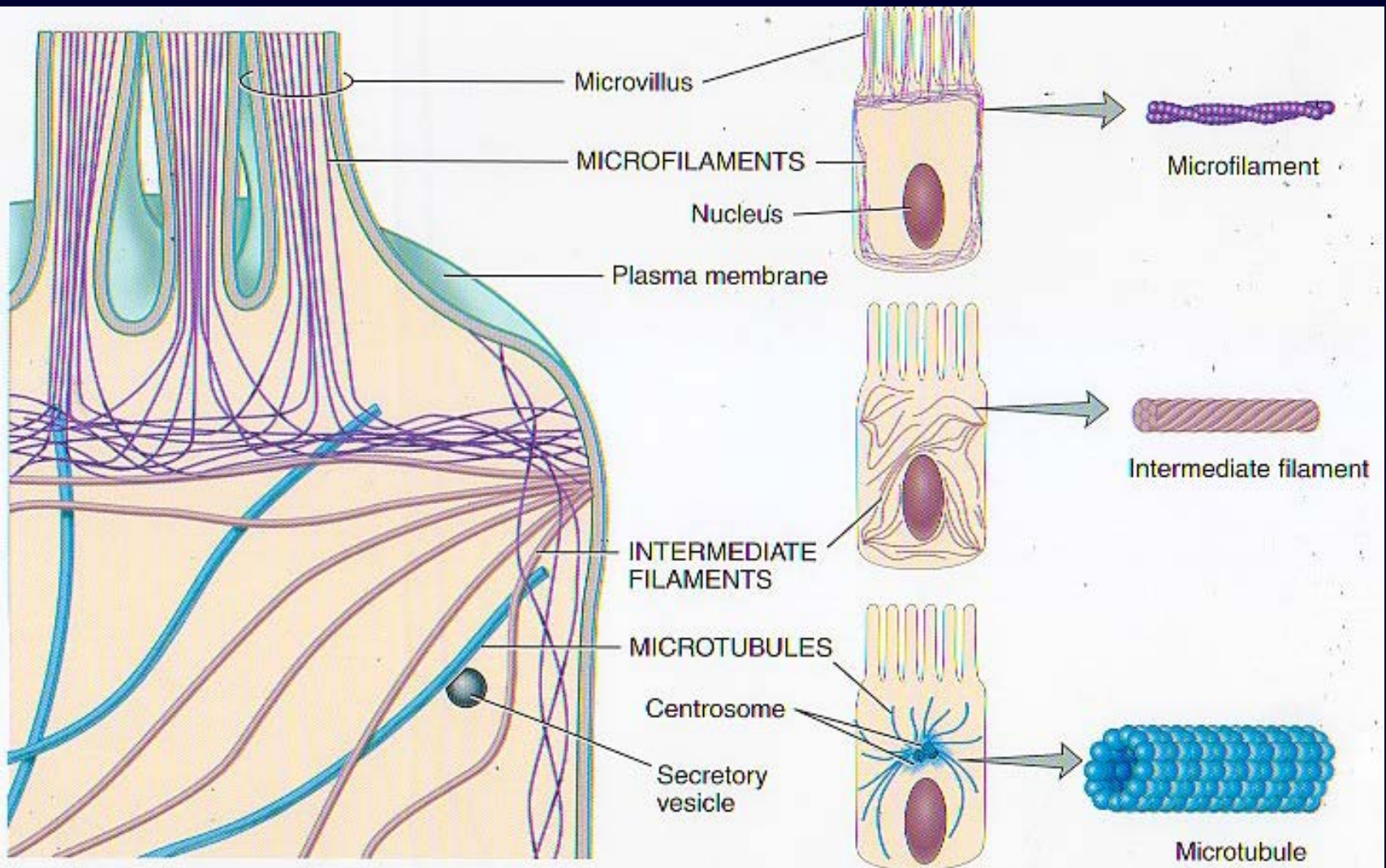
Centriola je válcovitá buněčná organela, která se nachází ve většině eukaryotických buněk vyjma vyšších rostlin a hub. Buňky obvykle obsahují dvě centrioly. Pár centriol, které jsou vzájemně kolmo orientované, vytváří centrozóm. Před mitózou vyrostou nové centrioly z obou stávajících, čímž vzniknou dva páry centriol. Dceřinné buňky získají vždy jednu mateřskou a jednu dceřinnou centriolu.

3) INTERMEDIÁLNÍ FILAMENTA

provazcovitá vlákna o průměru 10 nm, jsou tvořena intermediálními proteiny. Jedním typem je jaderná lamina, přiléhající k jaderné membráně. Jiný typ těchto filament je natažený zkrz cytoplasmu a tak poskytuje buňkám mechanistické rozpínání, to umožňuje zprostředkování mezibuněčných komunikací.

There are several types of intermediate filament, each constructed from one or more proteins characteristic of it.

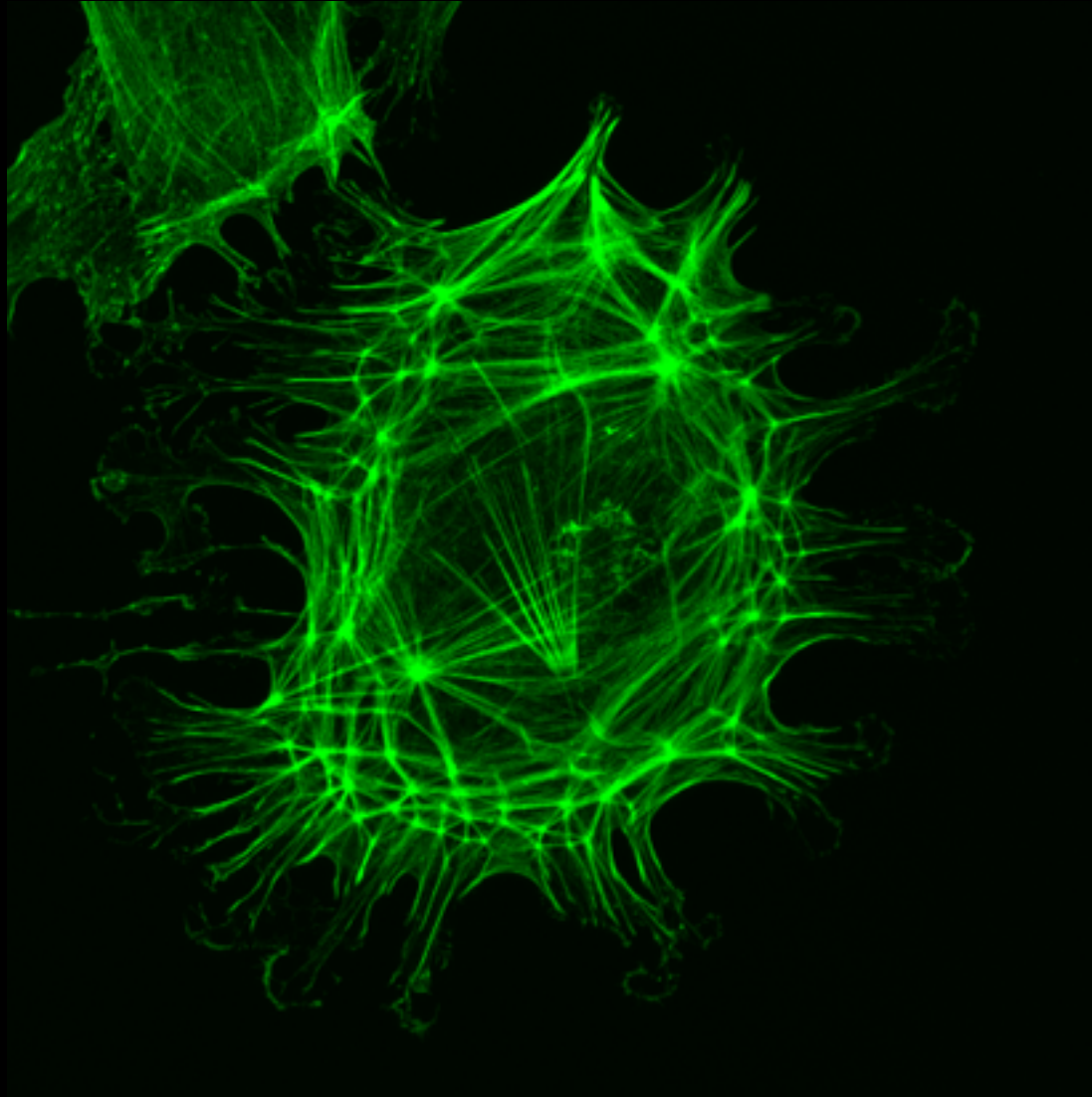
- **keratins** are found in epithelial cells and also form hair and nails;
- **nuclear lamins** form a meshwork that stabilizes the inner membrane of the nuclear envelope
- **neurofilaments** strengthen the long axons of neurons
- **vimentins** provide mechanical strength to muscle (and other) cells.



(a) Overview of cytoskeleton

(b) Distribution of cytoskeletal element (left) and detail of structure (right)

**F-actin in bovine articular chondrocytes
(Actin forms microfilaments)**

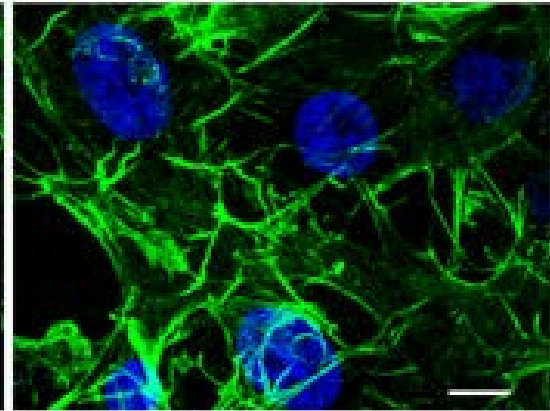
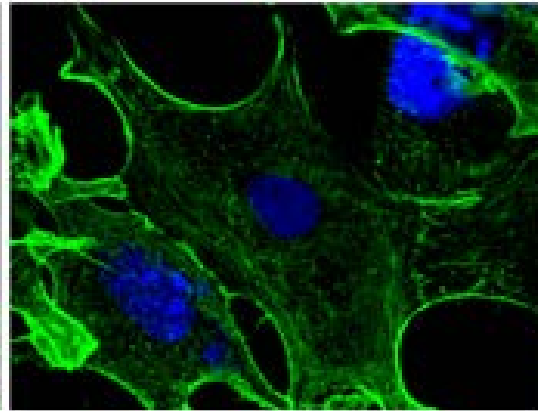
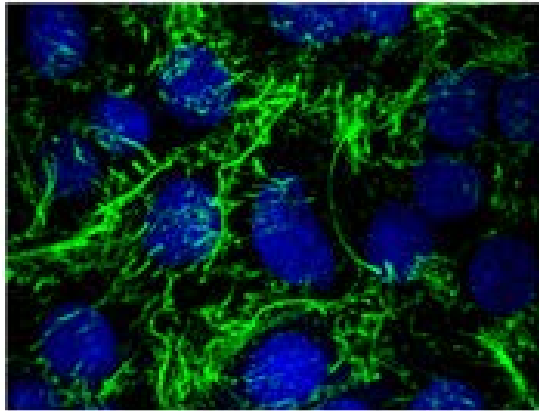


F-actin

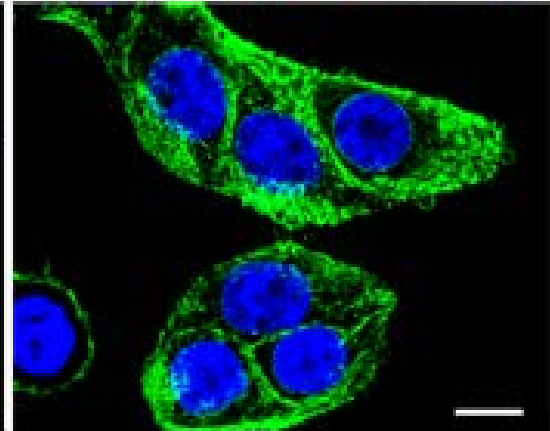
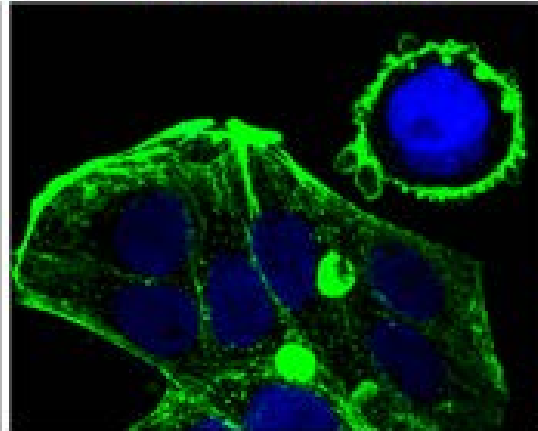
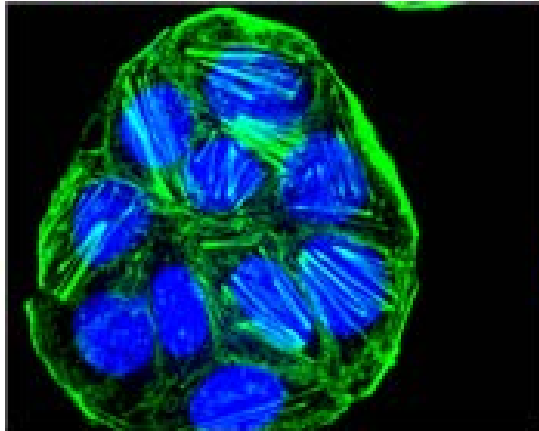
CONTROL

TSA

NaBt

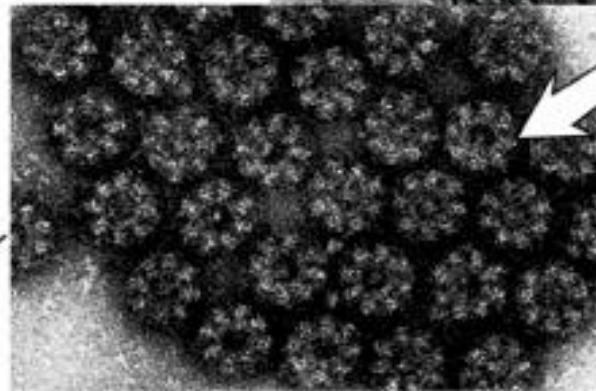
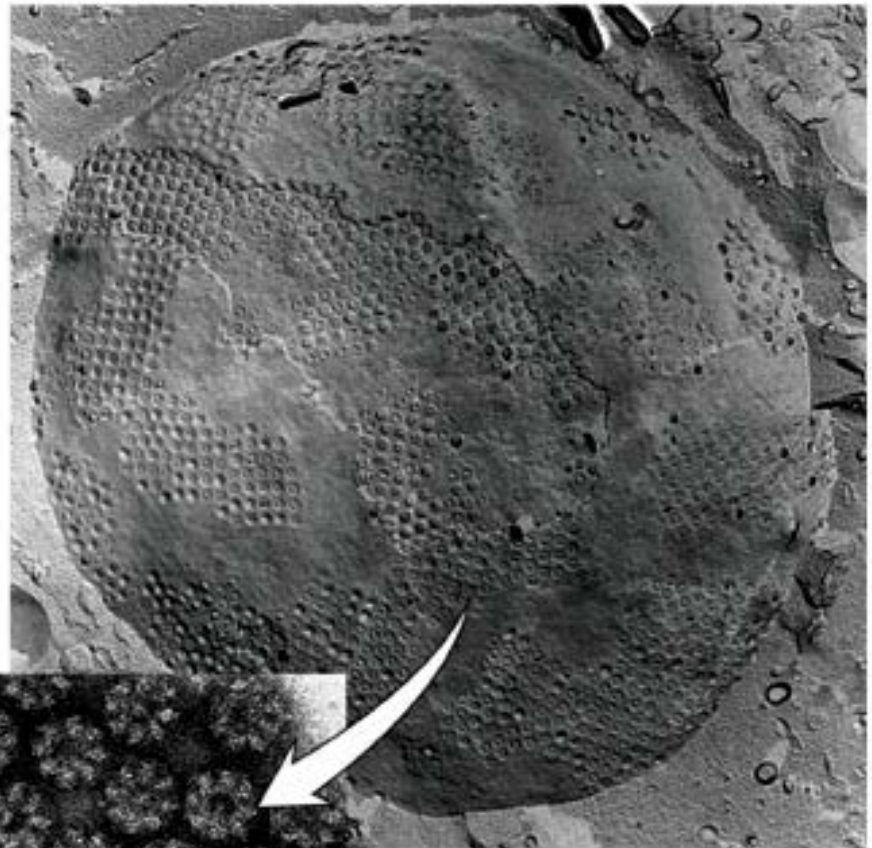
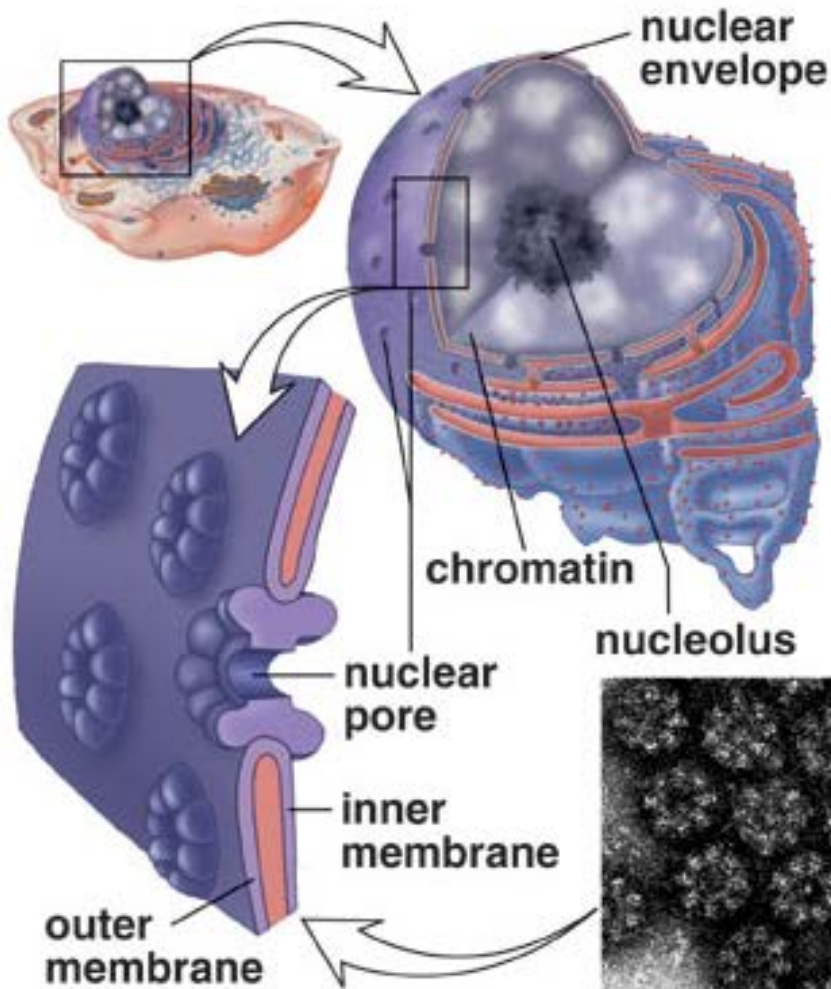


A549

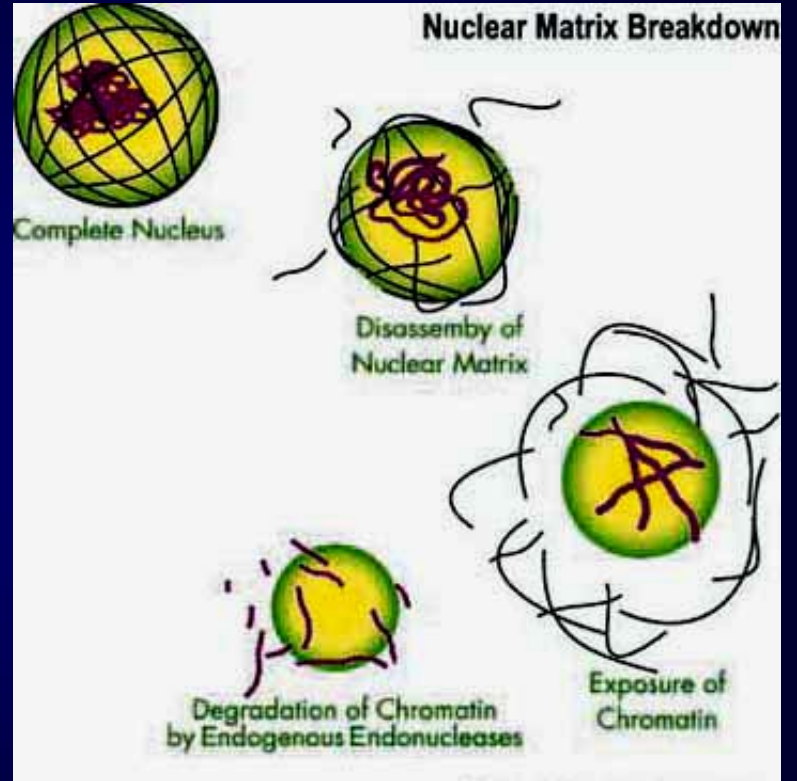
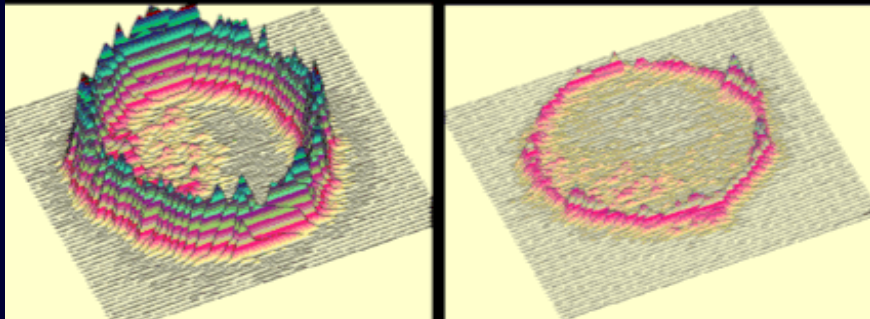
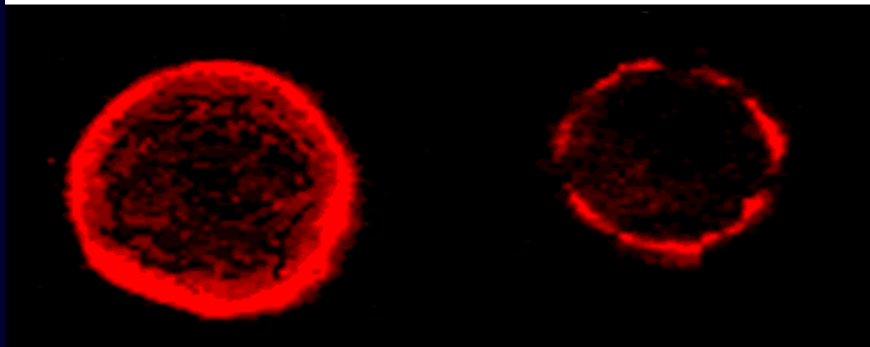
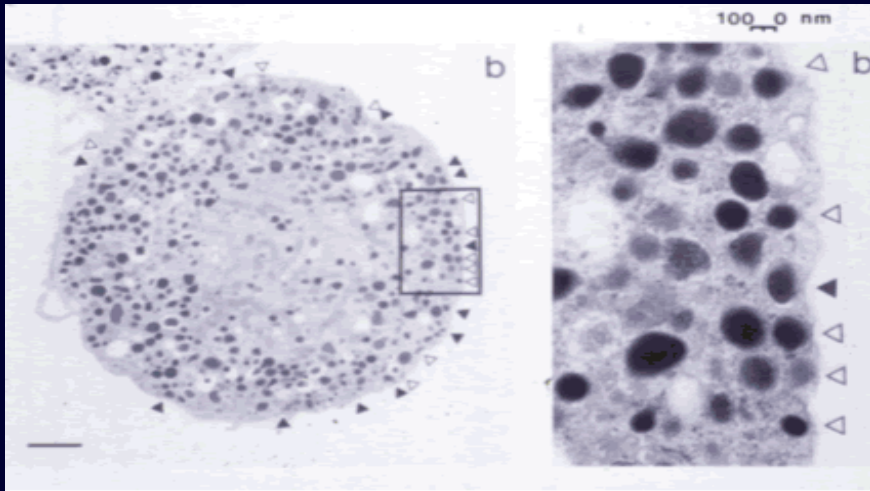


HT29

The nucleus and the nuclear envelope



Electron micrographs of nuclear envelope showing pores.



Laminy a další proteiny jsou složky jaderné membrány. Byl podán důkaz, přítomnosti laminů i v nukleoplasmě. Proteiny typu laminů jsou zodpovědny za jadernou architekturu, z důvodů jejich kontaktu se strukturami chromatinu. Tyto vzájemné vztahy se mění během buněčného cyklu a diferenciaci.

Změny v expresi laminů (A, B1, B2) korelují se změna v buněčné diferenciaci, s vývojově-závislými změnami a se změnami v expresních profilech, které probíhají během zmíněných procesů.

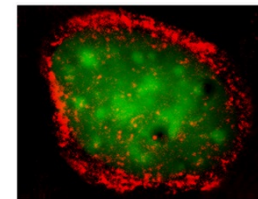
Laminy jsou hlavní komponenty i jaderné matrix, polymerizované laminy tvoří hlavní kostru buněčného jádra. Mutace v laminech, a dalších proteinech jaderné matrix jako je emerin, nurim, způsobují další nestability chromatinu a fragilnost buněčných jader. Specifické mutace laminů A/C a emerinů jsou zodpovědné za vznik Emery-Dreifuss svalové dystrofie.

Nuclear lamina and lamins

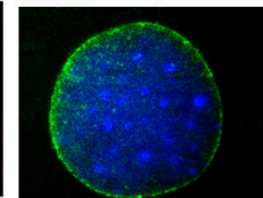
- A-type lamins – *LMNA* gene (A, A Δ 10, C, C2)
(in differentiated cells, tissue homeostasis)
- B-type lamins – *LMNB1*, *LMNB2* genes (B1, B2, B3)
(in somatic cells, essential for cell viability, development)

Lamin structure

- short N-terminal „head“ domain (NH₂)
- long α -helical coiled-coil „rod“ domain
- globular „tail“ domain (COOH)



lamin A/C

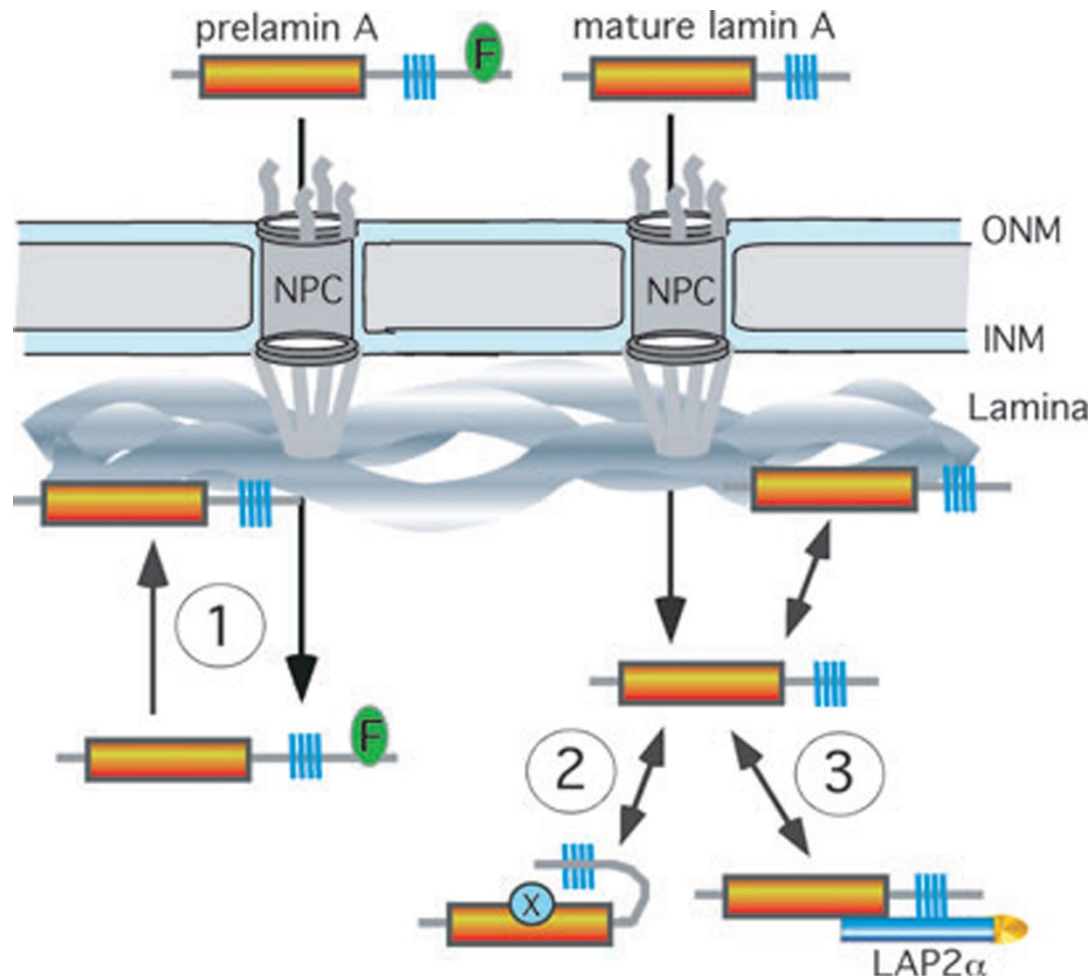


lamin B



- nucleoplasmic pool of the lamin A

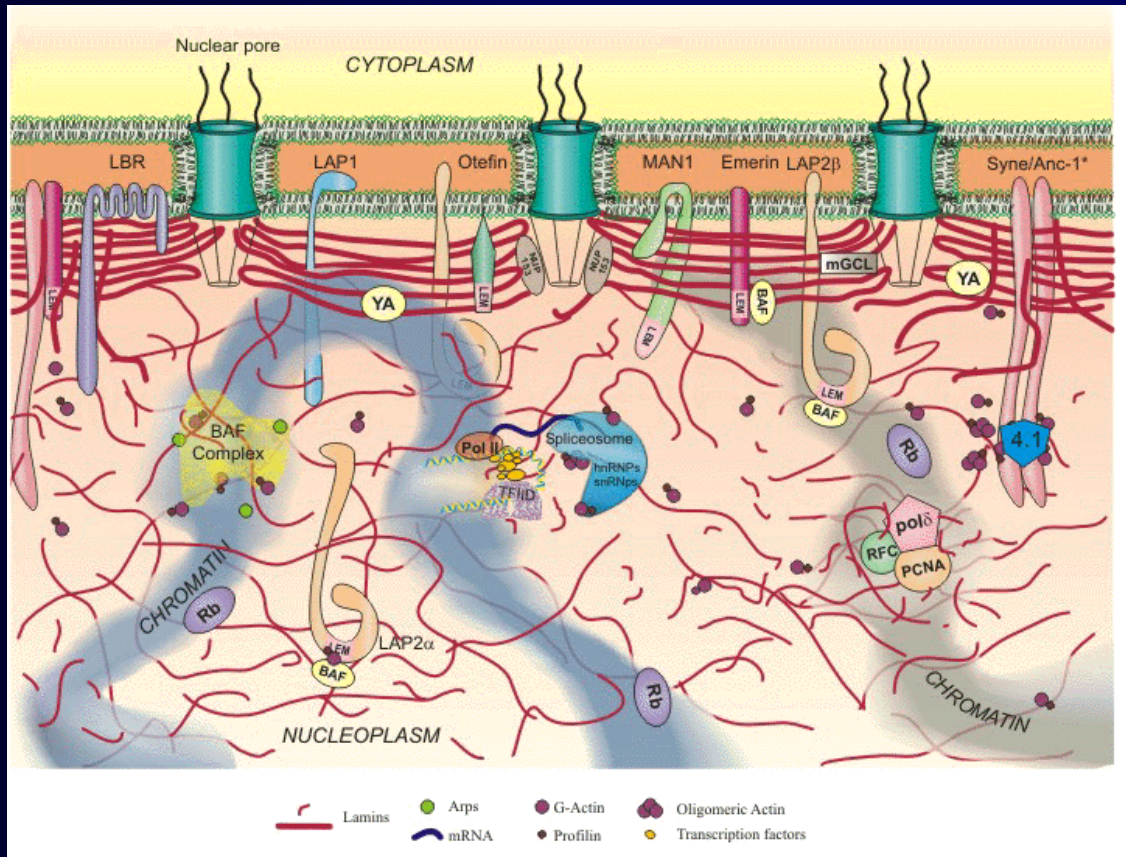
Three possible mechanisms of targeting lamins A/C to the nucleoplasm



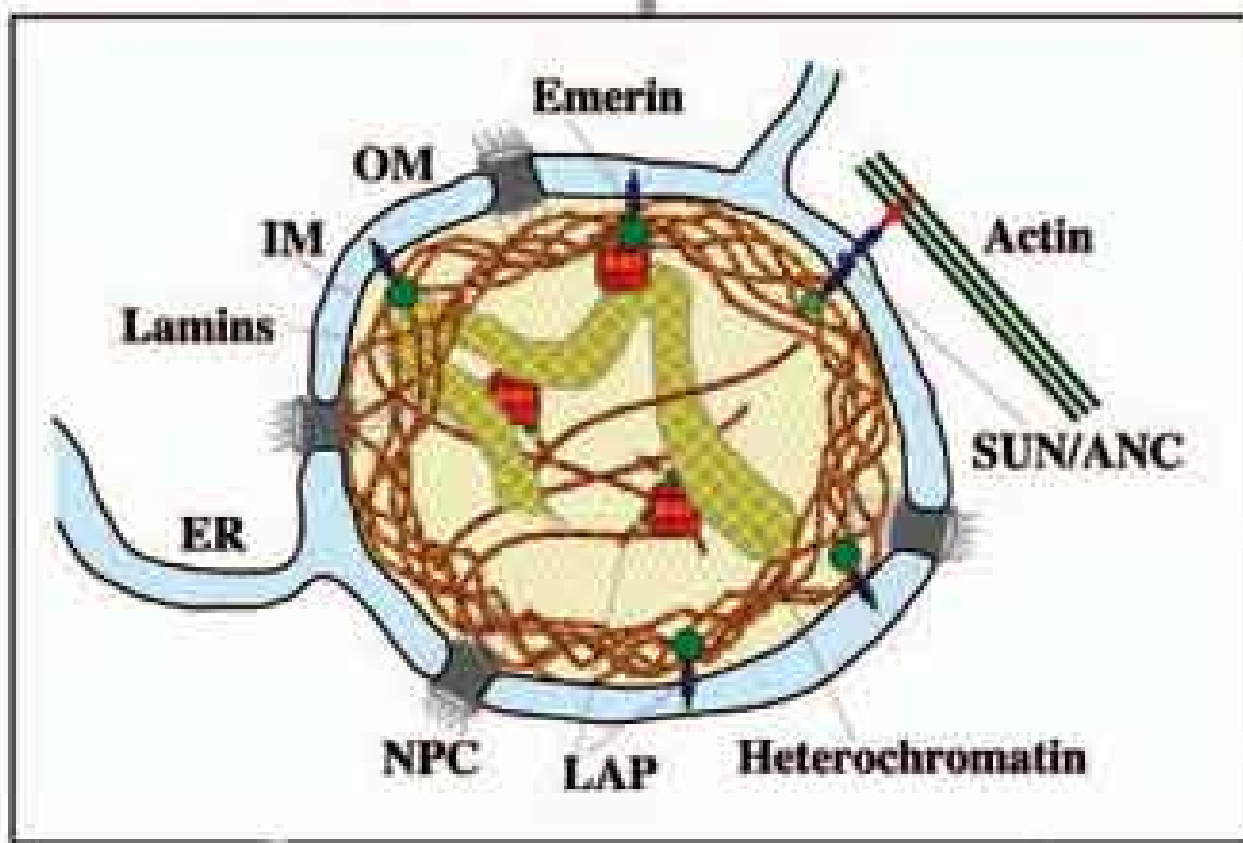
(Dorner et al., 2006)

Prelamin A is **farnesylated and carboxymethylated** on the cysteine residue of a carboxyl-terminal CaaX motif. This post-translationally modified cysteine residue is removed from prelamins A when it is **endoproteolytically** processed into mature lamin A. The protein encoded by this gene binds to the prenylated prelamins A carboxyl-terminal tail domain. It may be a component of a prelamins A endoprotease complex. The encoded protein is located in the nucleus, where it partially colocalizes with the nuclear lamina. It shares limited sequence similarity with iron-only bacterial hydrogenases. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been identified for this gene, including one with a novel exon that is generated by RNA editing.

Laminy mají rovněž schopnost se vázat na proteiny asociované s chromatinem. laminy jsou považovány i za regulátory transkripce. LA a LC se vážou na pRb protein (centrantrální regulator buněčného cyklu, inhibuje geny důležité pro vstup do S-fáze, tím že aktivuje HDAC komplexy, které jsou zodpovědné za inaktivitu struktur chromatinu), který se váže na LAP2 alfa. Vyblokování LA i LC inhibuje aktivitu pol II a mění formování některých transkripčních faktorů.

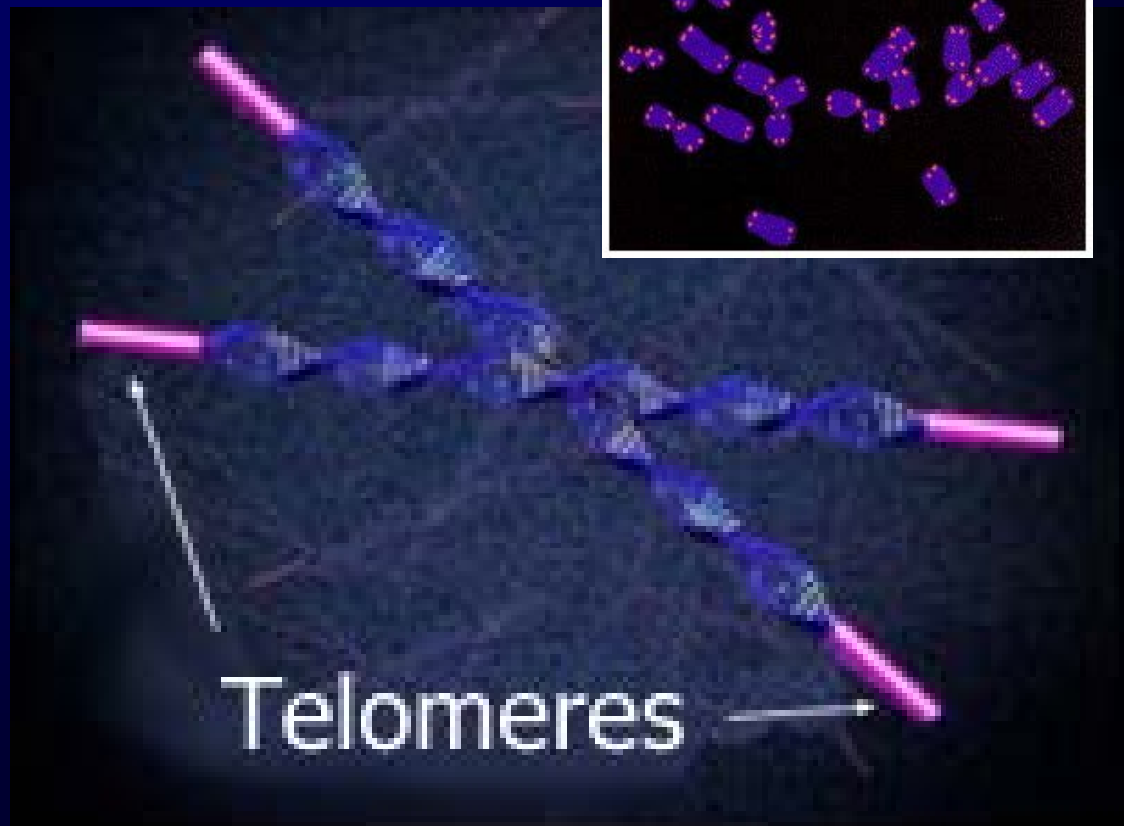
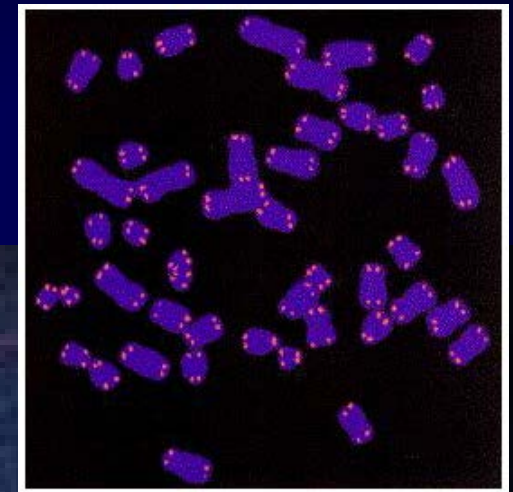
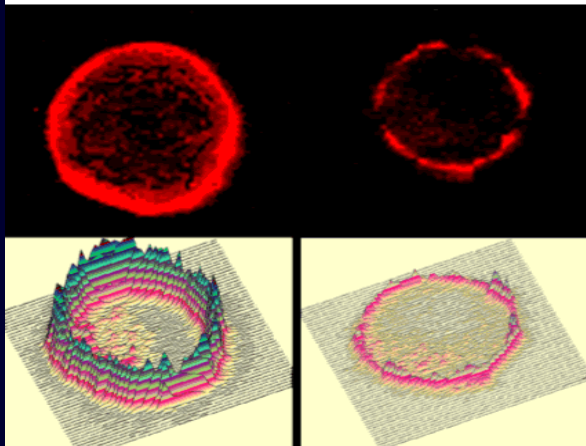
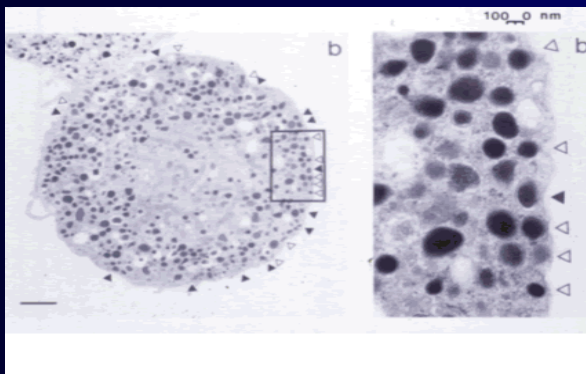


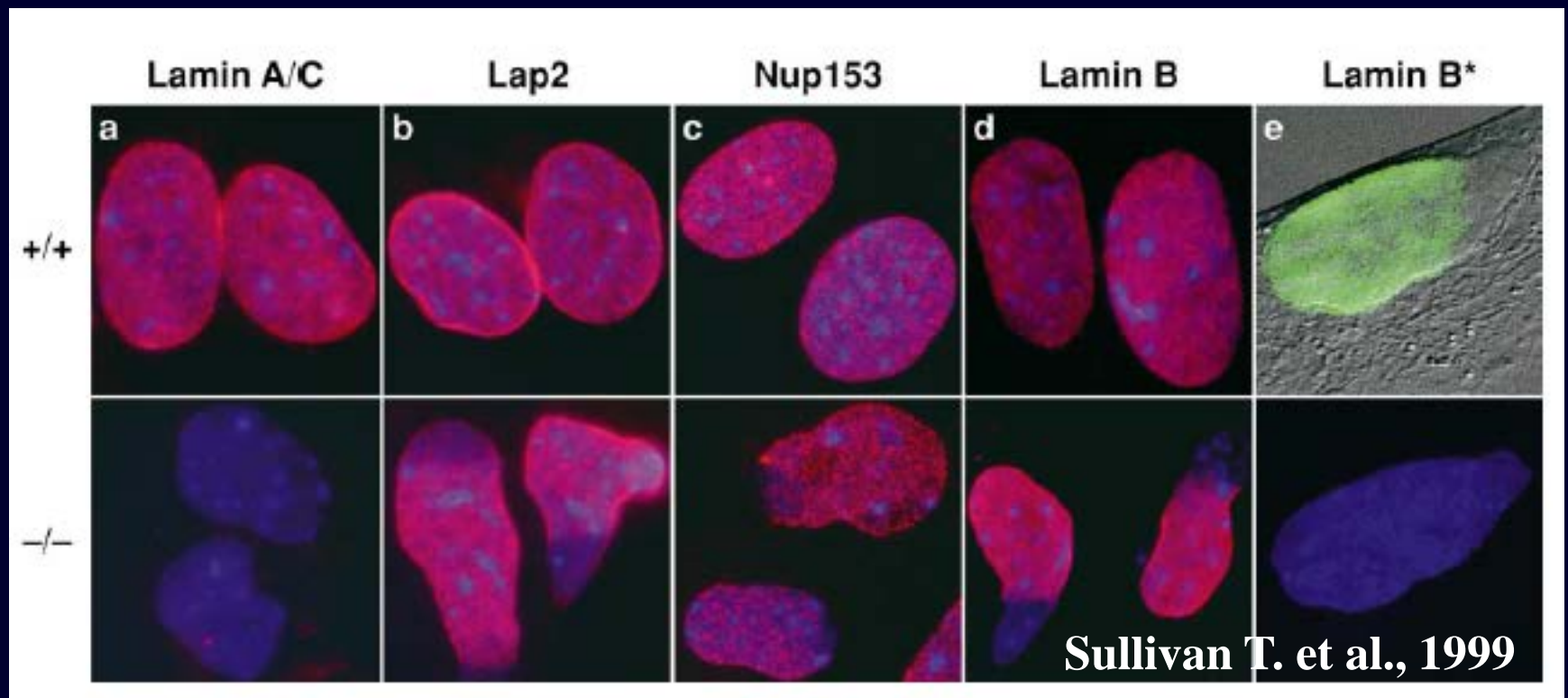
Z tohoto faktu je zřejmé, že proteiny jaderné slupky ovlivňují strukturu chromatinu.



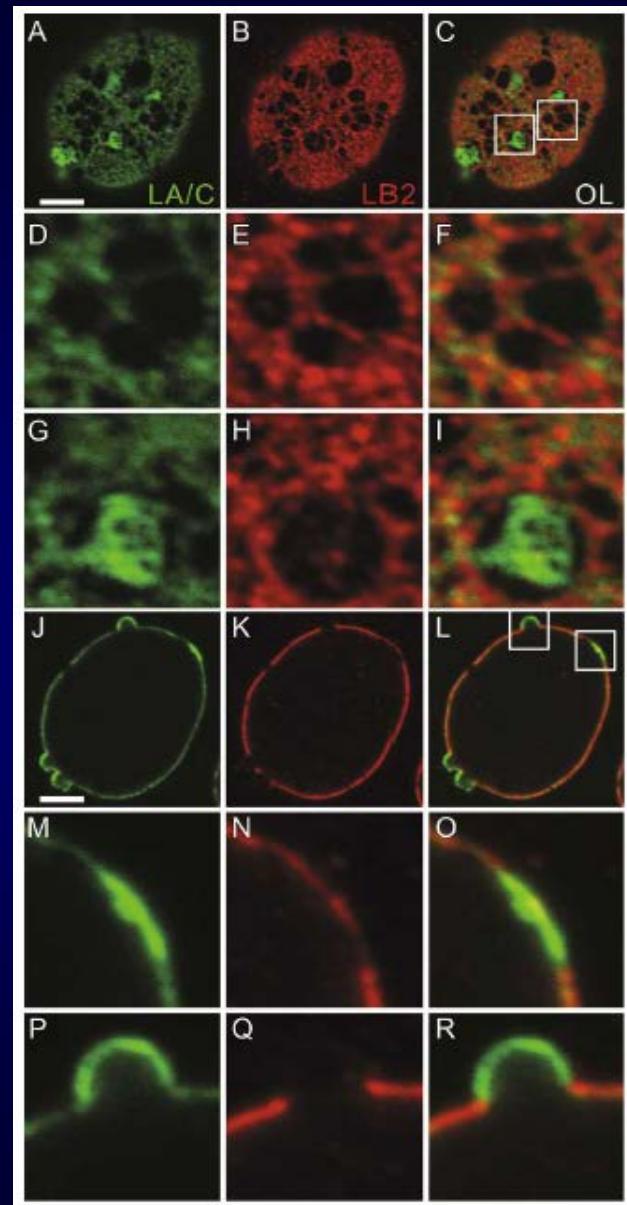
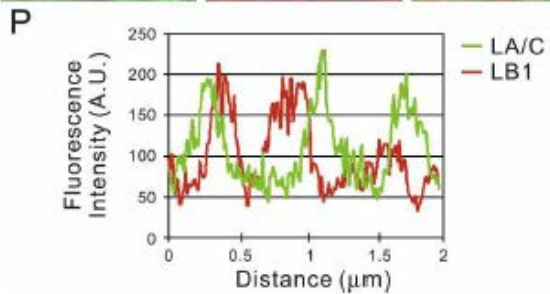
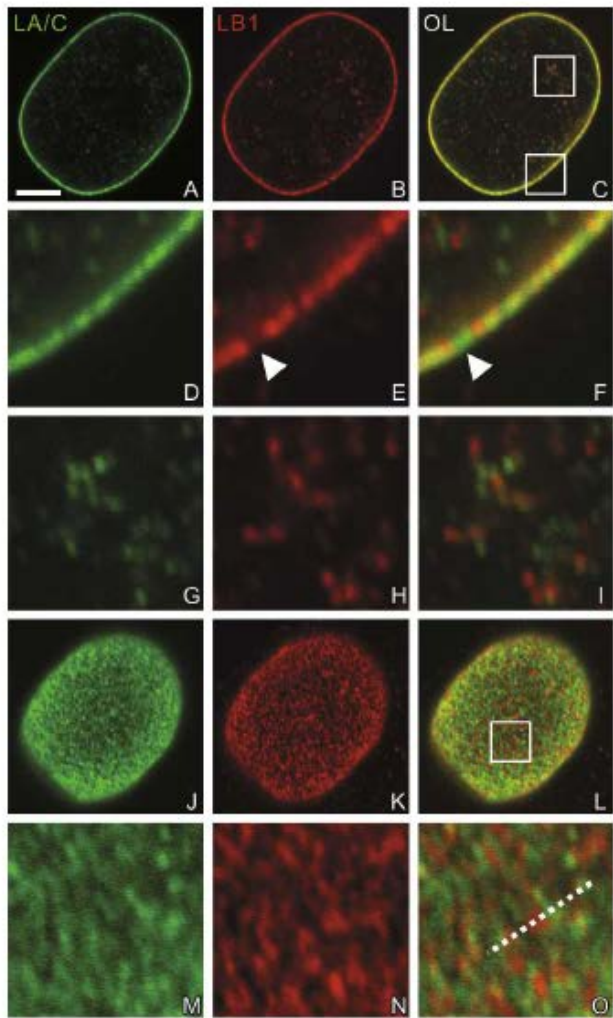
Laminy- intermediální filamenta (IF), komunikují s dalšími IF, jsou součástí tzv. nuclear lamina a tudíž i matrix, jsou zodpovědné za organizaci chromatinu (heterochromatin).

Laminy A/C se rovněž těsně dotýkají heterochromatických struktur jako jsou telomery a centromery, které jsou často umístěny v těsné blízkosti jaderné periferie

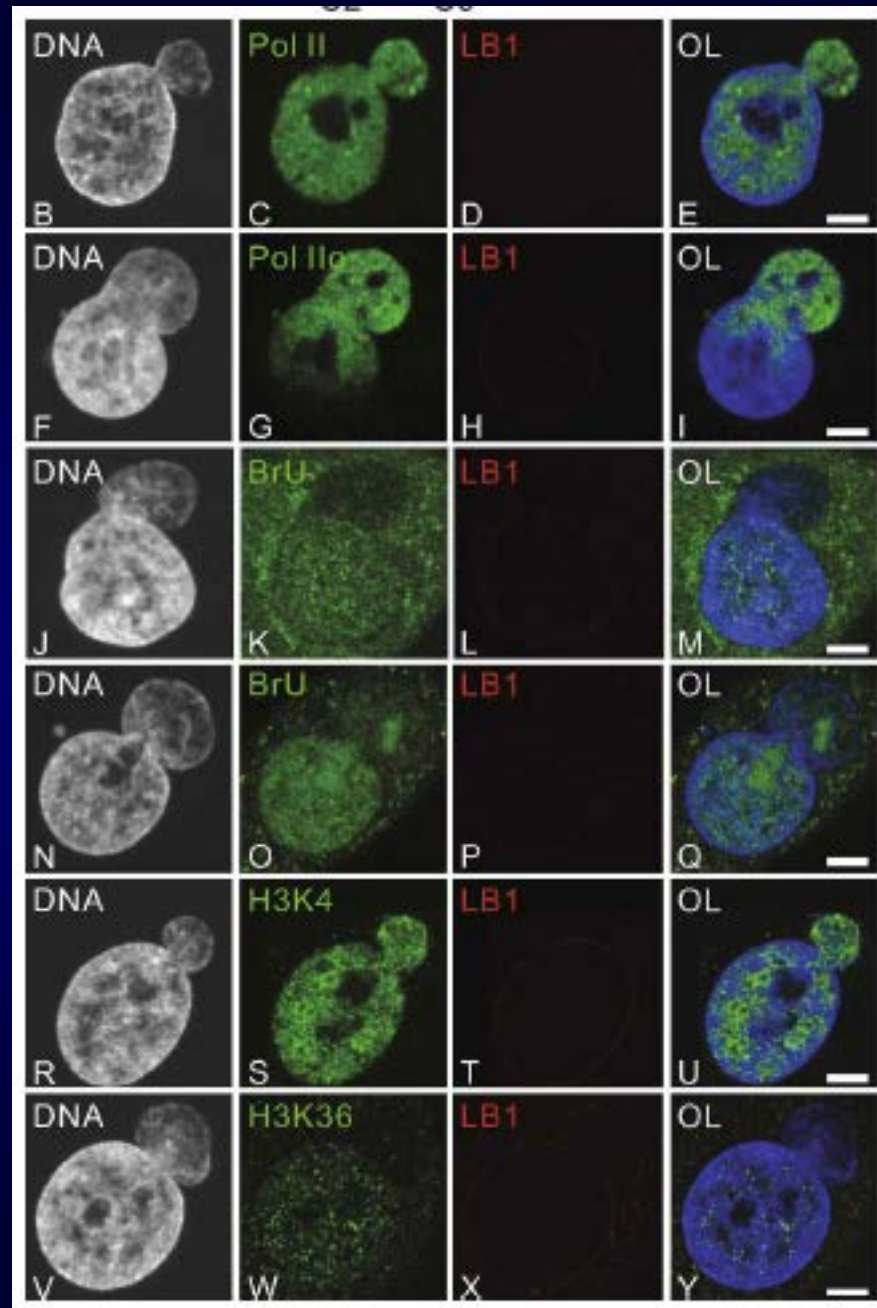
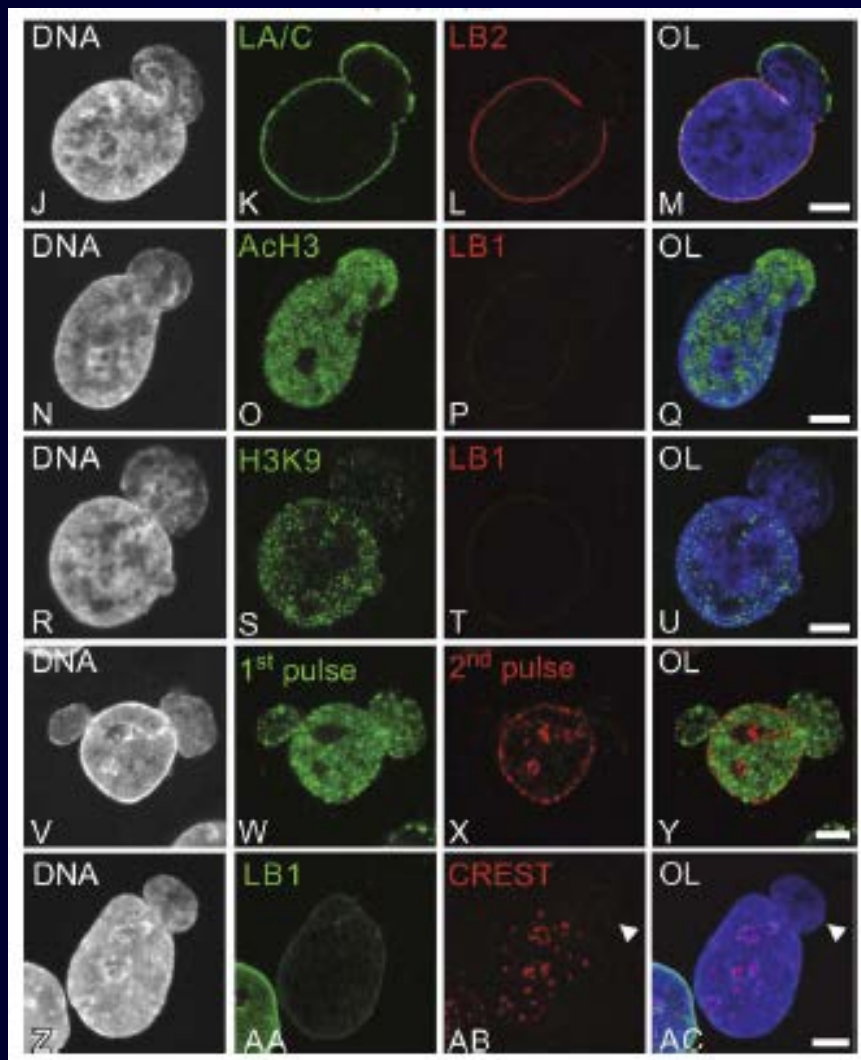




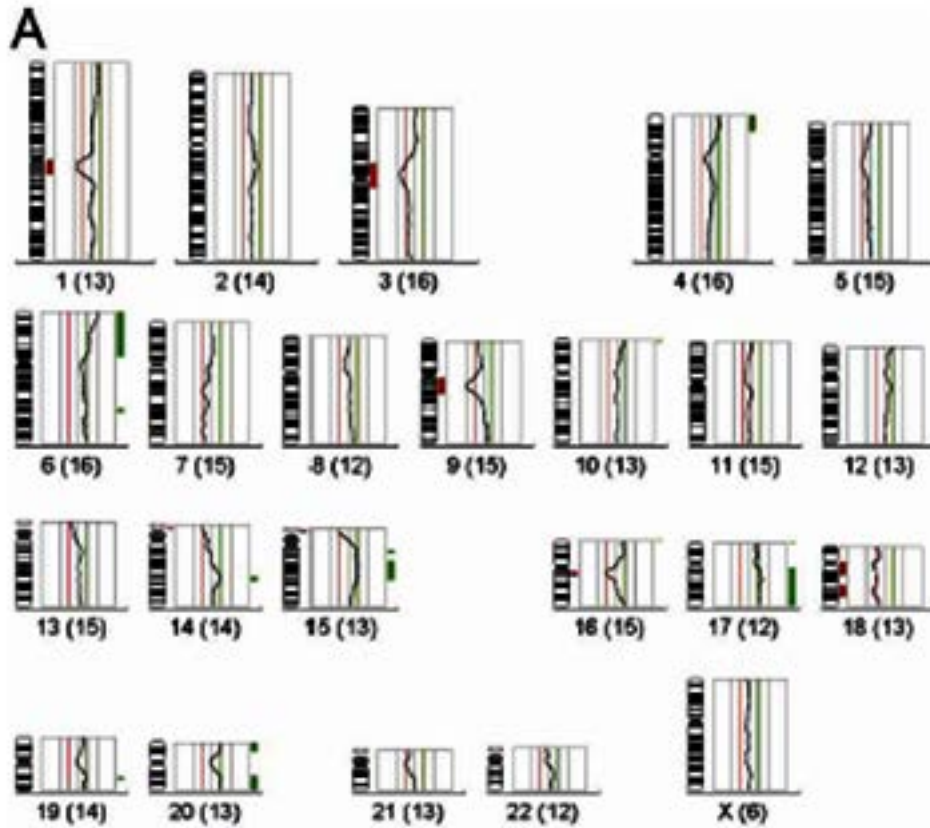
MEF buňky izolované z LA/C knock out myši – vhodný model ke studiu laminů. Ztráta LA/C není pro buňky fatální, ale RNAi vyblokováný LB – apoptóza (Večeřová J.). Ztráta LA/C neovlivňuje distribuci a morfologii „nuclear species“ a ani formování faktorů sestřihu (Večeřová et al., 2005). Z experimentů plyne, že dynamicky organizované proteiny nehistonové povahy asociované s chromatinem vykazují schopnost vlastní organizace, která není závislá na proteinech nukleoskeletálních intermediálních filament typu laminů.



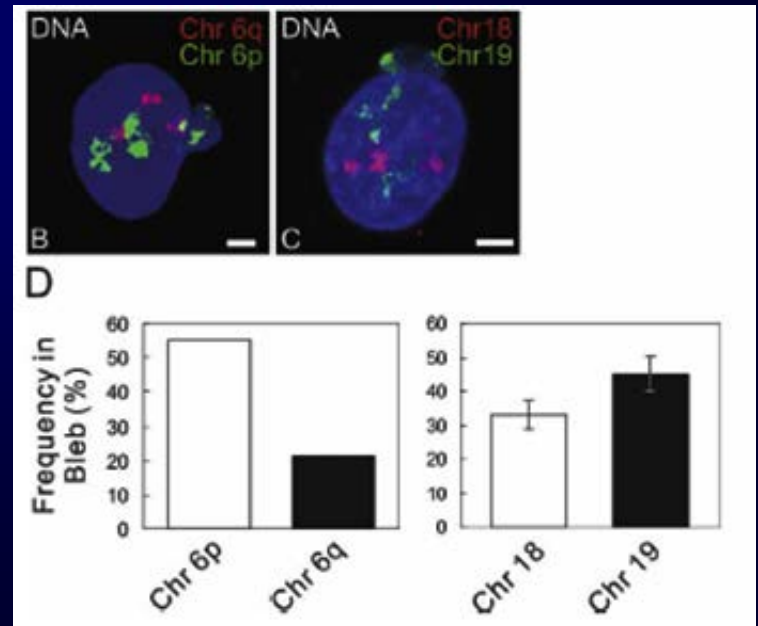
Lamin B1 deficiency



Shimi et al. Genes Dev (2008)

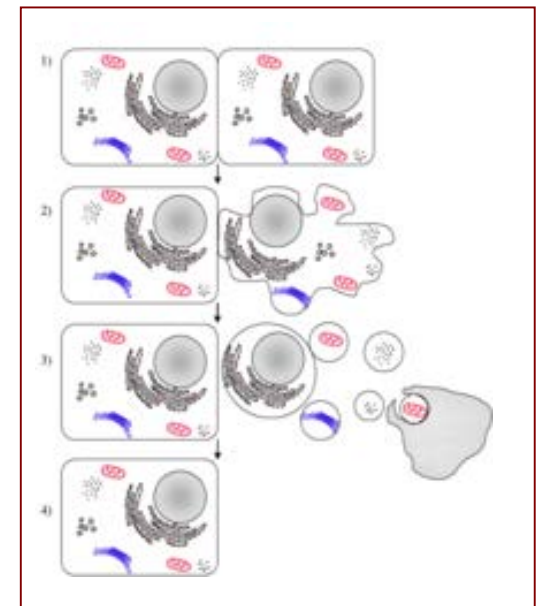


Shimi et al. *Genes Dev* (2008)

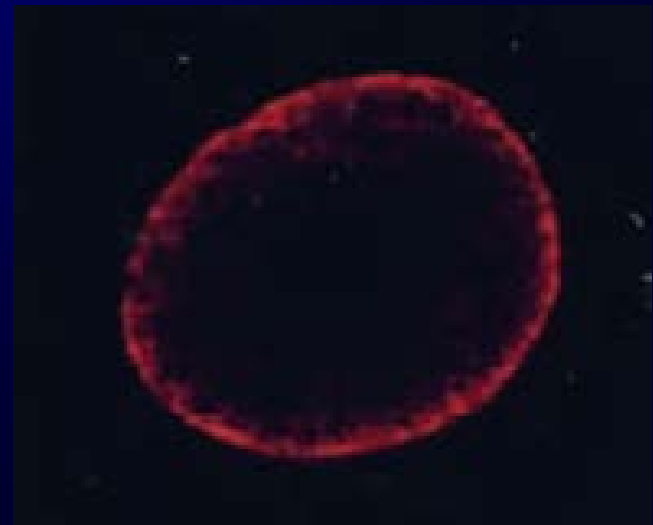
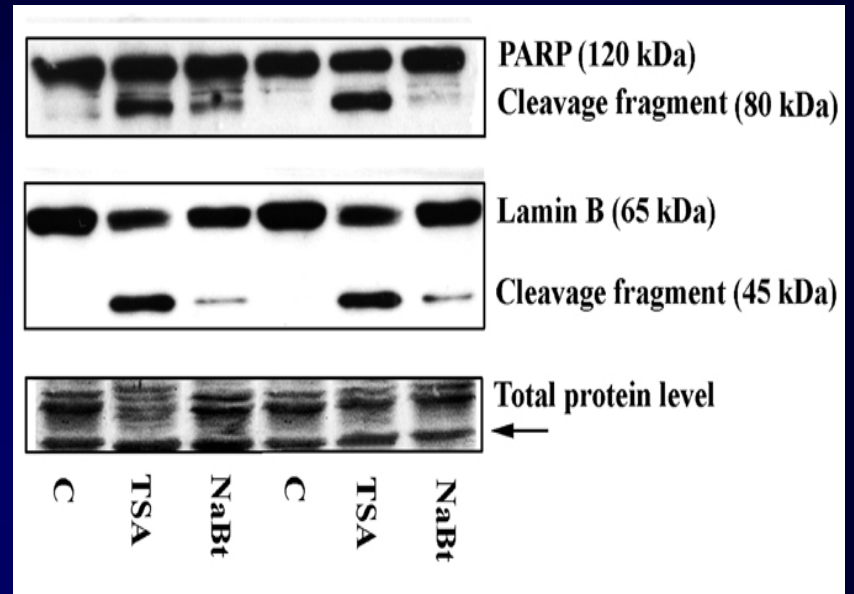
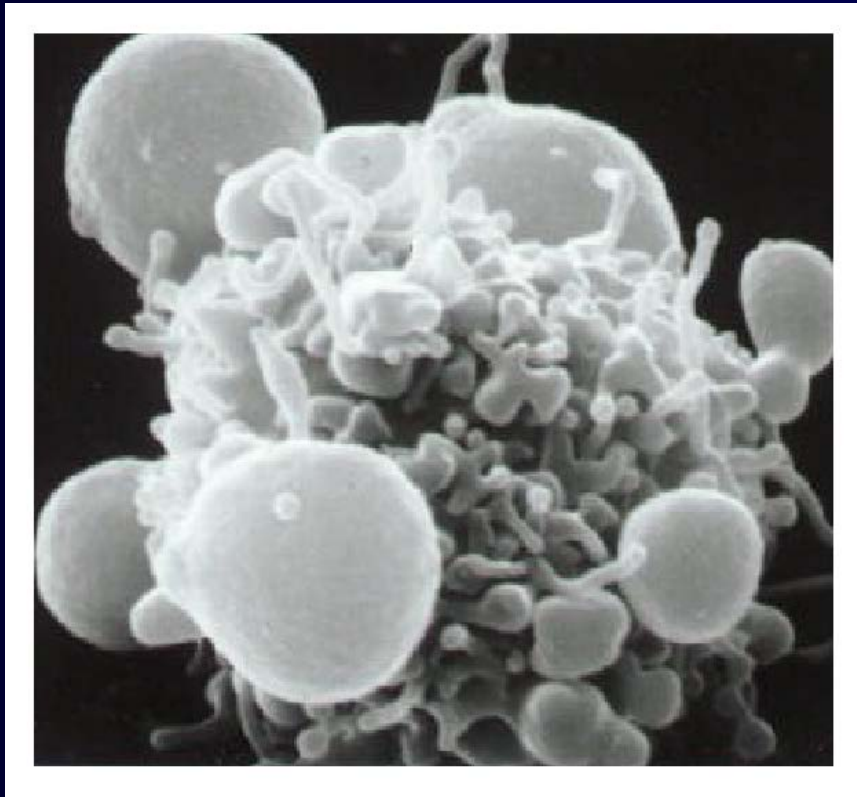


Laminy a apoptóza

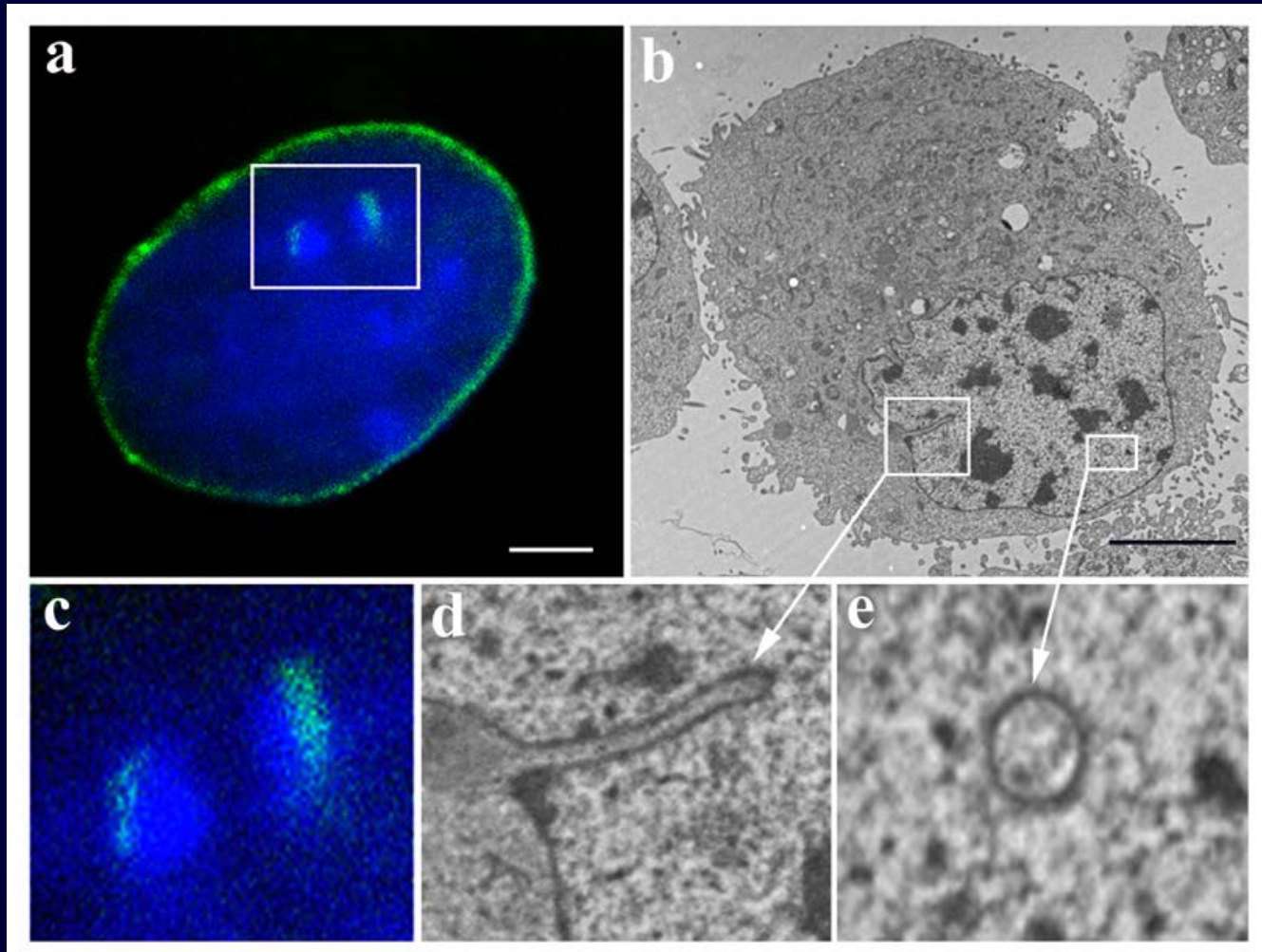
- apoptóza je charakterizována zmenšením jádra a kondenzací chromatinu (fragmentace na „bodies“)
- během apoptózy jsou laminy štěpeny kaspázami v místě kyseliny aspartové na centrální doméně laminu A (jedna z nejvíce konzervovaných oblastí v proteinech IF)
- degradace laminů hraje důležitou roli úspěšném zakončení apoptózy



Apoptotic lamin B cleavage

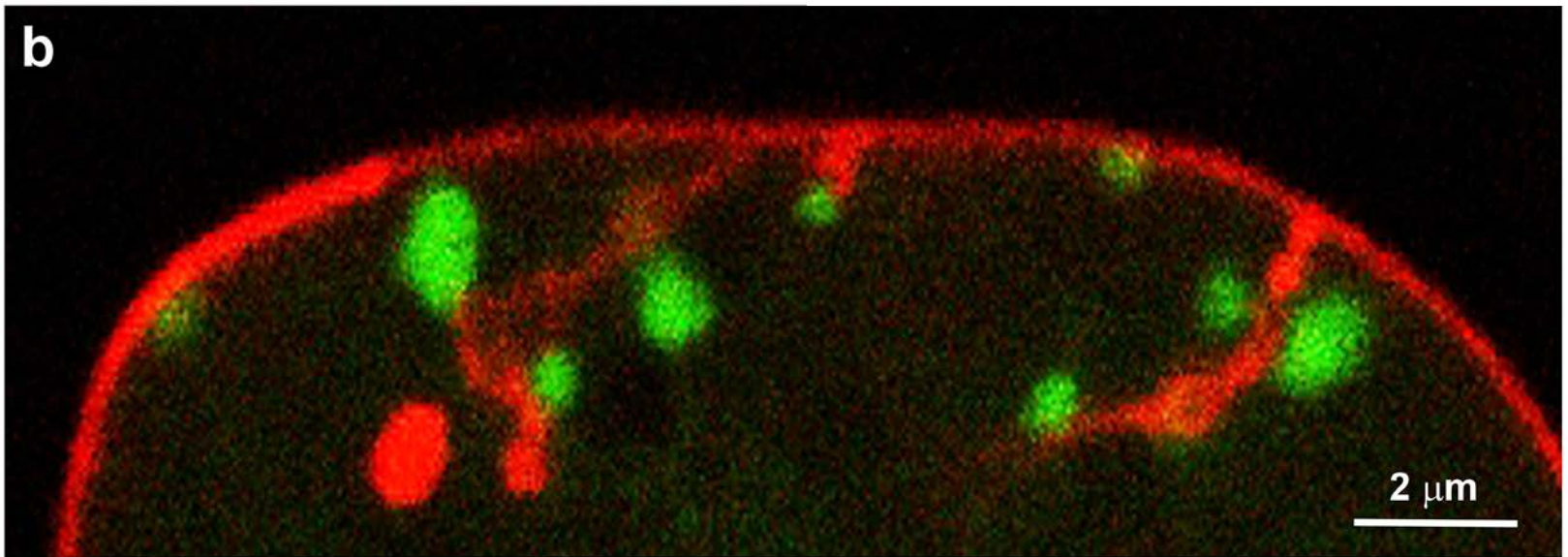
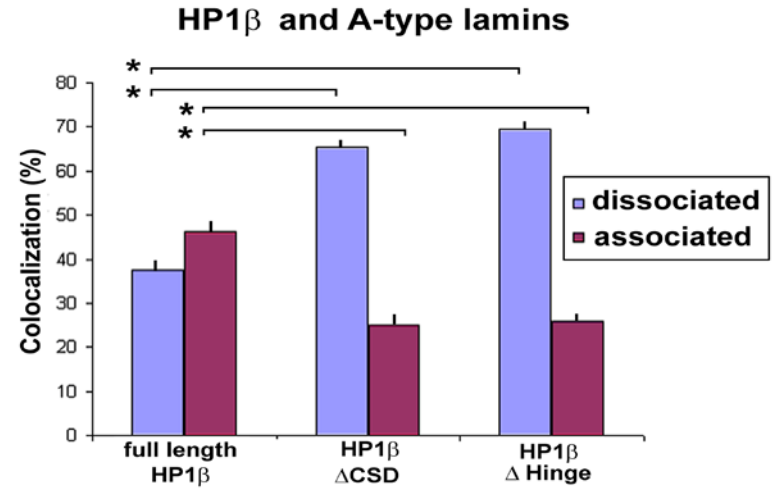
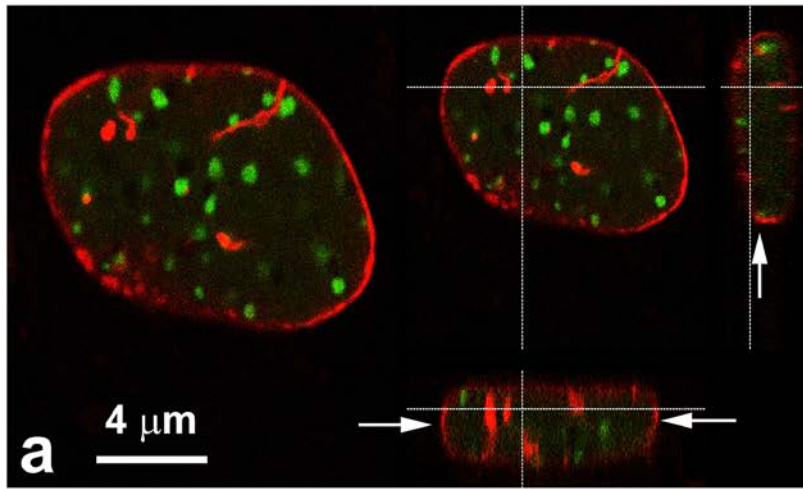


Lamin B (green) and invagination of nuclear membrane



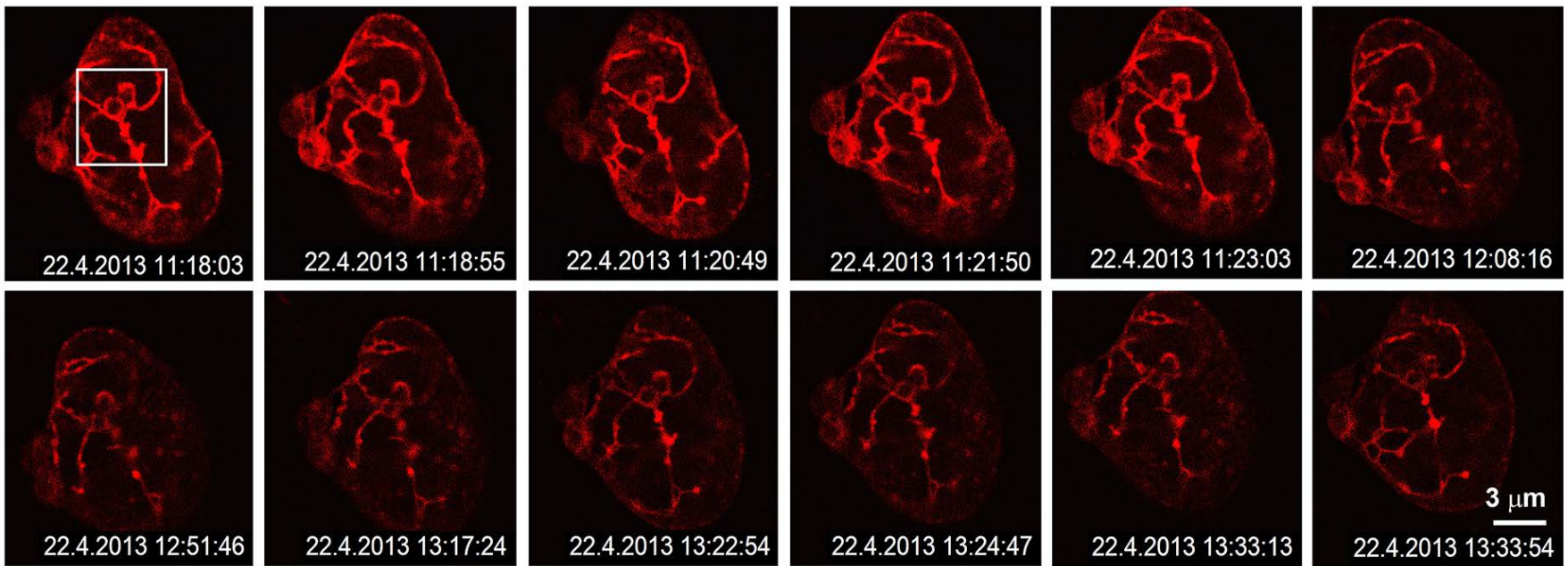
HP1 and nuclear structure

mCherry-Lamin A / GFP-HP1 β

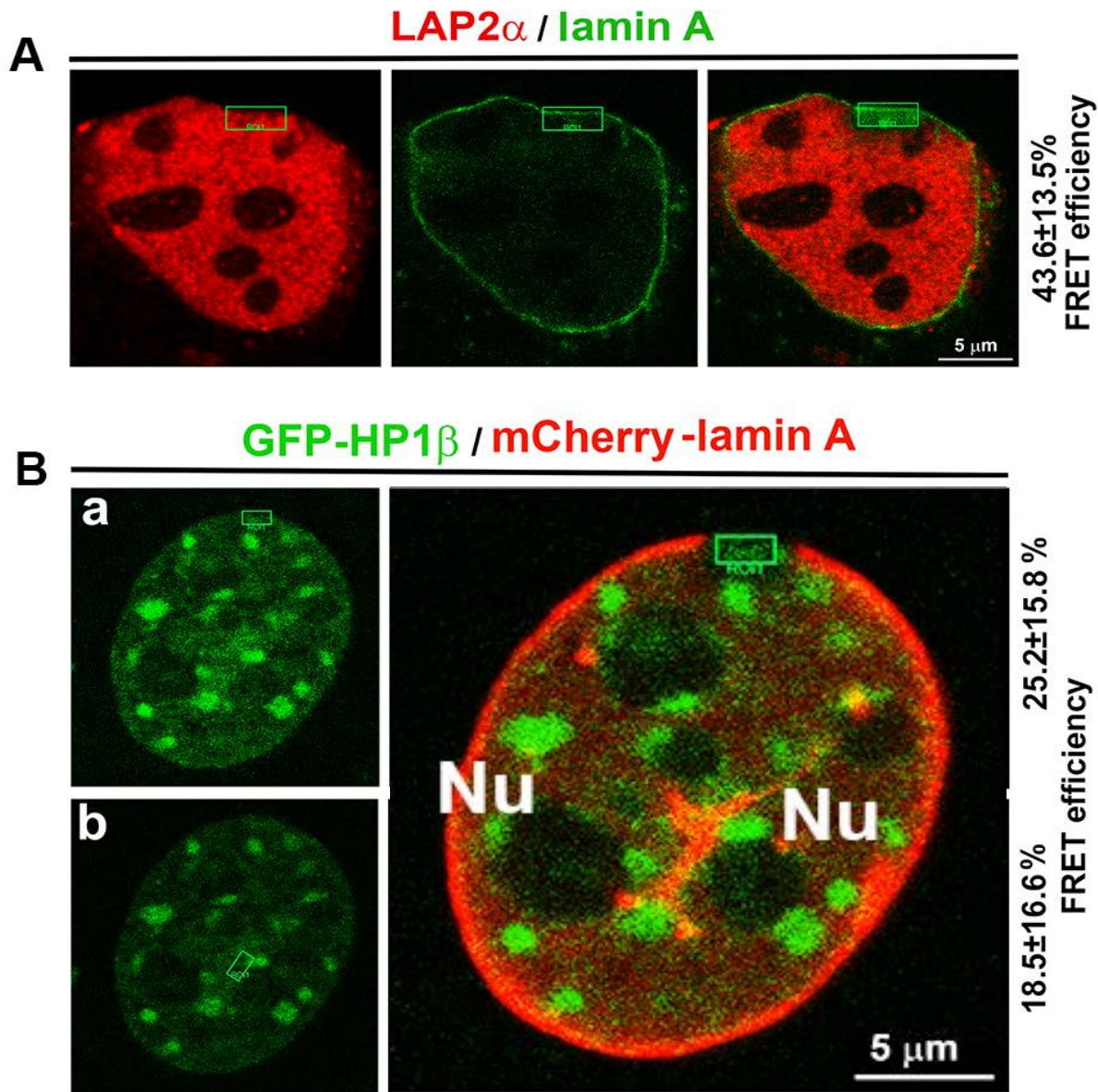


Experiments: Soňa Legartová and Eva Bártoová

Time-lapse microscopy / **A-type lamin** invagination



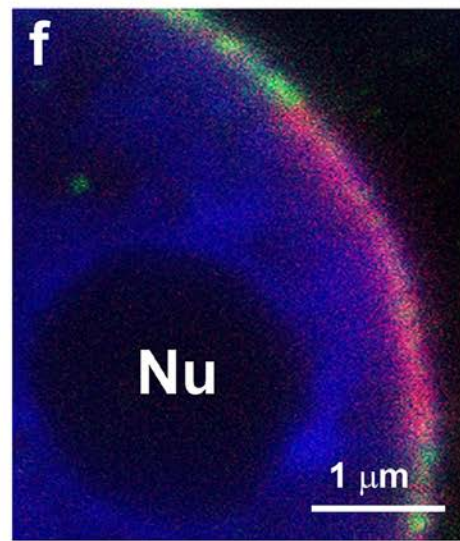
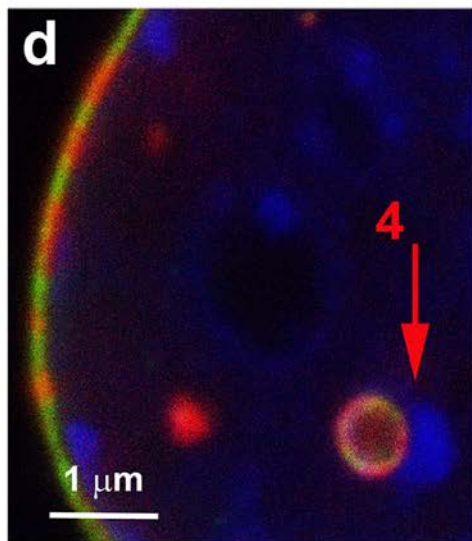
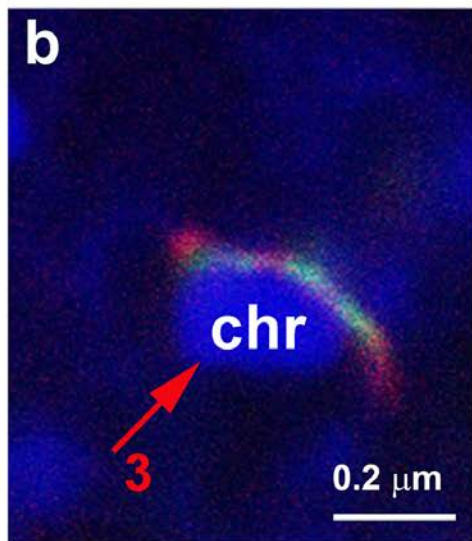
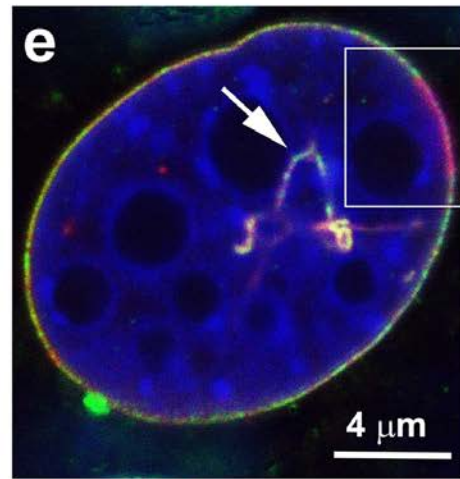
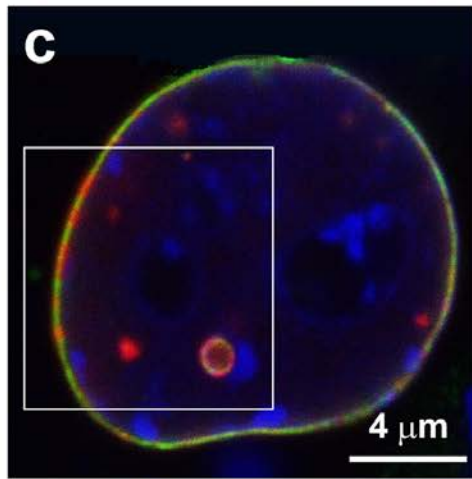
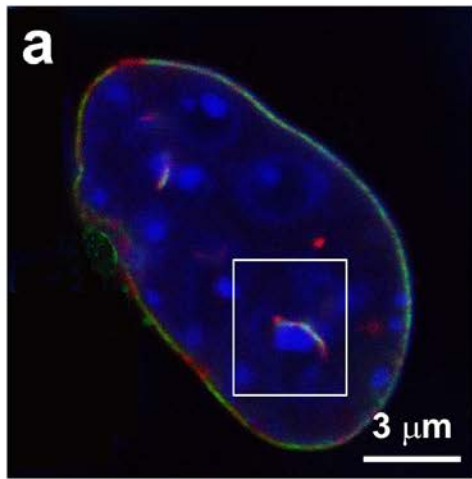
HP1 and nuclear structure



Experiments: Soňa Legartová, Lenka Stixová, Petra Sehnalová and Eva Bártová

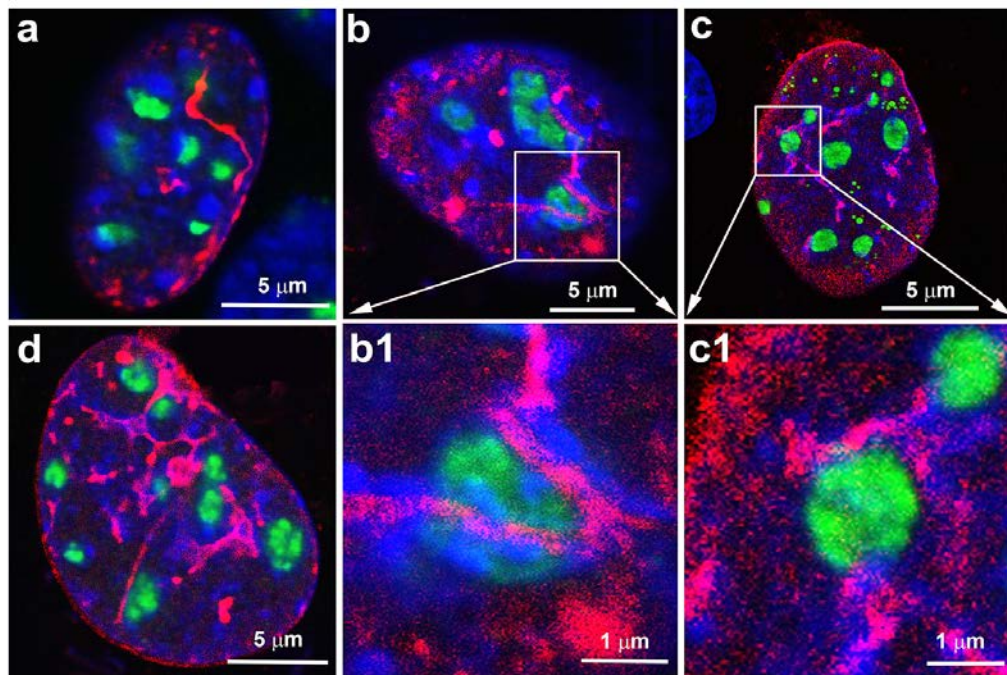
lamin A / Lamin B

immunofluorescence

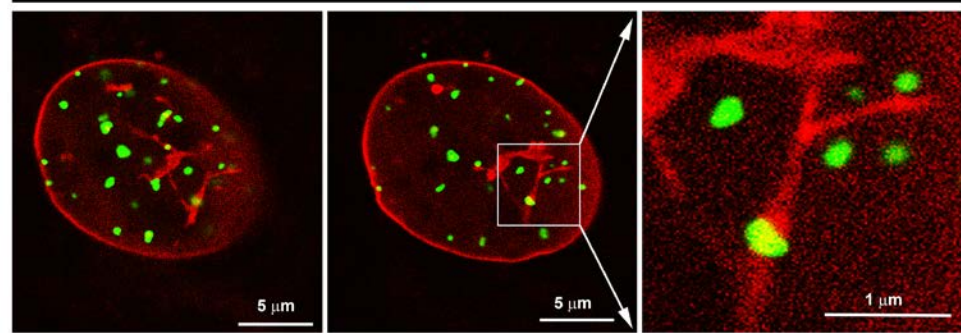


iMEFs

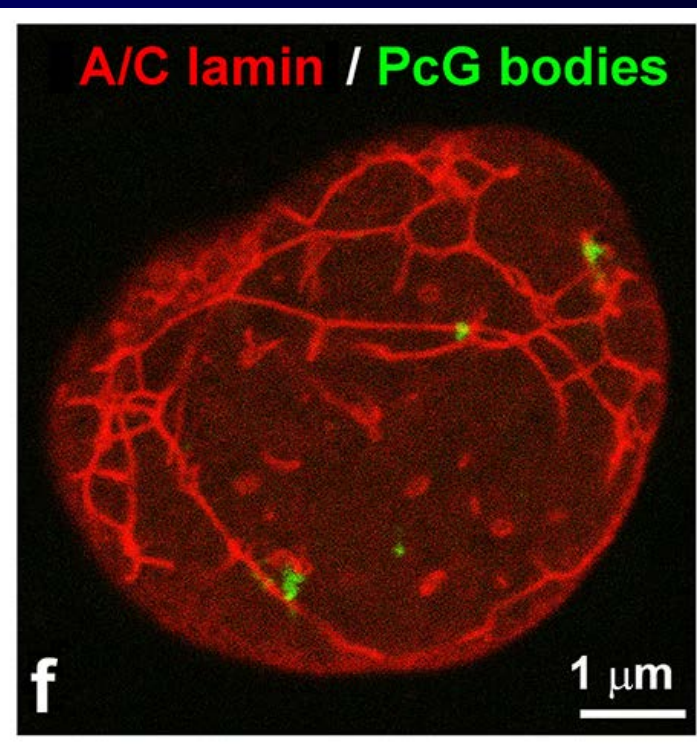
mCherry-lamin A / Fibrillarin / Nucleus



A mCherry-lamin A / GFP-PML

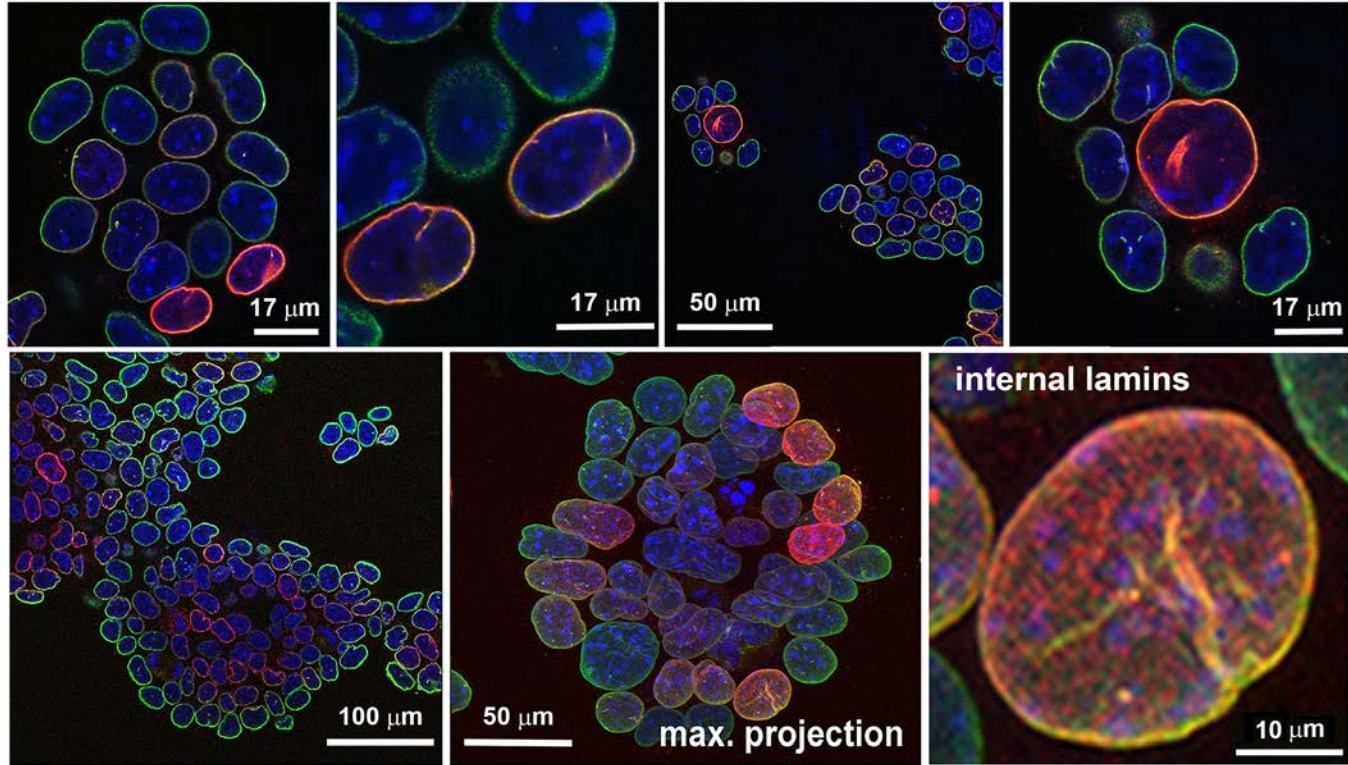


A/C lamin / PcG bodies

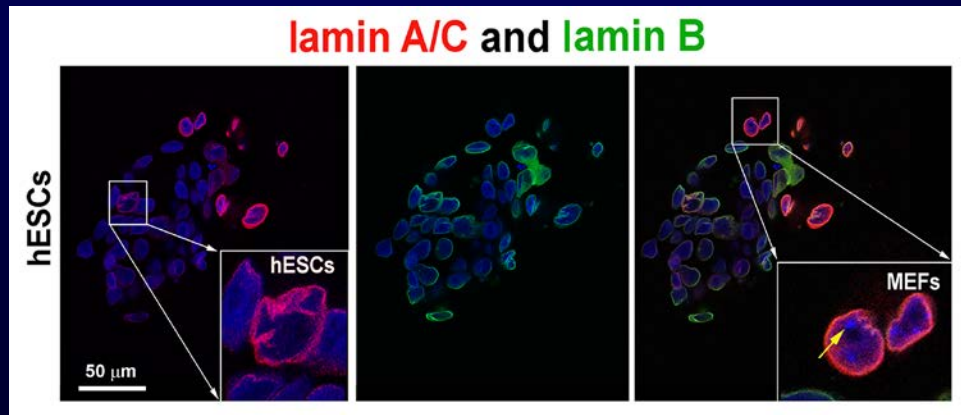


lamin A/C and lamin B

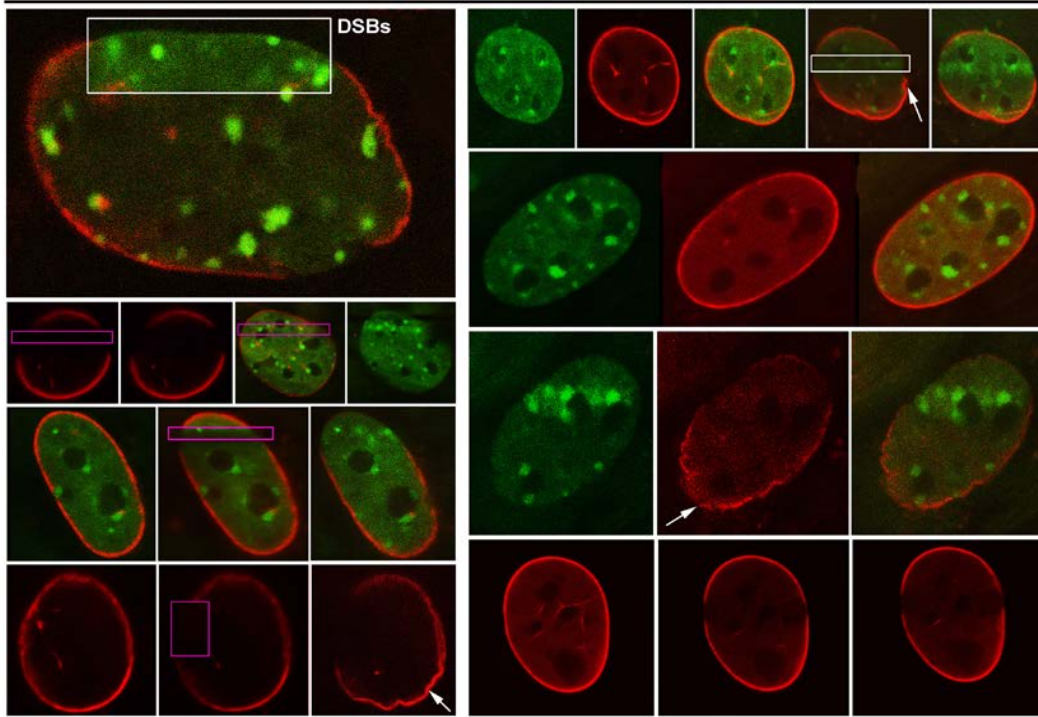
pluripotent D3 mESCs



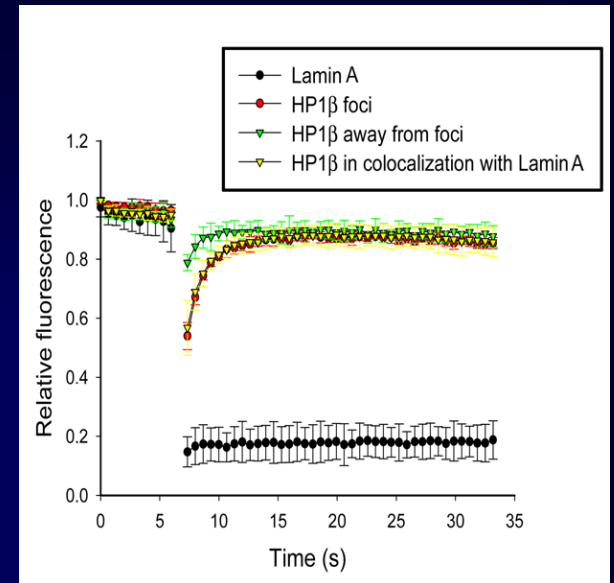
lamin A/C and lamin B



GFP-HP1 β / mCherry-Lamin A

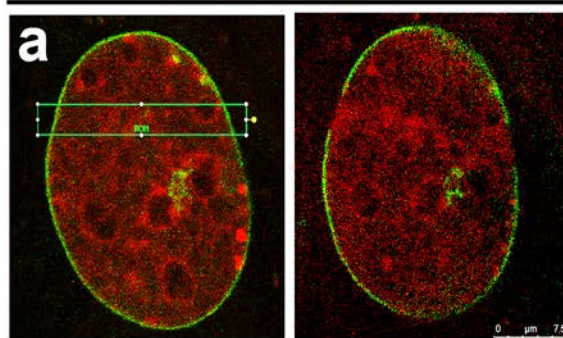


FRAP data

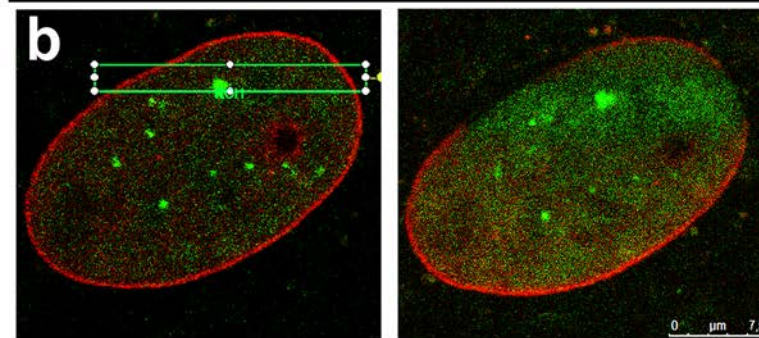


Experiments: Petra Sehnalová

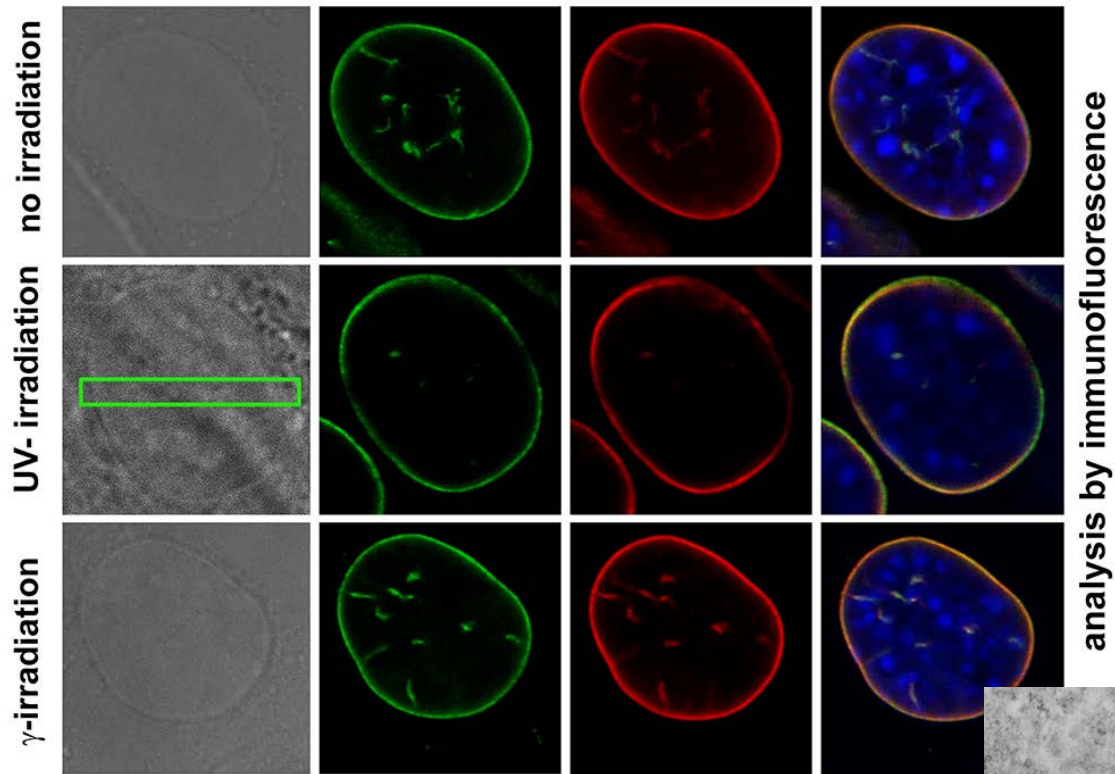
GFP-Lamin A RFP-53BP1



GFP-BMI1 / mCherry-Lamin A

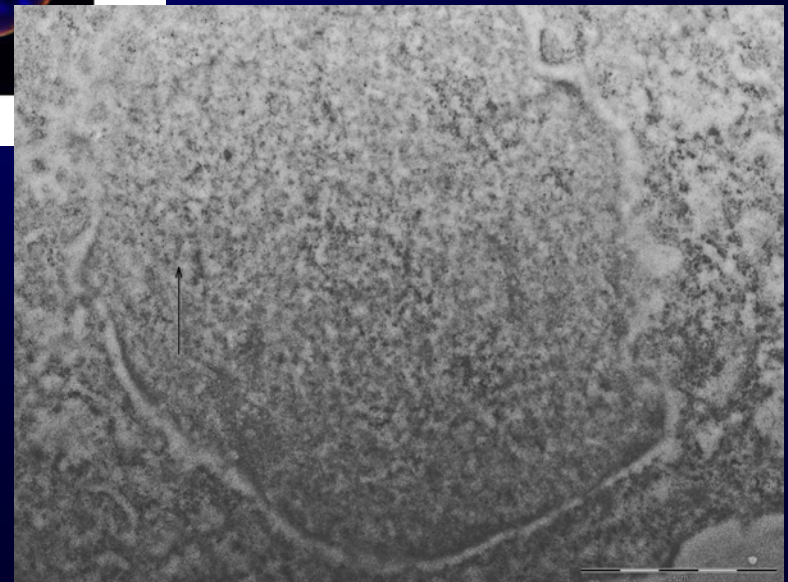


lamin B and lamin A/C / DNA



EM: dr. Dušan Cmarko

Experiments: Soňa Legartová and Petra Sehnalová



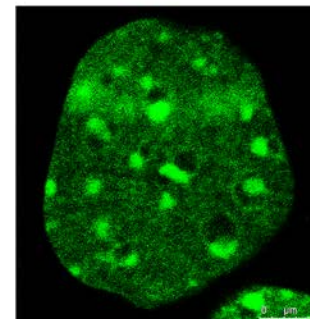
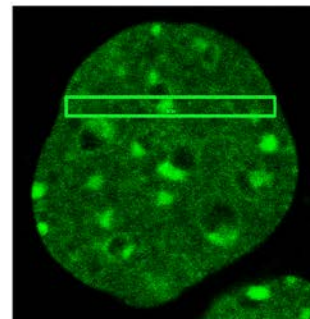
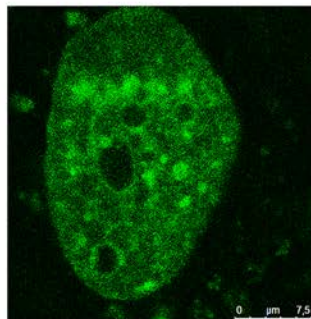
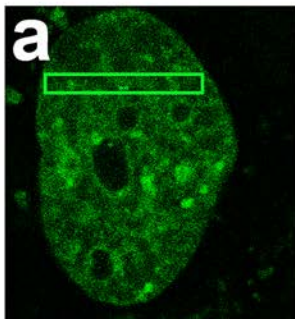
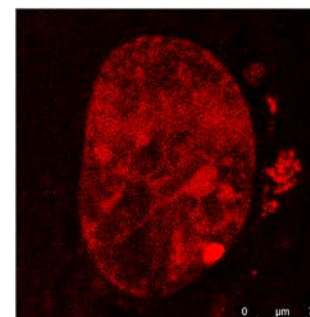
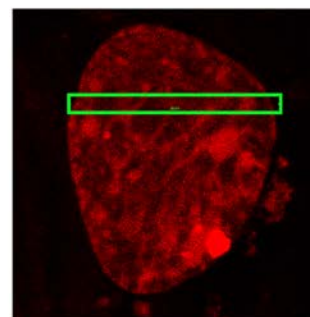
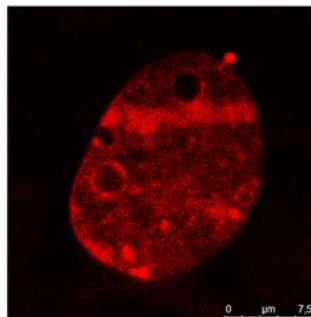
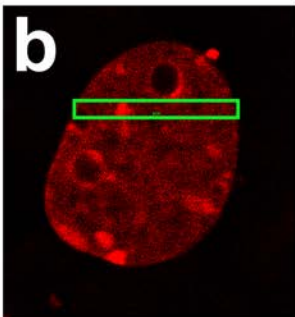
A*Imna* (wt)*Imna* (dn)

before irradi.

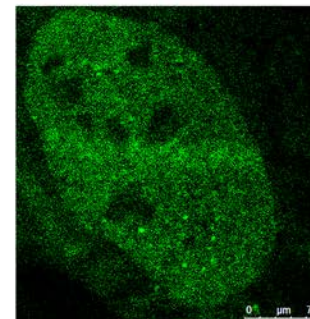
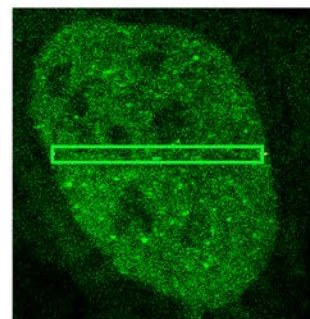
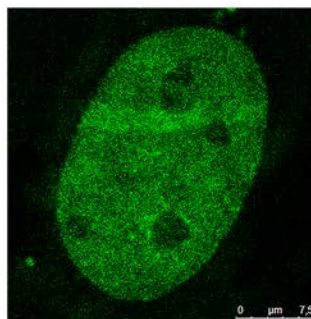
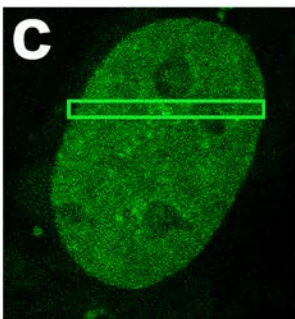
after irradi.

before irradi.

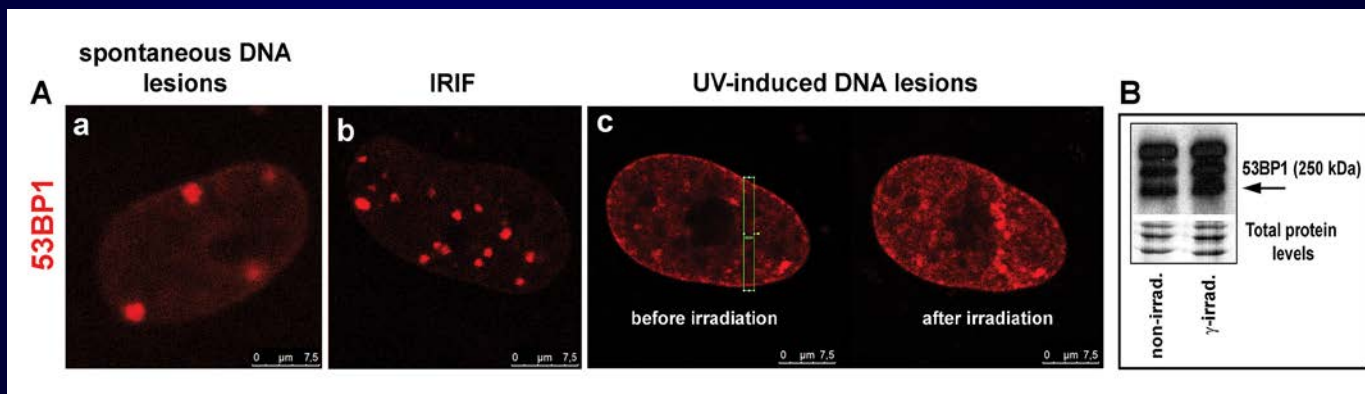
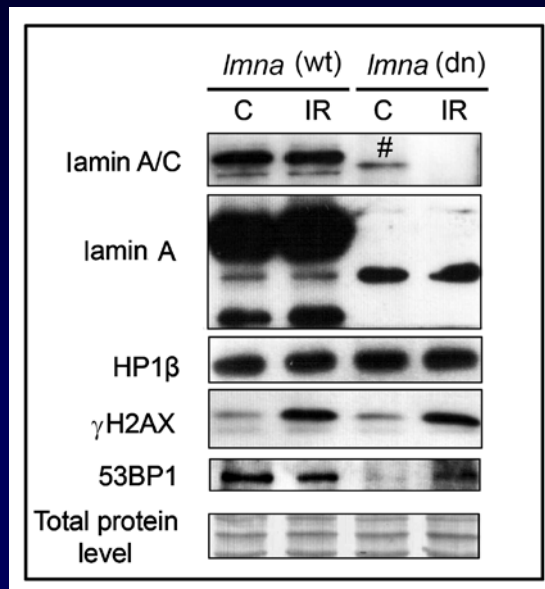
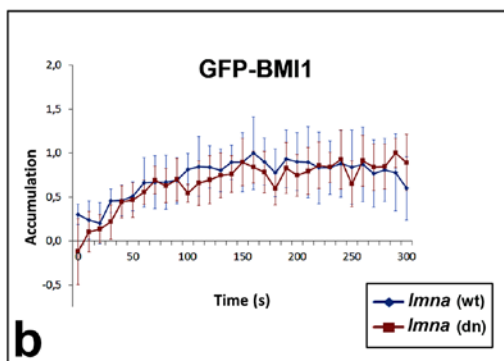
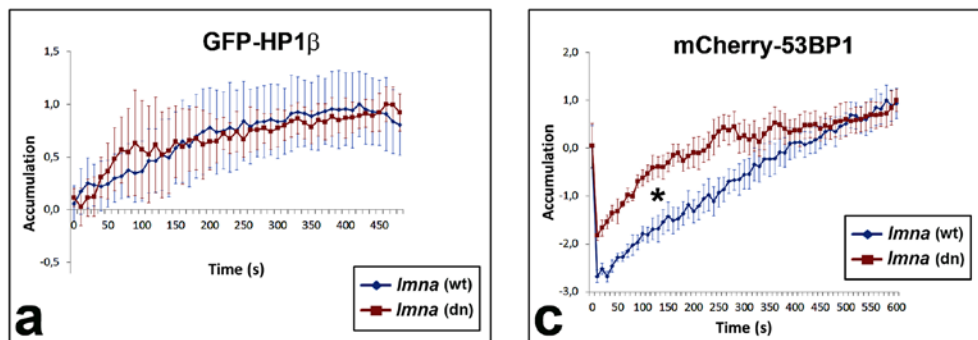
after irradi.

GFP-HP1 β mCherry-
53BP1

GFP-BMI1



Fluorescence intensity in DNA lesions



Experiments: Petra Sehnalová and Veronika Foltánková

Laminopatie

- Emery Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) – mutace v *LMNA* (autozomálně dominantní), v emerinu (recesivní)
- jiné příznaky než u myší až po 4-5 letech
- Dilated cardiomyopathy (DCM)
- Familiar partial lipodystrophy (FPLD)
- Limb girdle muscular dystrophy (LGMD)
- asi 50 mutací v *LMNA* (bodové mutace, delece, nonsense mutace,...)



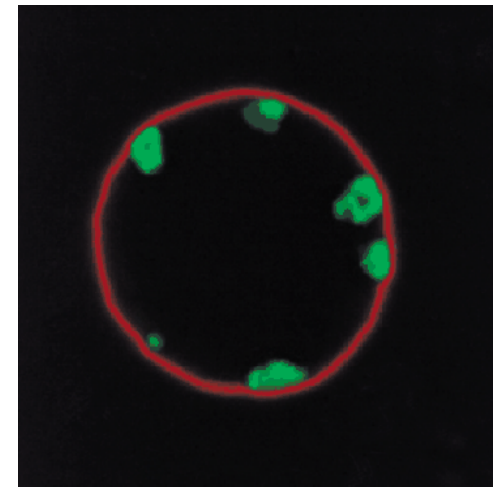
Laminopathies

- loss of heterochromatin in HPGS patients (epigenetic marks, Goldman et al.)
- nuclei from old people have similar defects as HGPS patients (Scaffidi and Misteli) – including changes in histone modifications and increased DNA damage
- direct link between heterochromatinization defects leading to HGPS, and ageing

Lamin A and nuclear lamina-dependent epigenetic alterations are involved not only in nuclear envelopathies but also in the physiological processes of ageing.

Laminy a chromatin

- interakce laminů a LAPs s chromatinem
- vazba laminů na sekvence DNA v místech matrix attachment regions (**MARs**) a scaffold attachment regions (**SARs**)
- stabilní navázání LAPs vyžaduje LEM doménu (oblast 43 aminokyselin)
- ovlivnění organizace chromatinu a tím i aktivity genů



R.D. Goldman et al., 2002



Scaffold

GENOM JE SBÍRKOU PŘESNĚ ORGANIZOVANÝCH SMYČEK

- A) proteiny jaderné **matrix** vytvářejí specifické vazebné body, na kterých je přichycena DNA. Výsledkem je lokalizovaná topografie, která ovlivňuje genomové regulace a procesy. Existence jaderné matrix je neustále diskutována, stejně tak teorie „chromatin self-organization“
- B) spojení histonů a jiný pozitivně nabitých proteinů s negativně nabitou DNA zajišťuje větší flexibilitu DNA.
- C) chromatin utváří strukturální organizaci genomu.

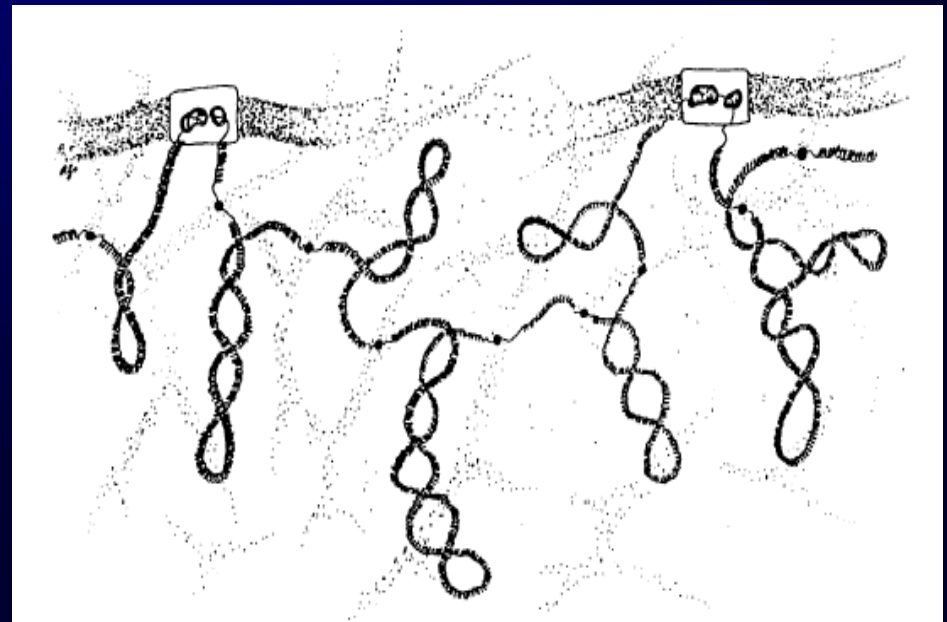
Existuje tak zvaný „**radial loop model**“. V tomto modelu, velká chromatinová vlákna tvoří smyčky, které jsou uspořádány do chromosomů. Oblast, kde přiléhá DNA k proteinovému lešení „scaffold“ se nazývá scaffold attachment region.

Scaffold je dynamická struktura, která rozhoduje o vysoce organizovaném uspořádání vláken chromatinu. Scaffold je flexibilní struktura schopná relaxace i velmi těsné kondenzace. Mnoho proteinů jaderné matrix je důležitých pro fyziologickou kondenzaci chromozómů, například při mitóze, diferenciaci a apoptóze.

Další komponent scaffoldu je enzym **topoizomeráza II** (topo II). Má svou nezastupitelnou funkci v kondenzaci/dekondenzaci chromatinových smyček. Preferenčně se váže na AT bohaté oblasti. DNA je bohatá na AT oblasti a bylo zjištěno, že AT sekvence se vyskytují podél os chromosomů.

Mnoho experimentů bylo orientováno na izolaci jaderné matrix a podle metody a zjištěných skutečností bylo publikováno několik názvů oblastí jaderné matrix:

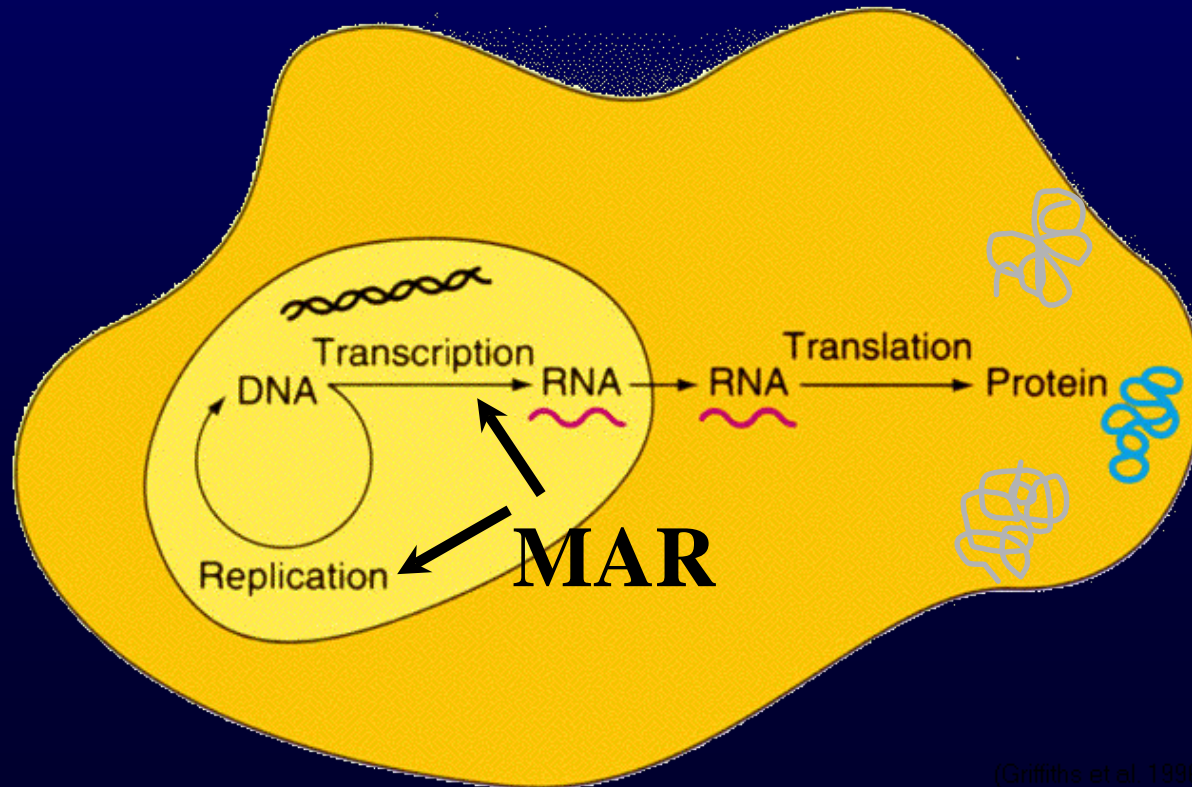
- A1) Scaffold Attachment Region (SARs)
- B2) Matrix attachment regions (MARs)
- C3) Loop basement attachment regions (LBARs)



LBARs

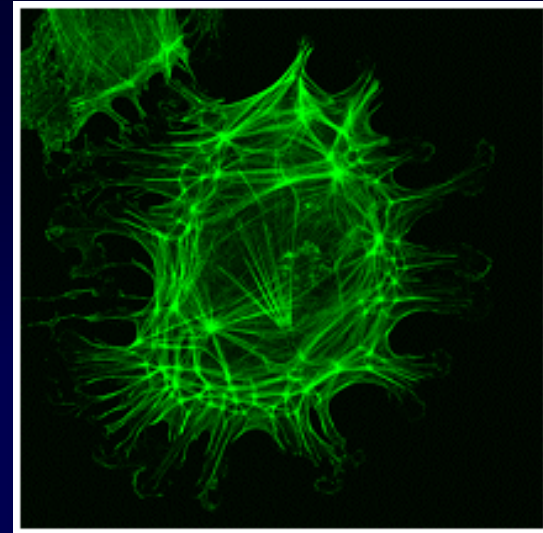
Function of MARs

- Facilitate the processes of **gene expression** and **DNA replication**



Shrnutí problematiky:

- 1. Struktura a funkce cytoskeletu.**
- 2. Hlavní proteiny cytoskeletu.**
- 3. Laminy a další proteiny jaderného skeletu.**
- 4. Jaderná matrix.**
- 5. Oblasti MARs, SARs a LBARs a jejich funkce.**



- 1. <http://www.youtube.com/watch?v=5rqbmLiSkpk>**
- 2. <http://www.youtube.com/watch?v=vCqQLoRaTNA&feature=relmfu>**
- 3. <http://www.youtube.com/watch?v=JShwXBWGMYY&feature=relmfu>**