

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 filaments extending from the nucleus.

Eva Bártová
Biofyzikální ústav AV ČR Brno

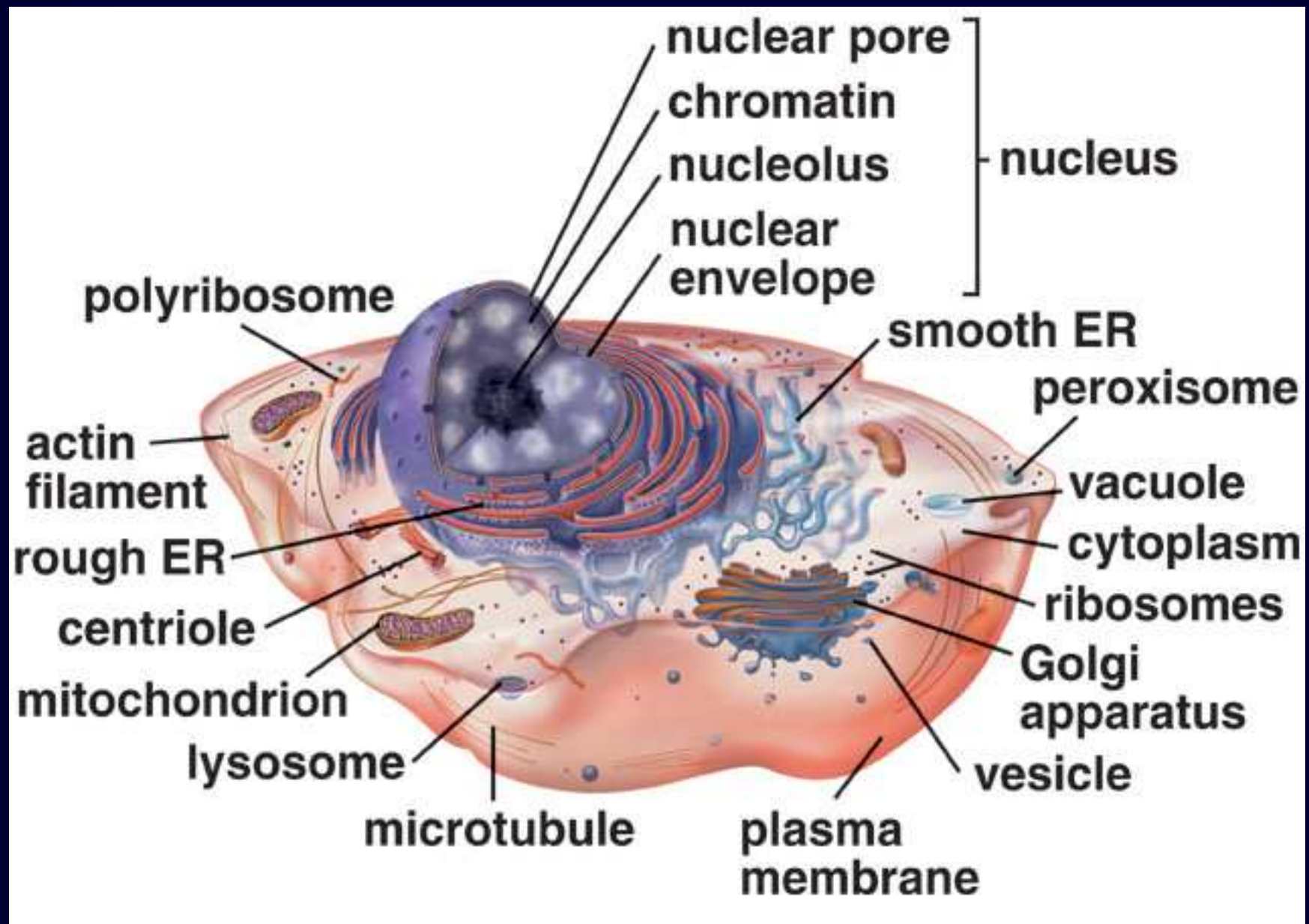
Eukaryotic Cells

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

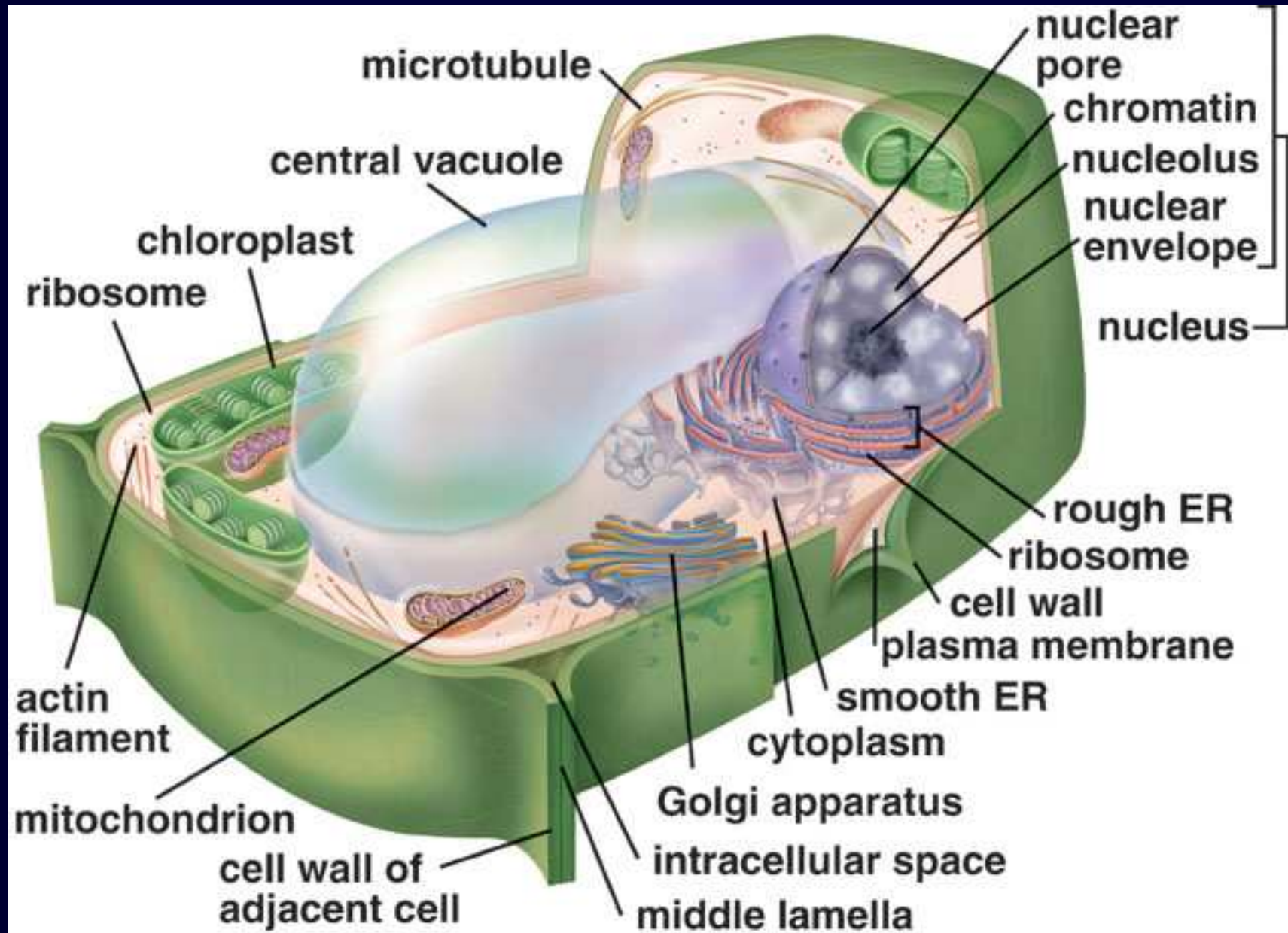
Eukaryotic cells have membrane bound intracellular organelles.

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

Animal cell anatomy



Plant 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:**

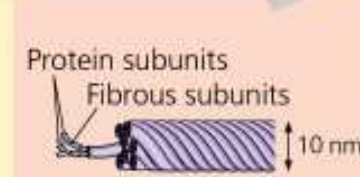
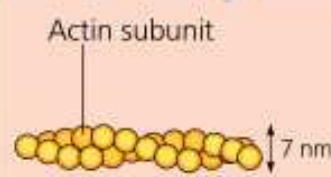
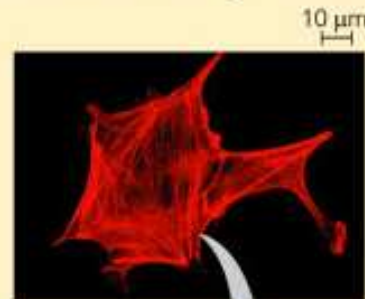
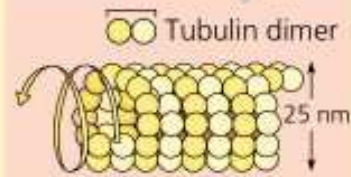
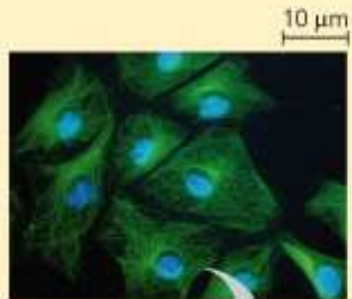
A) AKTINOVÁ FILAMENTA (aktin)

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.

1) AKTINOVÁ FILAMENTA (mikrofilamenta)

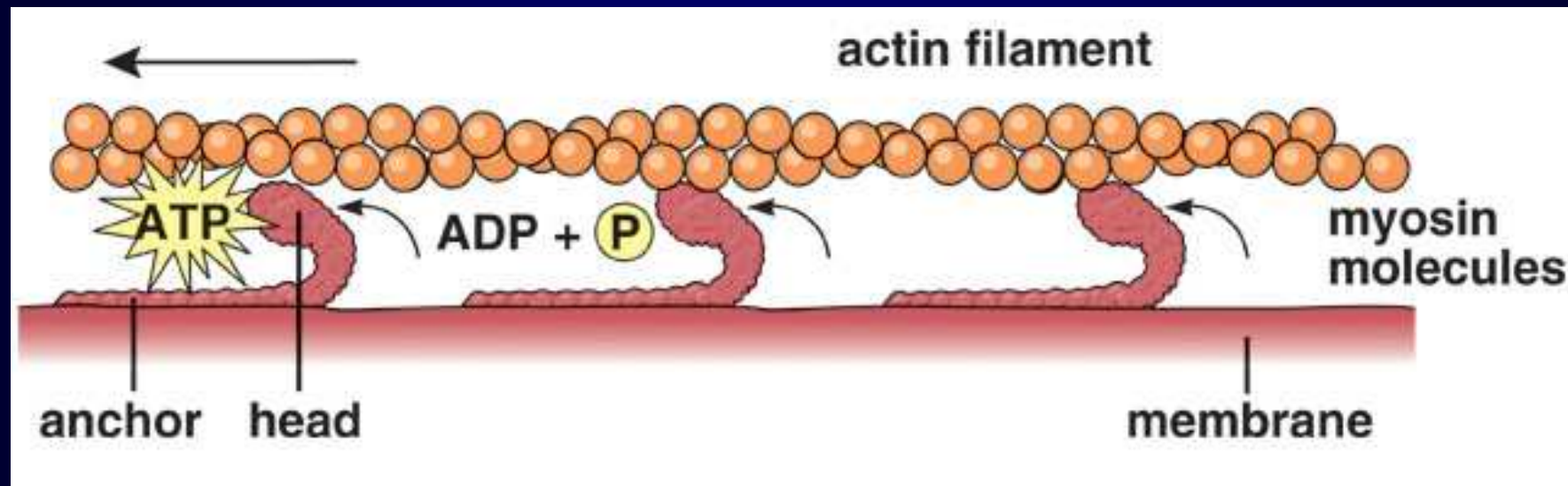
sou dvoustranné helikální polymery tvořené proteinem aktinem. Jeví se jako flexibilní struktury s průměrem 5-9nm. Jsou organizovány do dvoudimenzionálních sítí. Jsou roztaženy po celé buňce, ale nejvíce jsou roztaženy v kortexu, těsně pod plasmatickou membránou.

2) MIKROTUBULY

sou 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.

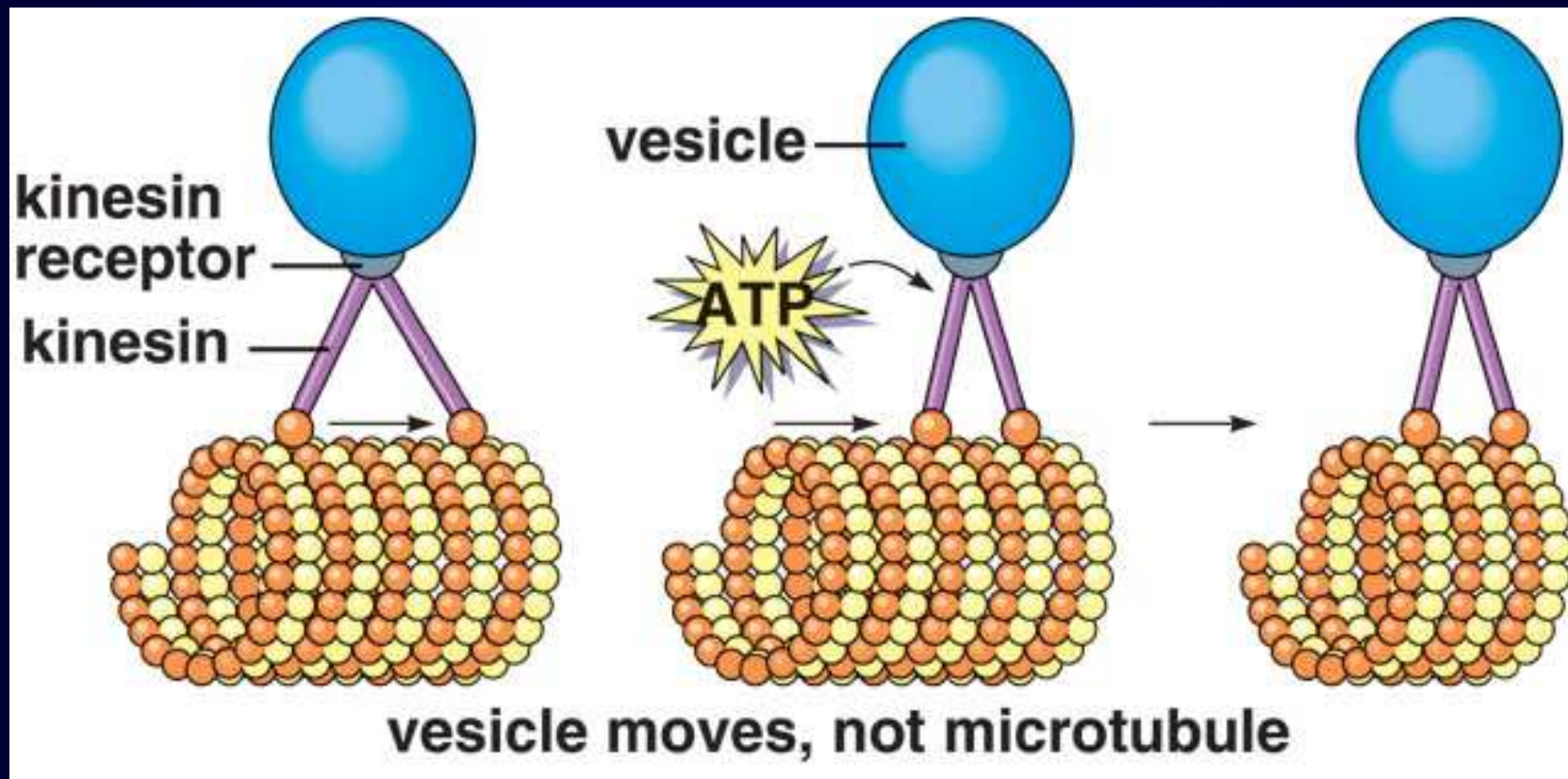
Actin filaments occur in bundles or mesh-like networks.

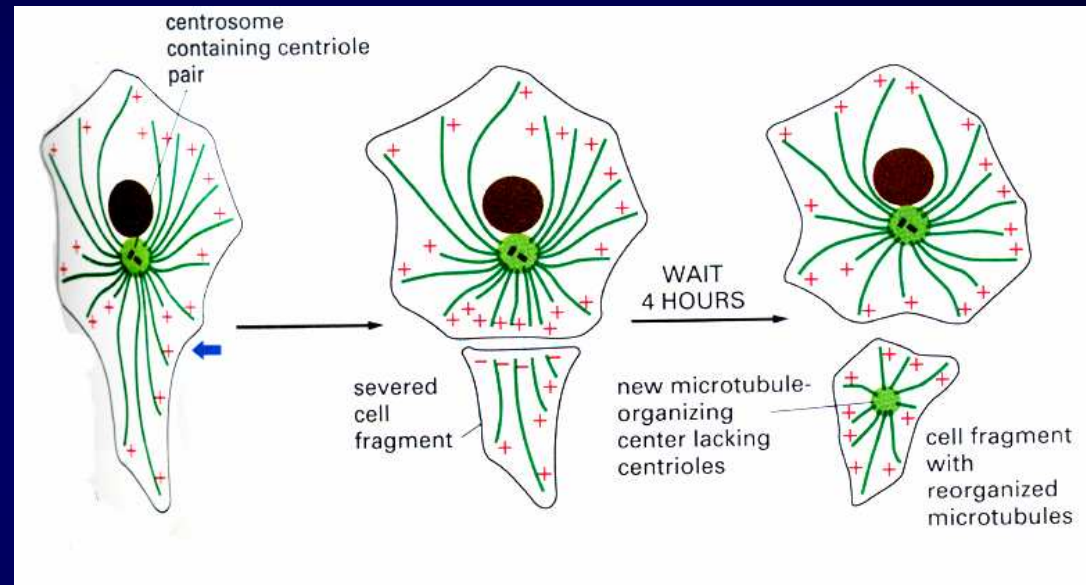
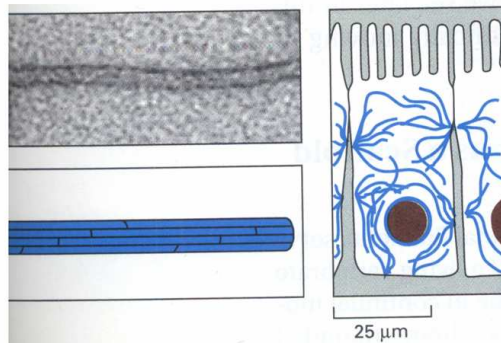
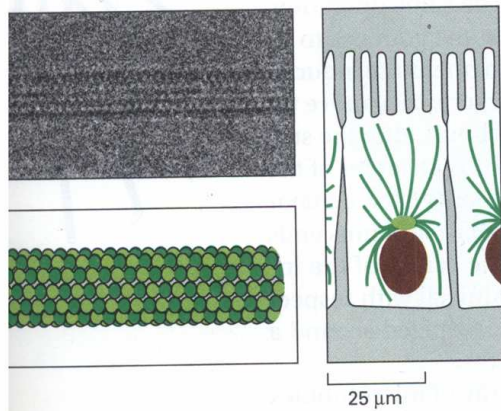
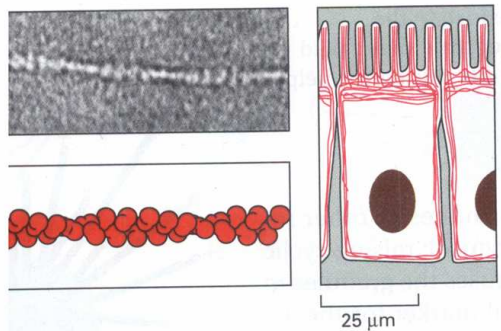
Actin filaments play a structural role in intestinal microvilli and also interact with motor molecules, such as myosin.



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.

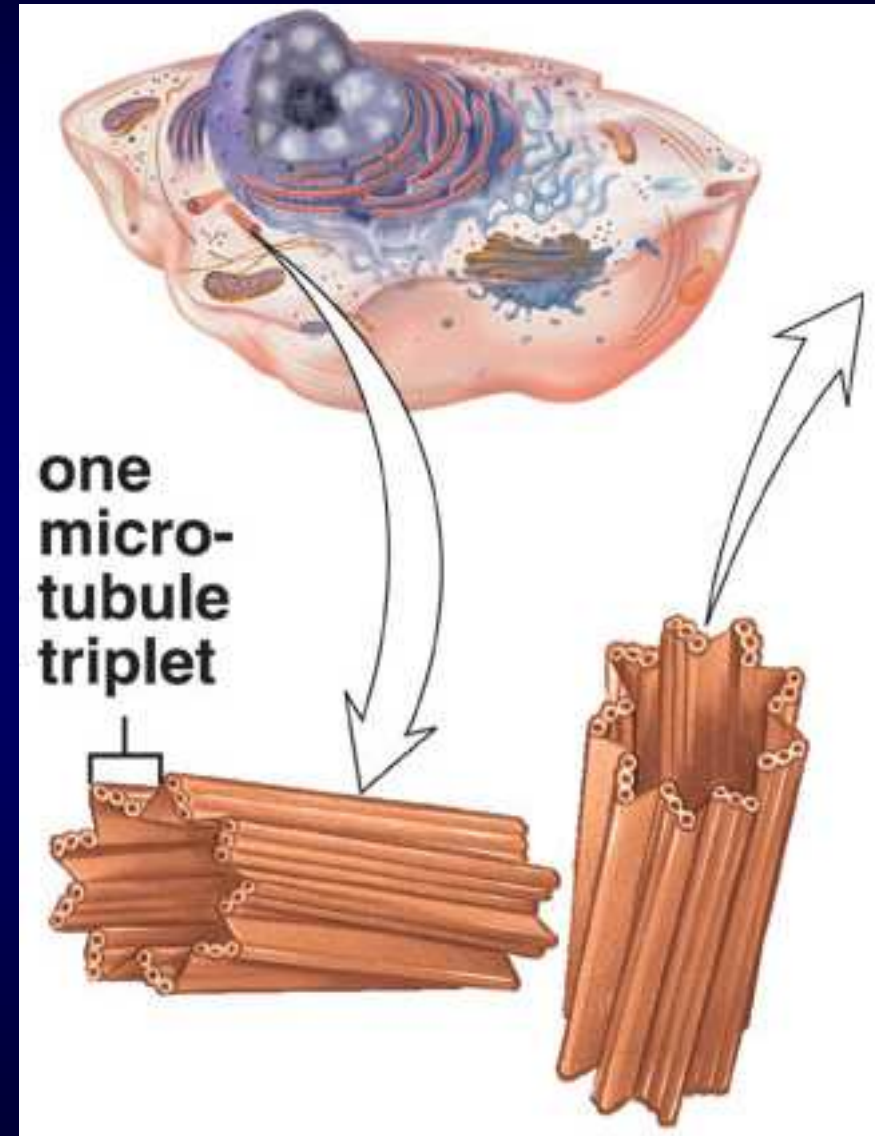




Centrioles

Centrioles are short cylinders with a 9 + 0 pattern of microtubule triplets.

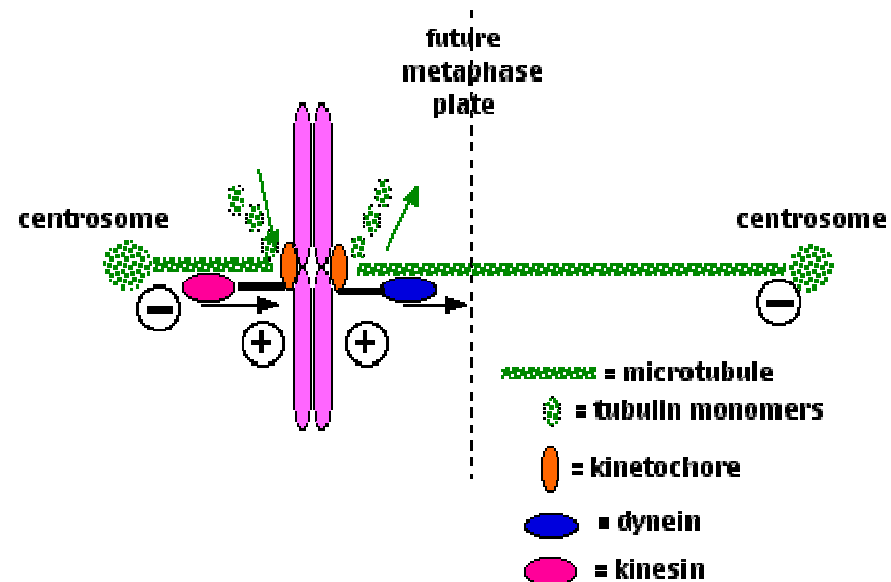
Centrioles may be involved in microtubule formation and disassembly during cell division and in the organization of cilia and flagella.



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.
-

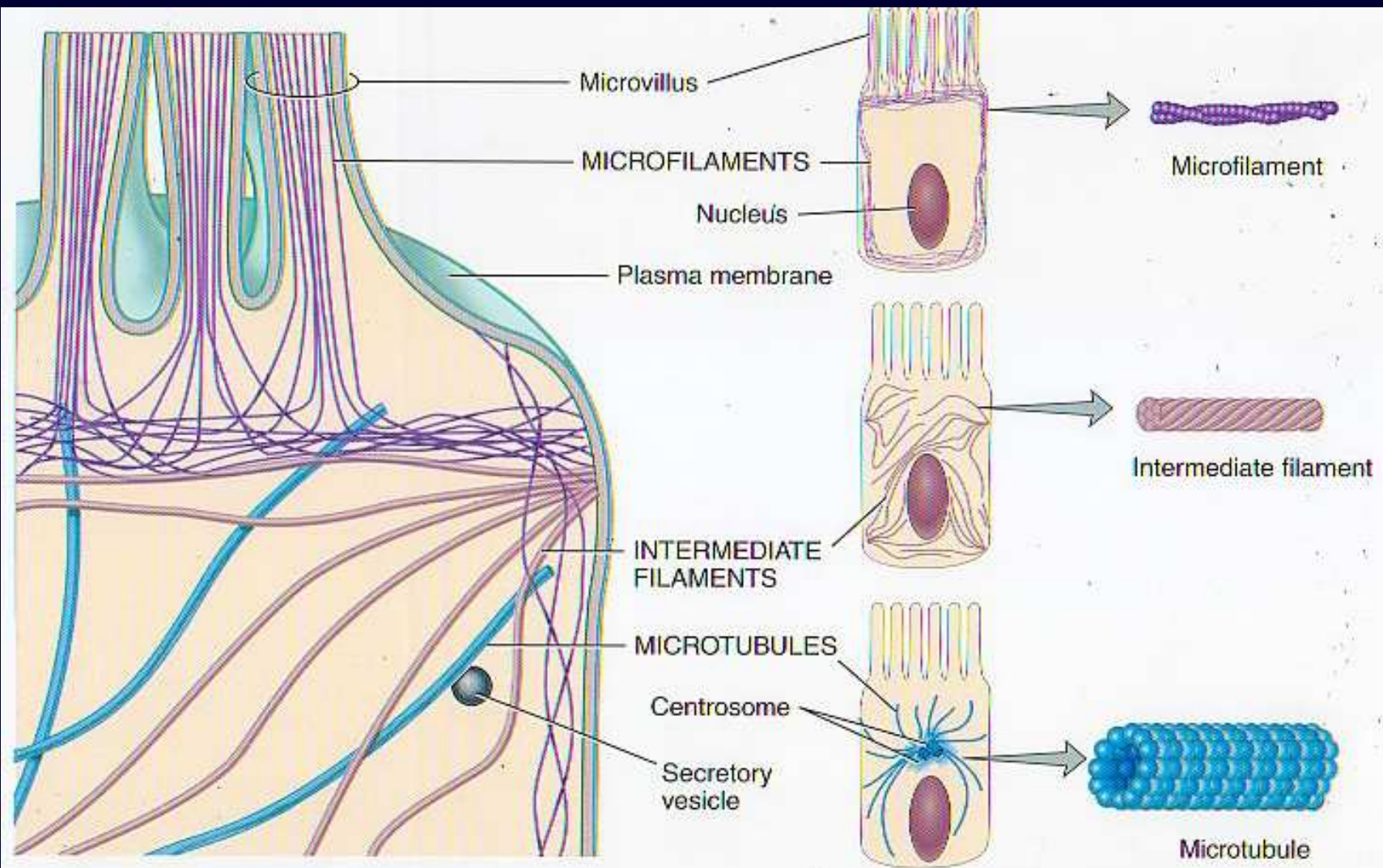


3) INTERMEDIÁLNÍ FILAMENTA

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.

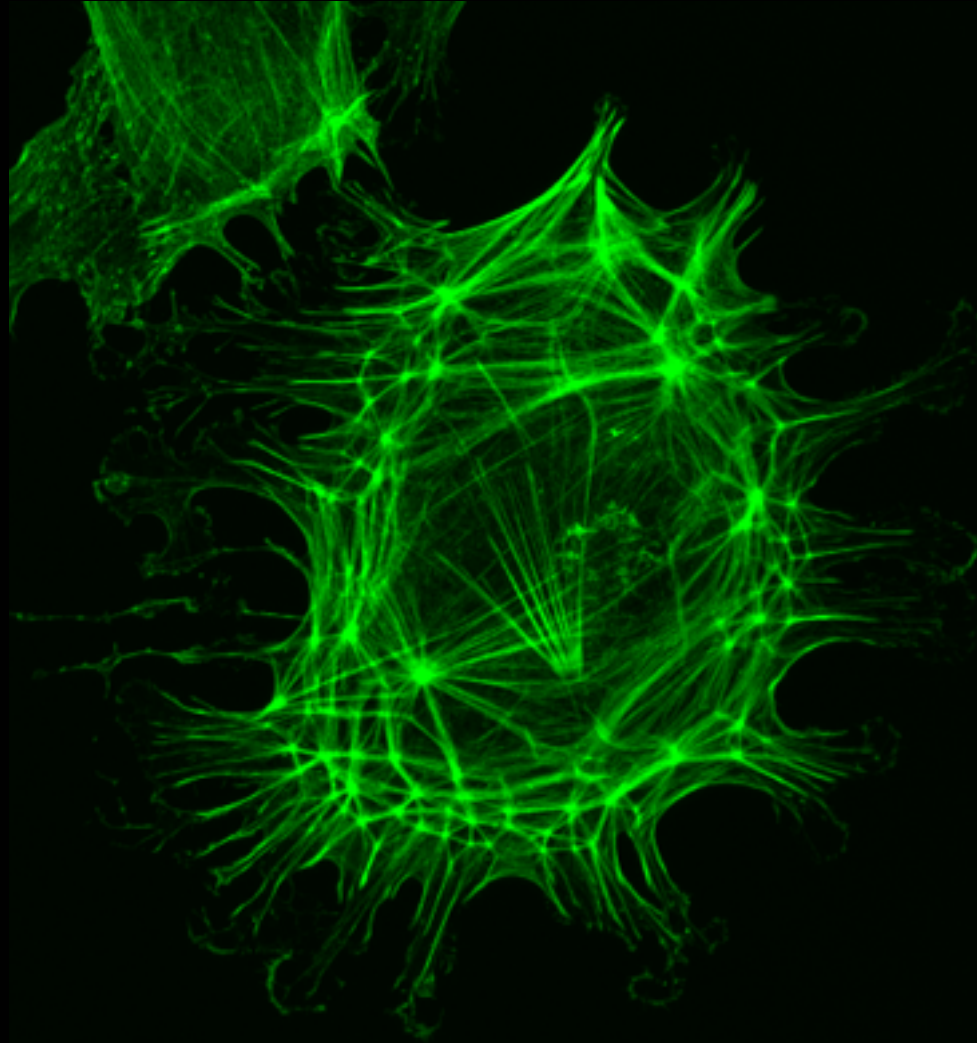
- **keratins** are found in epithelial cells and also form hair and nails;
- **nuclear lamins** form a meshwork that stabilizes the inner membrane of the nuclear envelope;
- **neurofilaments** strengthen the long axons of neurons;
- **vimentins** provide mechanical strength to muscle (and other) cells.



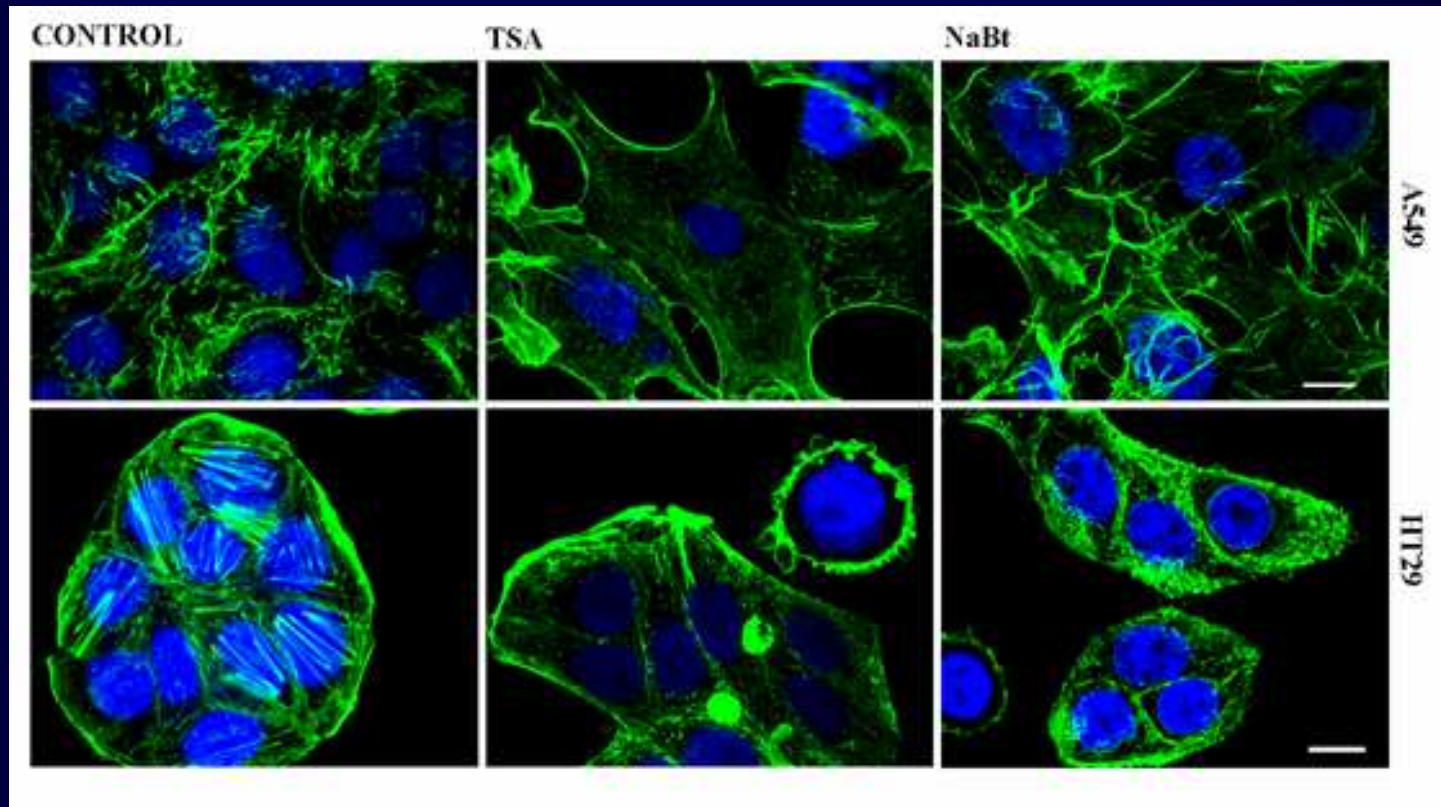
(a) Overview of cytoskeleton

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

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



F-actin



Structure of the Nucleus

Chromatin: DNA and proteins

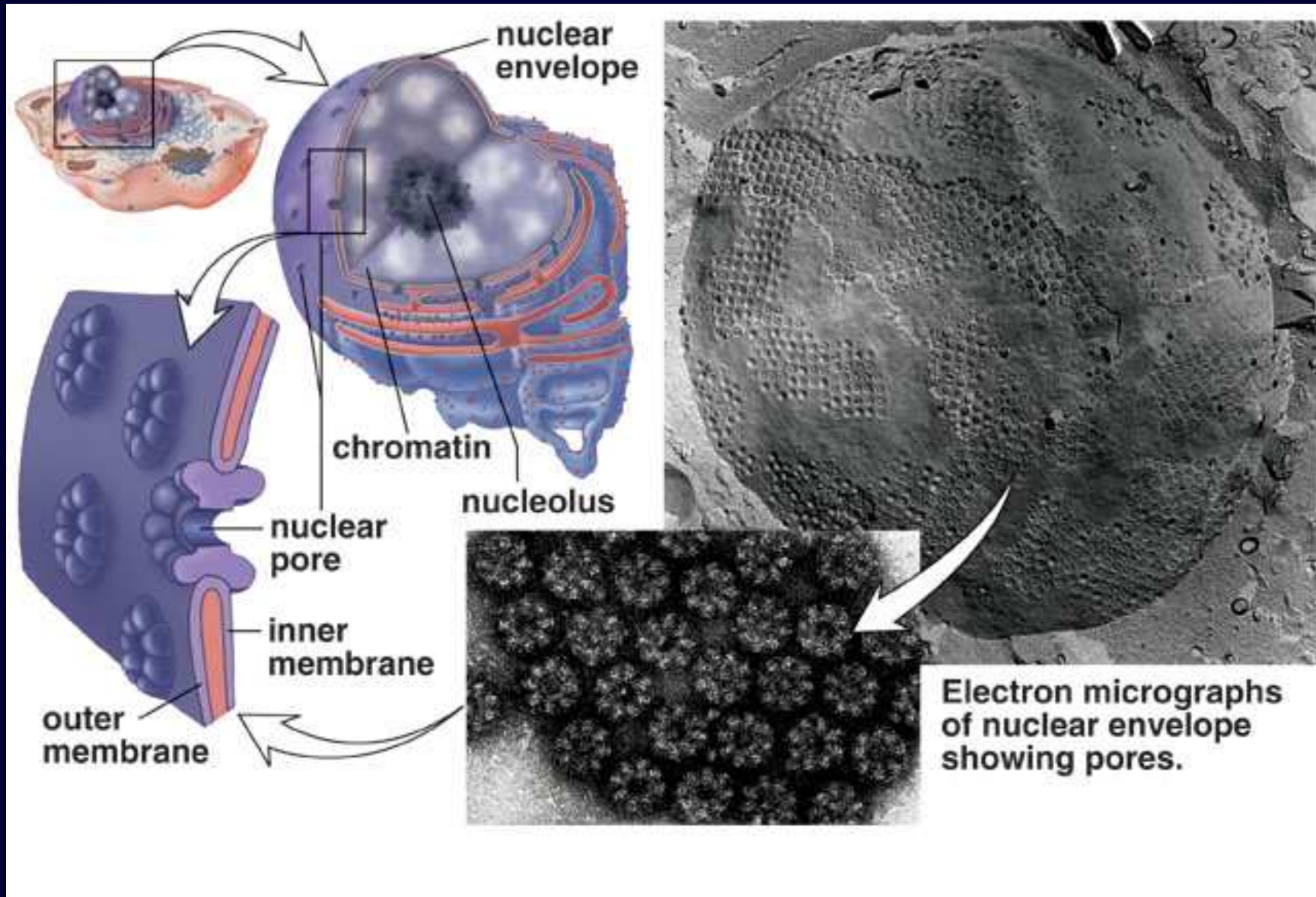
Nucleolus: Chromatin and ribosomal subunits

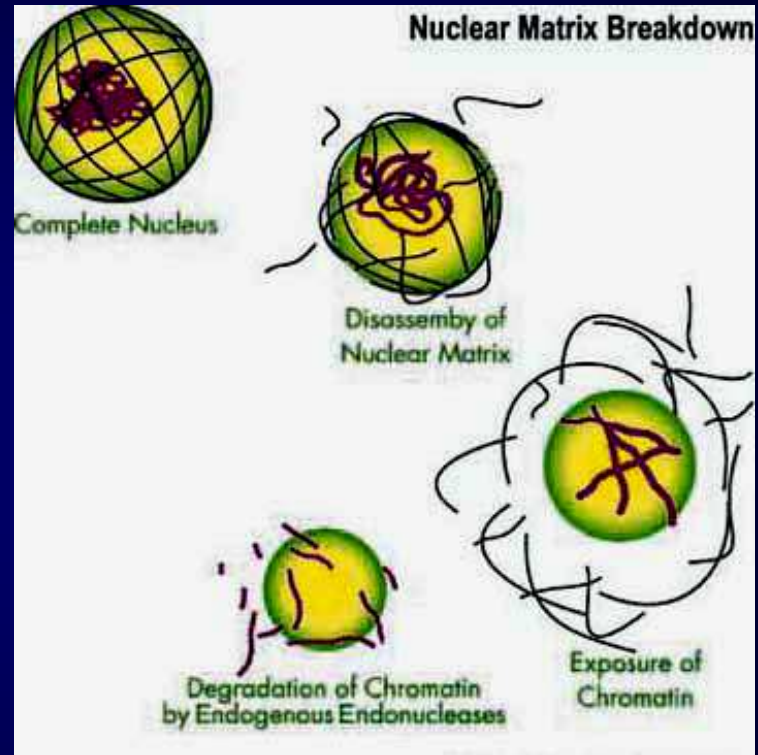
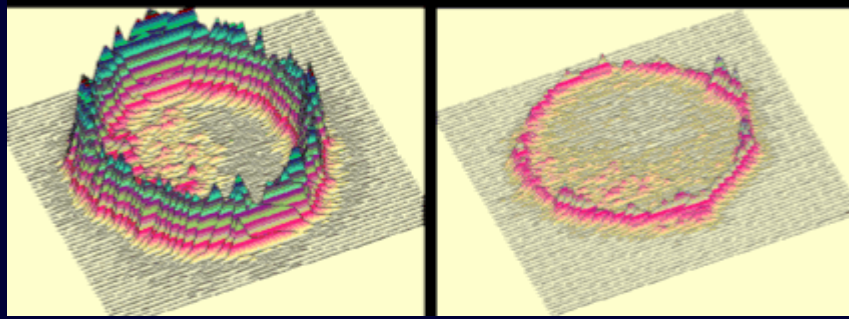
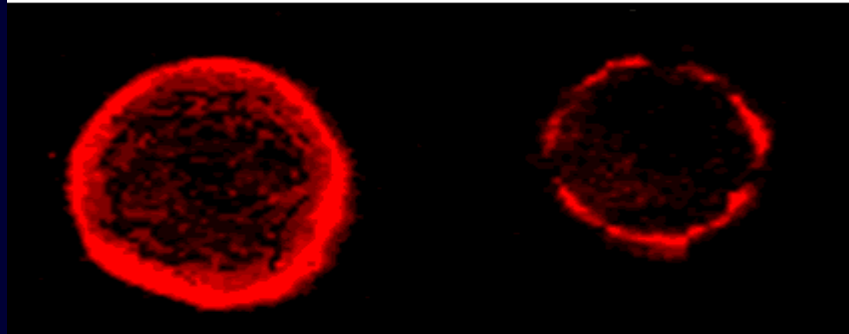
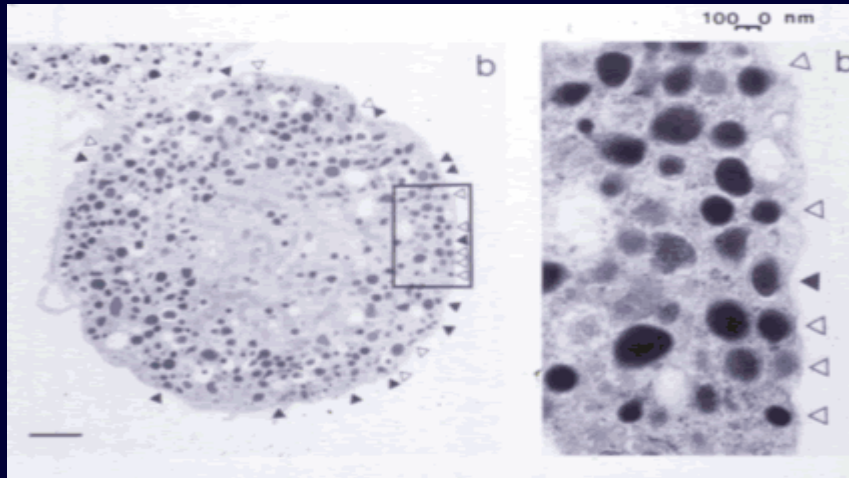
Nuclear envelope: Double membrane with pores

Nucleoplasm: Semifluid medium inside the nucleus.

Nuclear matrix: Protein structure

The nucleus and the nuclear envelope



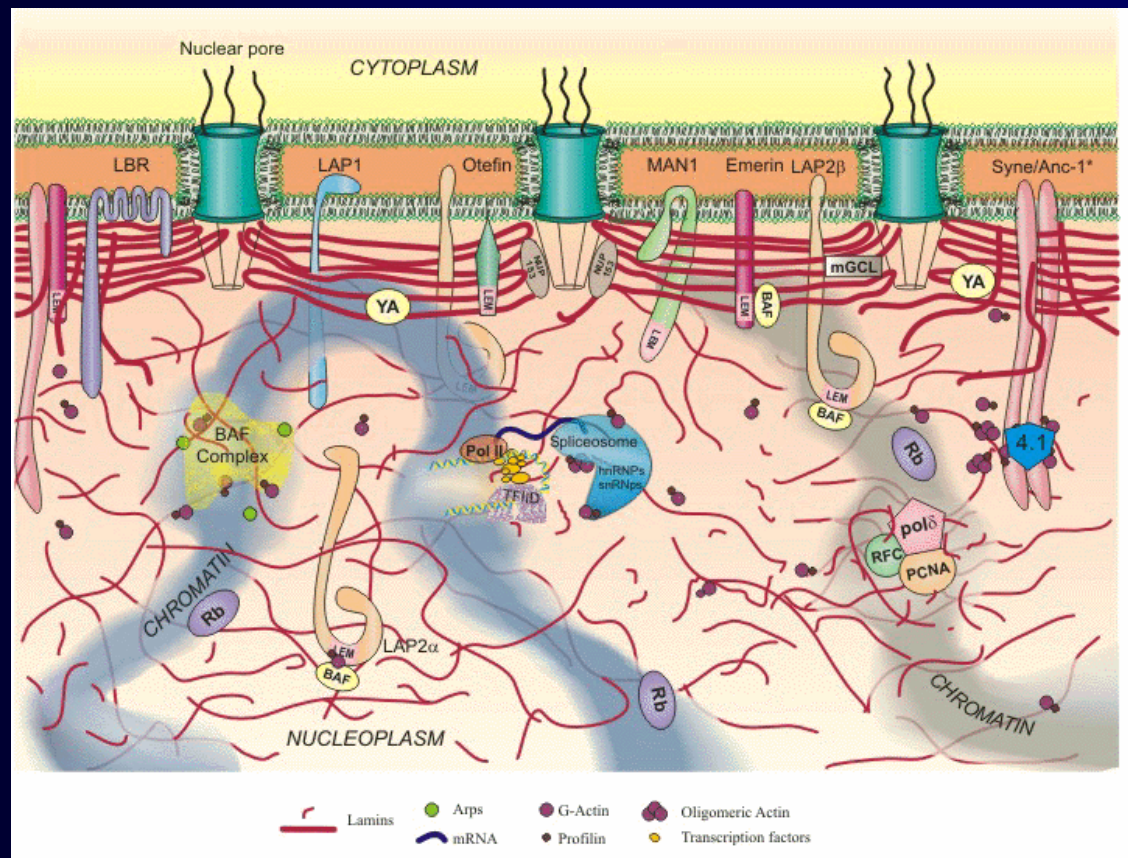


Laminy a další proteiny jsou složky jaderné membrány. Byl podán důkaz, přítomnosti laminů i v nukleoplasmě. Proteiny typu laminů jsou zodpovědny za jadernou architekturu, z důvodů jejich kontaktu se strukturami chromatinu. Tyto vzájemné vztahy se mění během buněčného cyklu a diferenciaci.

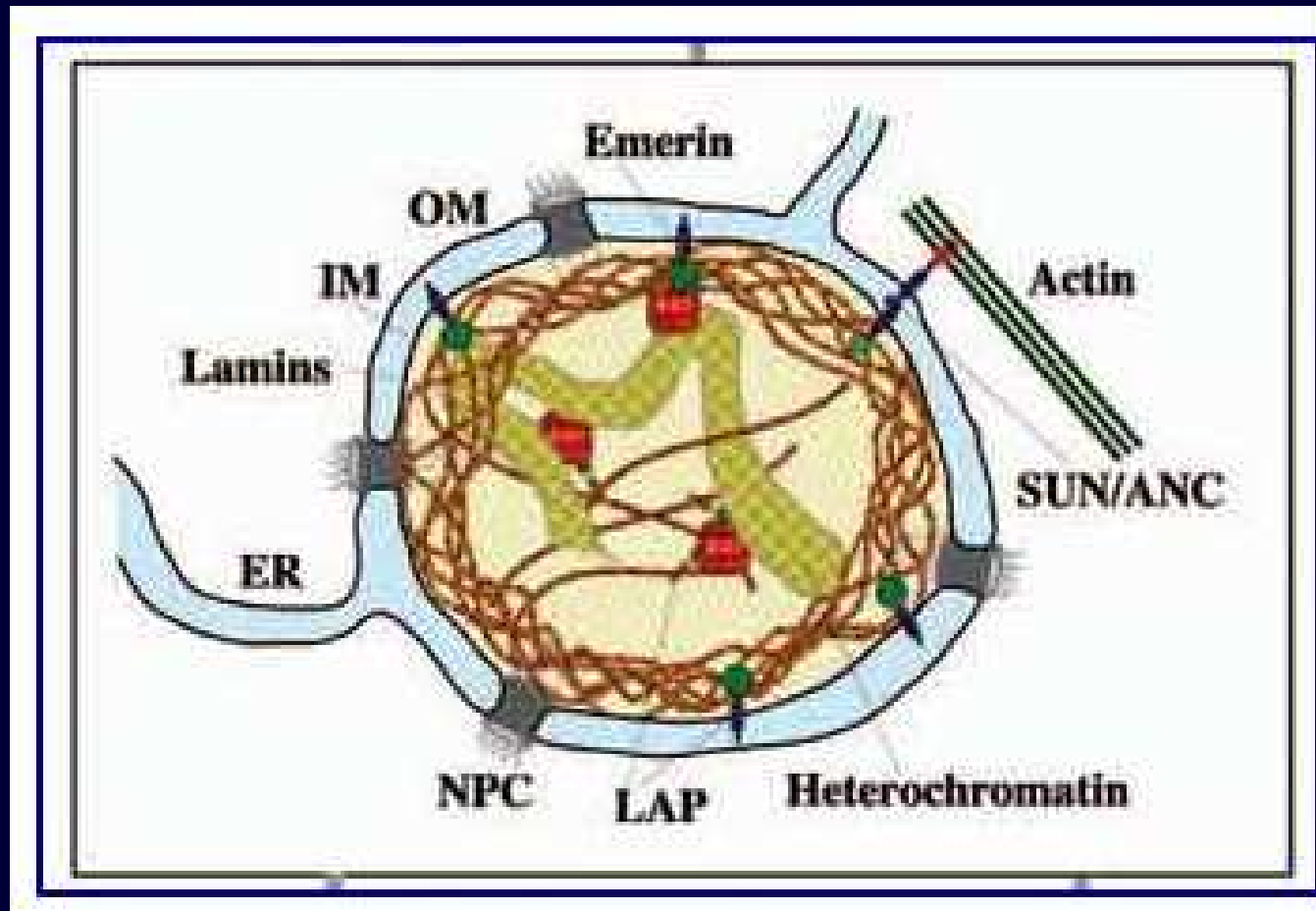
Změny v expresi laminů (A, B1, B2) korelují se změna v buněčné diferenciaci, s vývojově-závislými změnami a se změnami v expresních profilech, které probíhají během zmíněných procesů.

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.

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 regulátor 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.

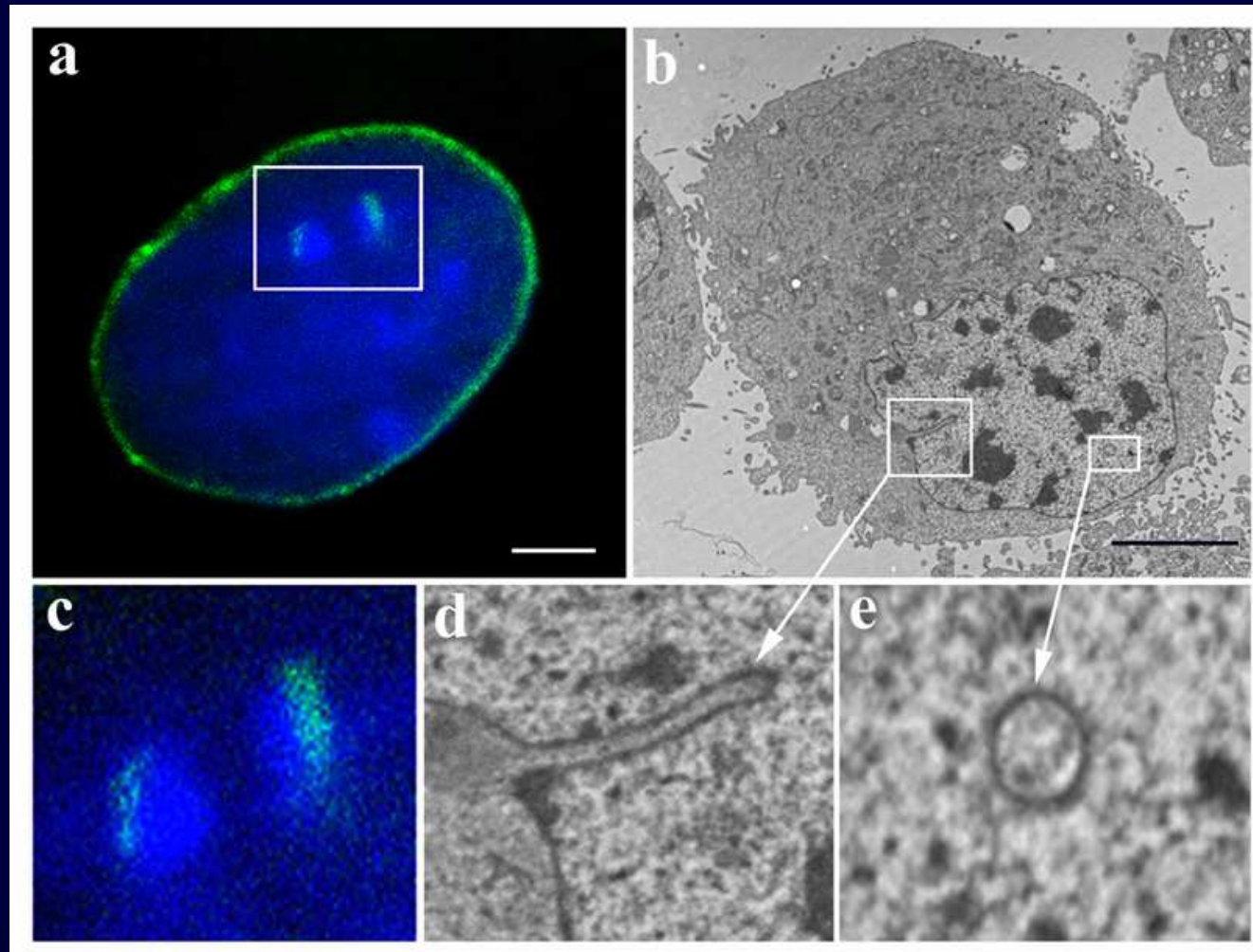


Z tohoto faktu je zřejmé, že proteiny jaderné slupky ovlivňují strukturu chromatinu.

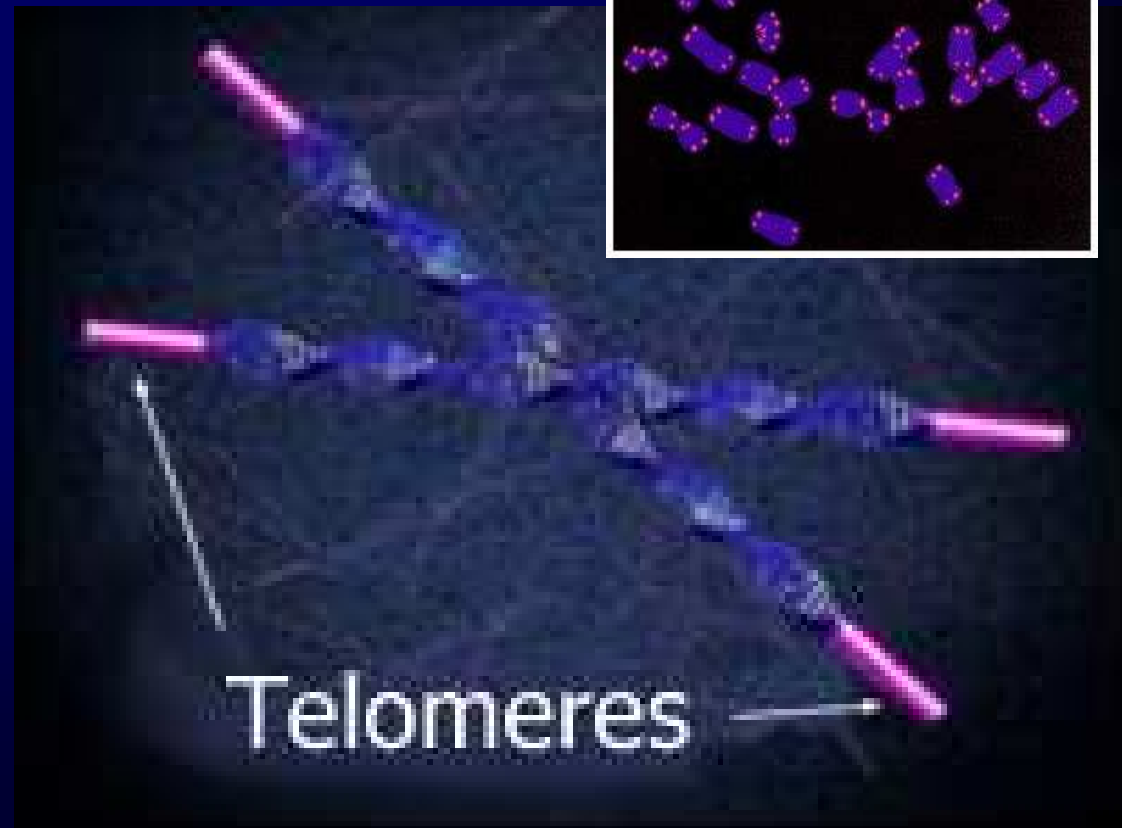
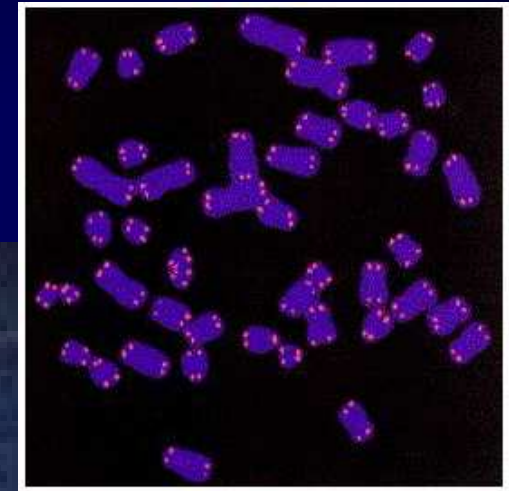
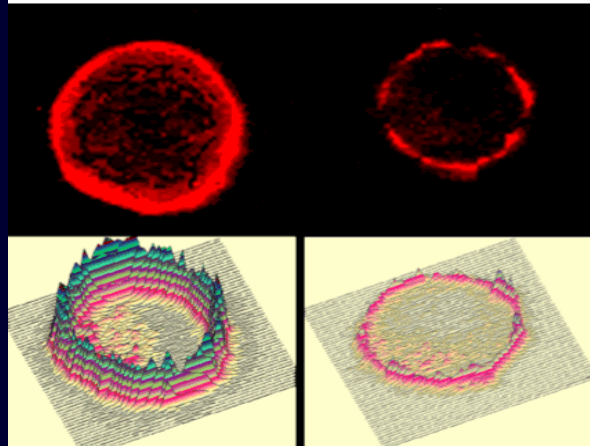
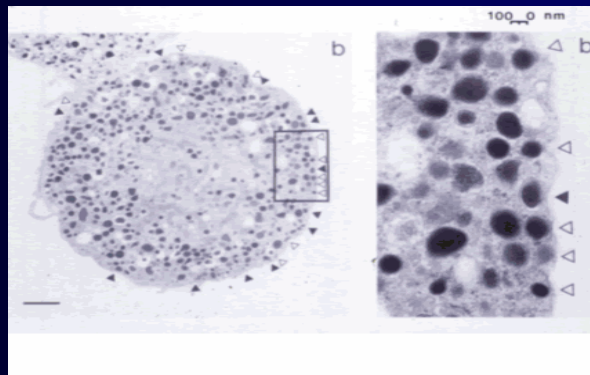


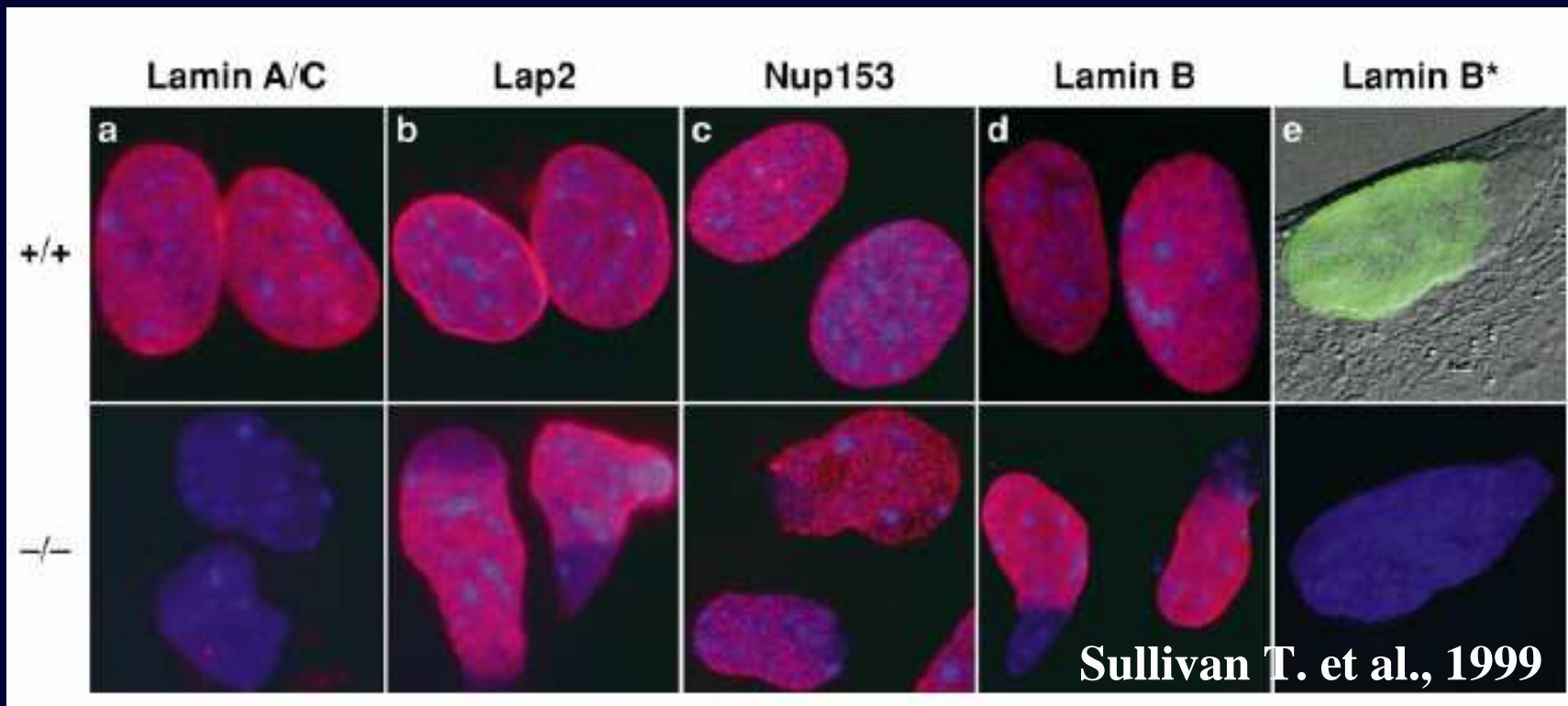
Laminy- intermediální filamenta (IF), komunikují s dalšími IF, jsou součástí tzv. nuclear lamina a tudíž i matrix, jsou zodpovědné za organizaci chromatinu.

Lamin B (green) and invagination of nuclear membrane



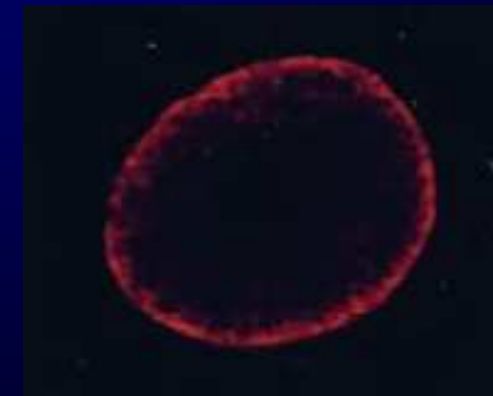
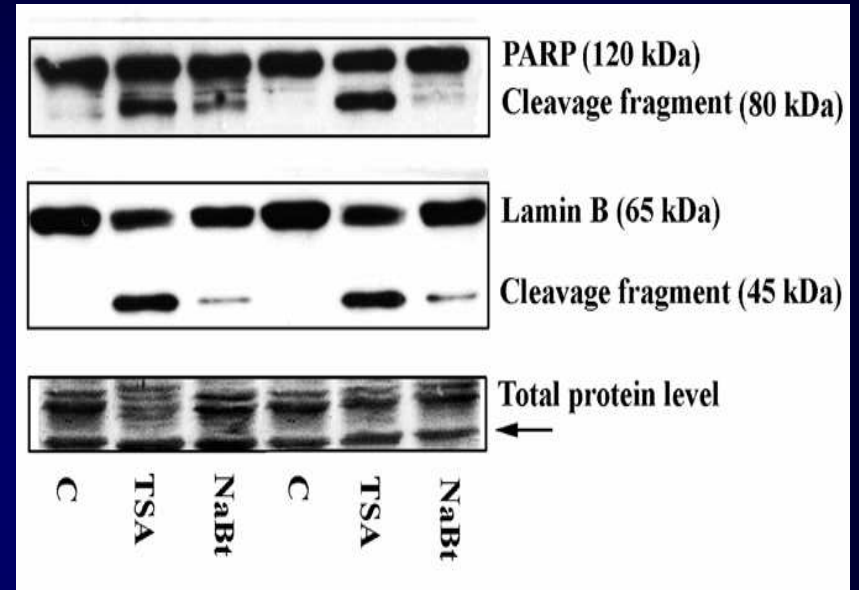
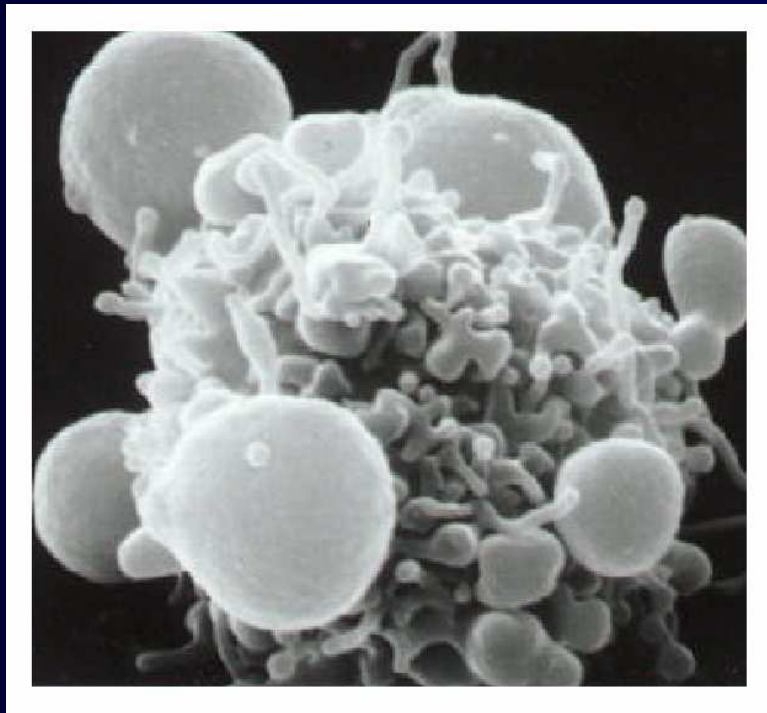
Laminy A/C se rovněž těsně dotýkají heterochromatických struktur jako jsou telomery a centromery, které jsou často umístěny v těsné blízkosti jaderné periferie





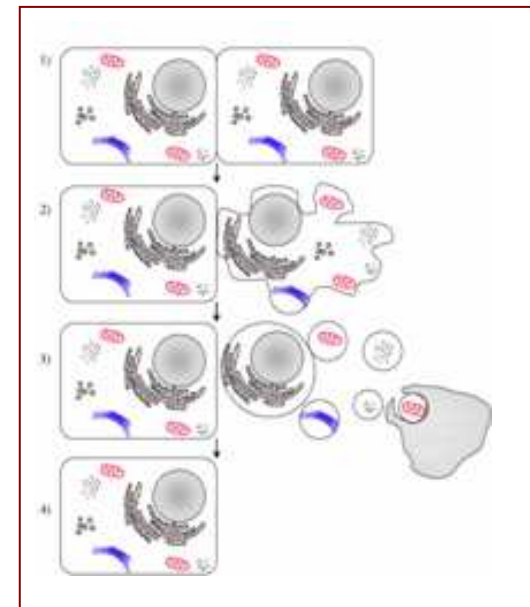
MEF buňky izolované z LA/C knock out myši – vhodný model ke studiu laminů. Ztráta LA/C není pro buňky fatální, ale RNAi vyblokováný LB – apoptóza (Večeřová J.). Ztráta LA/C neovlivňuje distribuci a morfologii „nuclear speckles“ a ani formování faktorů sestřihu (Večeřová et al., 2005). Z experimentů plyne,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

Apoptotic lamin B cleavage



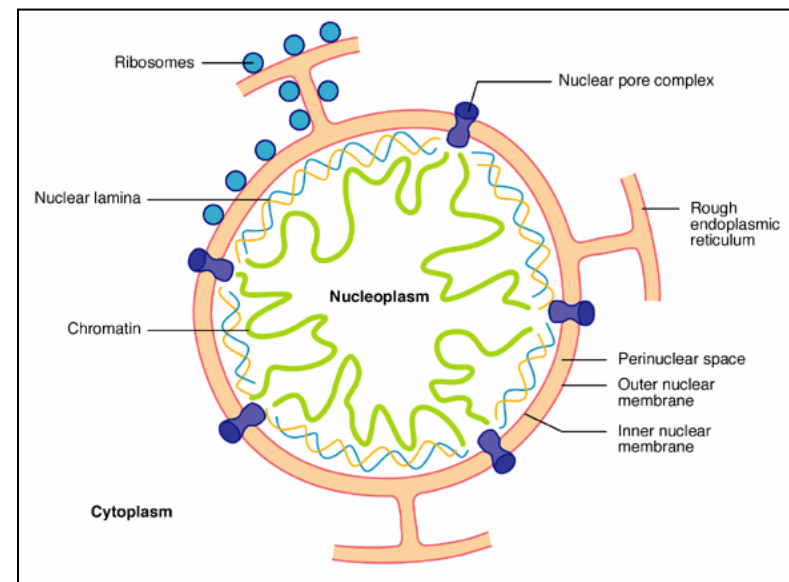
Laminy a apoptóza

- 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



Nuclear lamina and lamins

- connection between cytoplasm and genome
- mechanical stability for the NE and organizing of chromatin structure at the nuclear periphery
- essential role in chromatin and NPCs architecture and organization
- NE breakdown and reassembly mitosis
- DNA replication
- RNA polymerase II-dependent expression
- transcriptional repression
- laminopathies



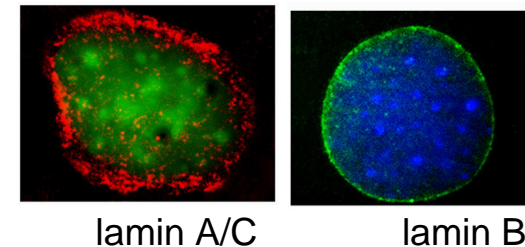
(Ellis and Maidment, 2002)

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

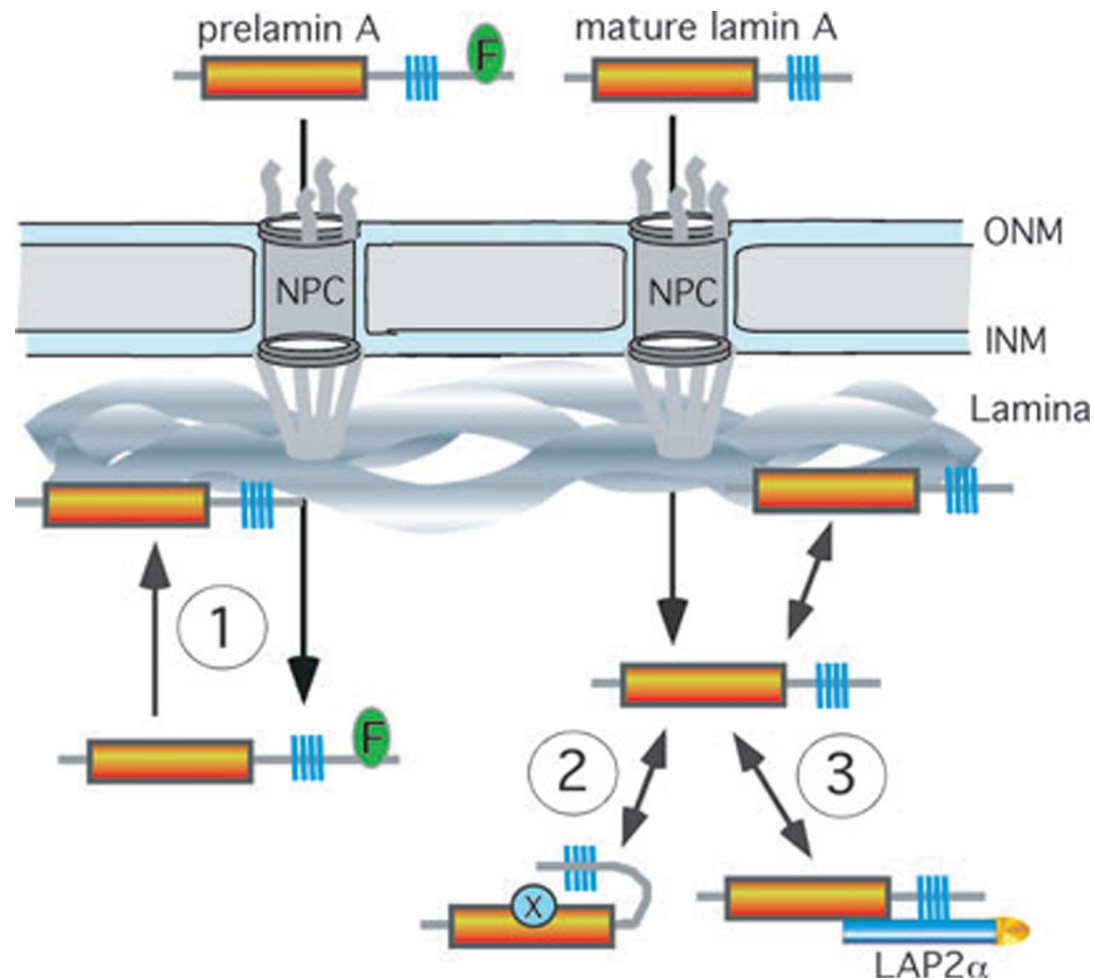
- short N-terminal „head“ domain (NH₂)
- long α -helical coiled-coil „rod“ domain
- globular „tail“ domain (COOH)



(E.C. Schirmer et al., 2001)

- nucleoplasmic pool of the lamin A

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

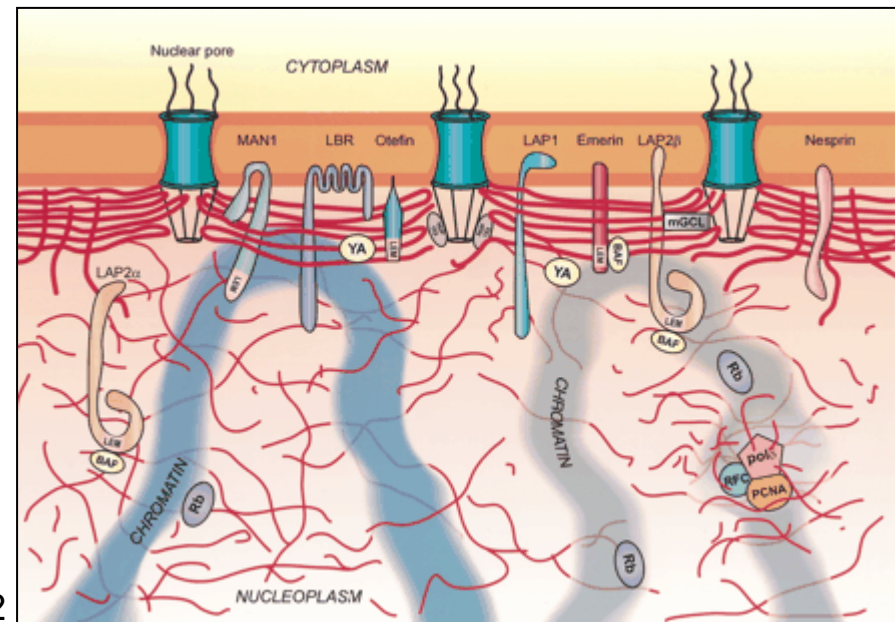


(Dorner et al., 2006)

Lamin associated proteins

INM proteins

- LBR (lamin B receptor)
- LAP1 (lamin associated polypeptide)
- LAP2 α , β (lamin associated polypeptide α , β)
- emerin
- MAN1
- Nesprin-1 α

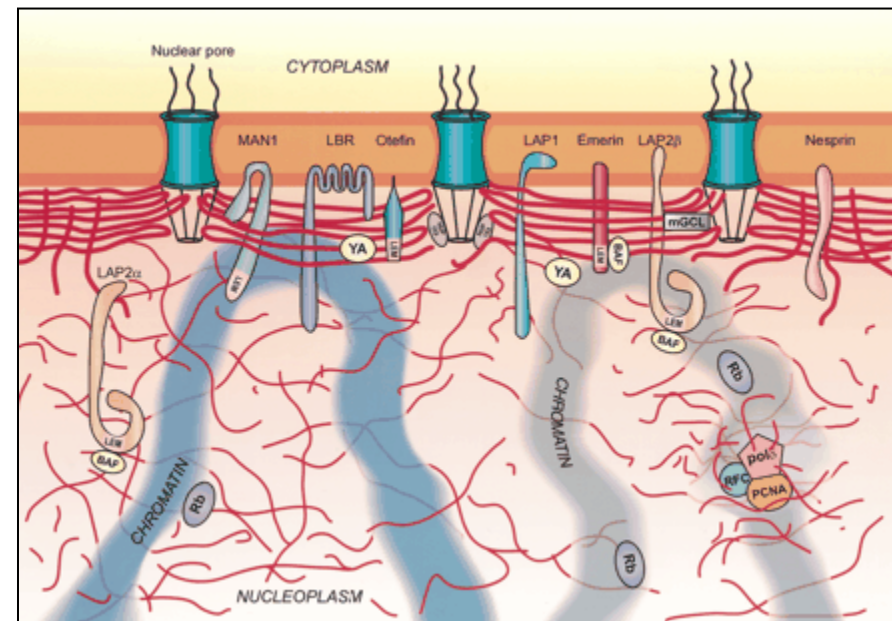


Goldman et al., 2002

Lamin associated proteins

Nucleoplasmic soluble proteins

- BAF (barrier-to-autointegration factor)
- components of RNA polymerase II transcription complexes
- DNA replication complexes
- H2A, H2B dimmers
- actin
- RB protein



Goldman et al., 2002

Heterochromatin

- dissociation of the Oct-1 from lamin B and the nuclear periphery correlate with reduced inhibitor activity
- Nup2p was shown to tether chromatin to the nuclear pore complex blocking propagation of chromatin
- loss of heterochromatin or its altered organization at the nuclear periphery in lamin A knockout mice

Epigenetic markers of chromatin regulation

- transcriptionally repressive marker of facultative heterochromatin $H3K27me3$ was lost on the Xi
- transcriptionally repressive marker of constitutive heterochromatin $H3K9me3$ was down-regulated and $H3K20me3$ was increased
- observed before changes in nuclear shape

Transcriptional regulation

INM directly associate with chromatin modifiers and transcriptional repressors.

- LBR associates with HP1 and H3/K4 histone
- LAP2 β associates with GCL and HDAC3
- emerin associates with Btf and LAP2 β

Epigenetic „histone code“

- site specific combinations correlate with transcriptional activation or repression

H4K8ac + H3K14ac + H3S10ph = activation

H3K9me3 + lack of H3K4ac = repression

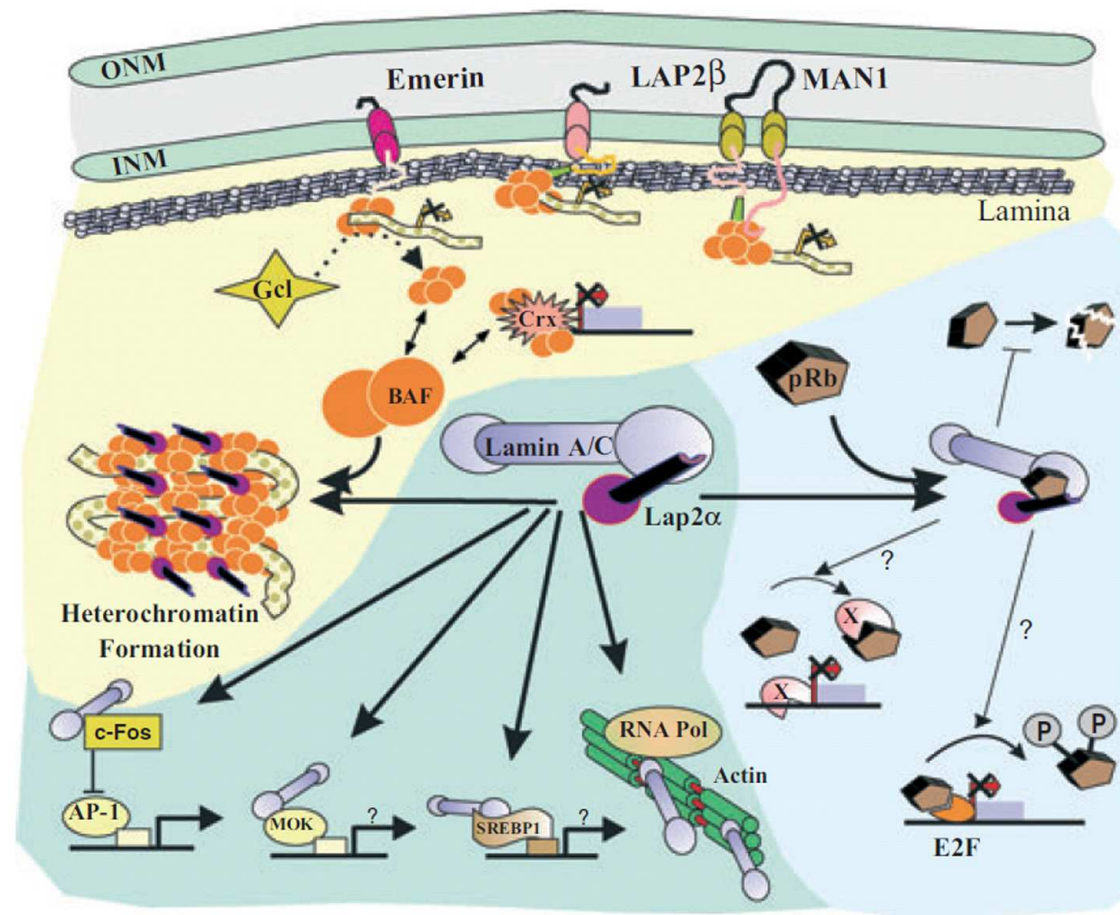
Syntéza DNA a transkripce

- podpora jaderného obalu a umožnění efektivního **transportu** nebo **zadržení** transkripčních faktorů
- kolokalizace laminů s PCNA a RFC během S-fáze BC
- exprese různých laminů v různých fázích vývoje (př. exprese laminů typu A během diferenciacie tkání u obratlovců – u nádorových buněk nízká exprese)
- interakce se základním transkripčním mechanismem a **poskytnutí kostry** pro složení nebo stabilizaci aktivních transkripčních komplexů
- do transkripce zasahují také LAPs skrze protein GCL

Nucleoplasmic complexes

- **lamins A/C - LAP2 α + pRB** \rightarrow activating function of lamin A complexes on pRb repressor activity
- **lamins A/C - LAP2 α + chromatin and DNA** \rightarrow control higher order chromatin organization and epigenetic gene regulation, interaction with core histones
- **LAP2 α - BAF + chromatin** - BAF contribute to formation of heterochromatin and the regulation of gene expression
- Dorner et al., 2007

Potential functions of nucleoplasmic lamins A/C-LAP2 α complexes in the gene regulation



(Dorner et al., 2006)

Laminopathies

(nuclear envelopathies)

- premature ageing syndroms, myopathies, neuropathies, lipodystrophies, dermatopathies
- lamin A/C (EDMD, HGPS), emerin (EDMD), MAN1, LBR, LAP2 α (cardiomyopathy)
- **mechanical stress model** - mutated nuclei are mechanically more fragile, defects in NE structure (cardiac- and skeletal-muscle pathologies)
- **perturbed gene expression** - mutations in lamina proteins could promote diseases by compromising various gene regulatory pathways in different tissues (pRB + lamin A and LAP2 α , important for skeletal muscle and adipose tissue differentiation)

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 nemoci

- u myší knock out v genu *LMNA*
- normální narození, po 2-3 týdnech zpomalení růstu a další příznaky
- do 8 týdnů smrt – zasaženy kosterní svaly a sval srdeční, ztráta bílého tuku
- kultivace fibroblastů z *LMNA*^{-/-} myší
- snížení množství laminů, LAP2, tvorba puchýřků nebo bublinek, v jejichž oblasti nepřiléhá chromatin k jaderné membráně
- změněná distribuce emerinu (reverzibilní)

Laminy a evoluce

- četnost a složitost genů, kódujících laminy vzrůstala s evolucí
- *Caenorhabditis elegans*: 1 gen (*lmn-1*), exprese téměř ve všech buňkách
- *Drosophila melanogaster*: 2 geny (*Dm₀*, *C*), exprese *Dm₀* ve všech buňkách, exprese *C* v embryu a diferencovaných buňkách
- kvasinky a *Arabidopsis*: nemají jaderné laminy (vývoj až u buněk s otevřenou mitózou)

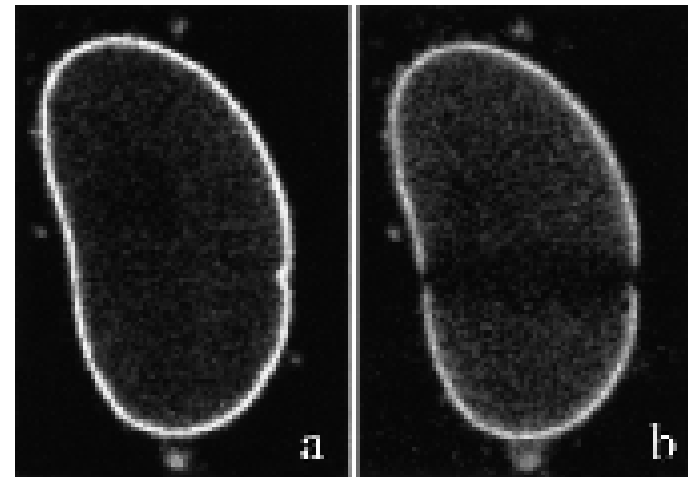
Laminy v buněčném cyklu

Stavba jaderného obalu

- během mitózy (profáze/metafáze) se jaderné laminy rychle rozpadají díky fosforylaci kinázou p34/cdc2
- po mitóze jsou laminy defosforylovány a znovu složeny přibližně ve stejnou dobu jako jaderný obal a jaderné póry
- laminy typu A a B mají různý timing
- interakce lamin-lamin zahrnuté v utváření můstků spojující membránové váčky s chromatinem při tvorbě jaderné membrány
- laminy interagují se dvěma skupinami proteinů:
integrální (LAP2, emerin, MAN1, LBR, p18,...)
neintegrální v oblasti laminy (GCL, YA, PP1, Oct1)

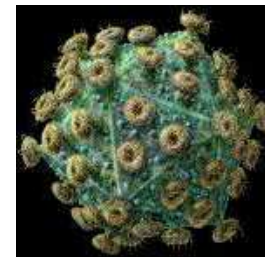
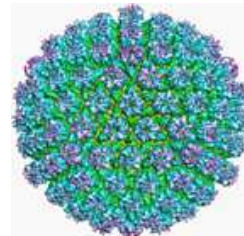
Organizace laminů

- v interfázi jsou laminy kontinuálně syntetizovány a inkorporovány do laminy
- je to dynamická struktura, během interfáze v jádře polymerizují
- v buňce existují v různých stavech (FRAP – fluorescence recovery after photobleaching)
- tvorba vnitřního „veil“ (závoje)

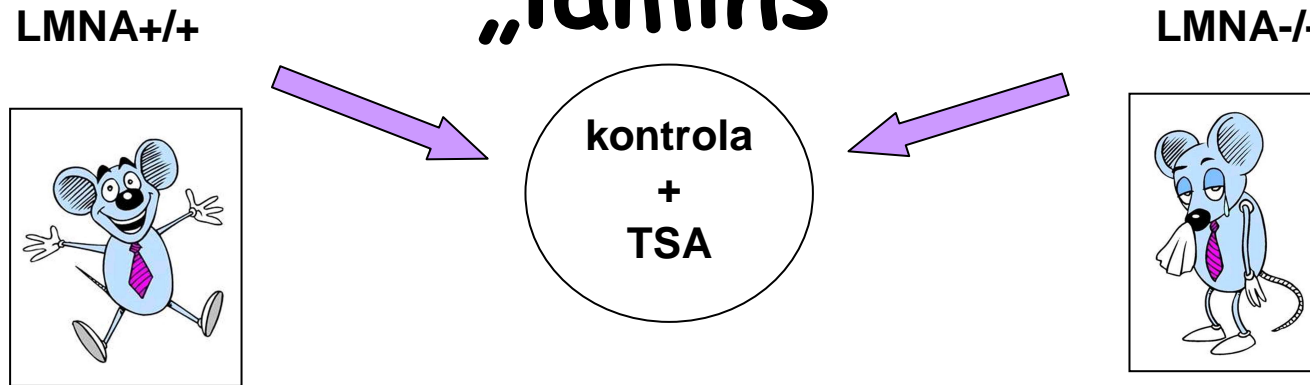


Laminy a viry

- jaderný obal představuje bariéru pro DNA i RNA viry, které se replikují v jádře
- **DNA viry** (př. herpesvirus) se po replikaci musí v podobě nukleokapsidů dostat skrz vnitřní jadernou membránu
- Eliminace nukleokapsidů je provázen rozpadem laminů na okraji jádra během pozdní fáze infekce
- **RNA viry** (př. HIV) musí v podobě preintegračního komplexu (PIC) projít do jádra, ale jaderné póry mají menší průměr než PIC, a tak není ještě jasné, jak dochází k průchodu



Our contribution to the topic „lamins“



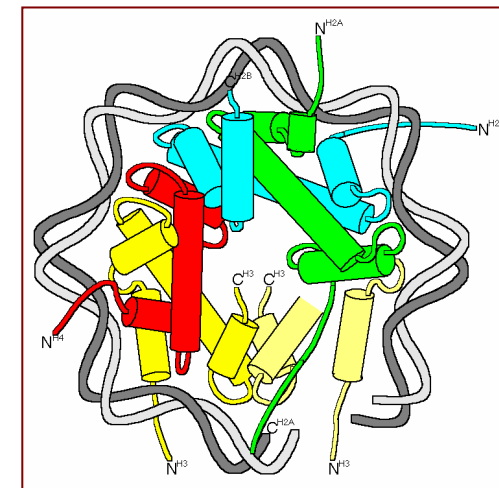
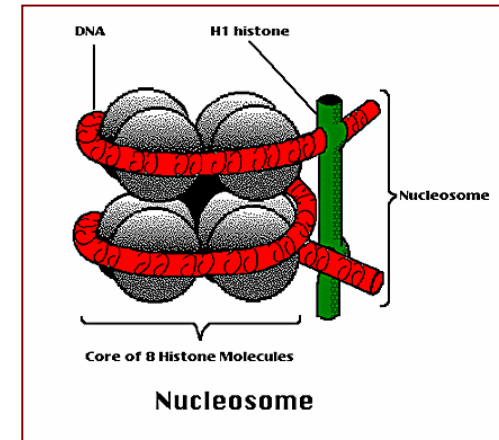
Bearing in mind the importance of A-type lamins for chromatin arrangement we studied the effect of histone hyperacetylation, induced by TSA, in lamin A/C deficient fibroblasts.

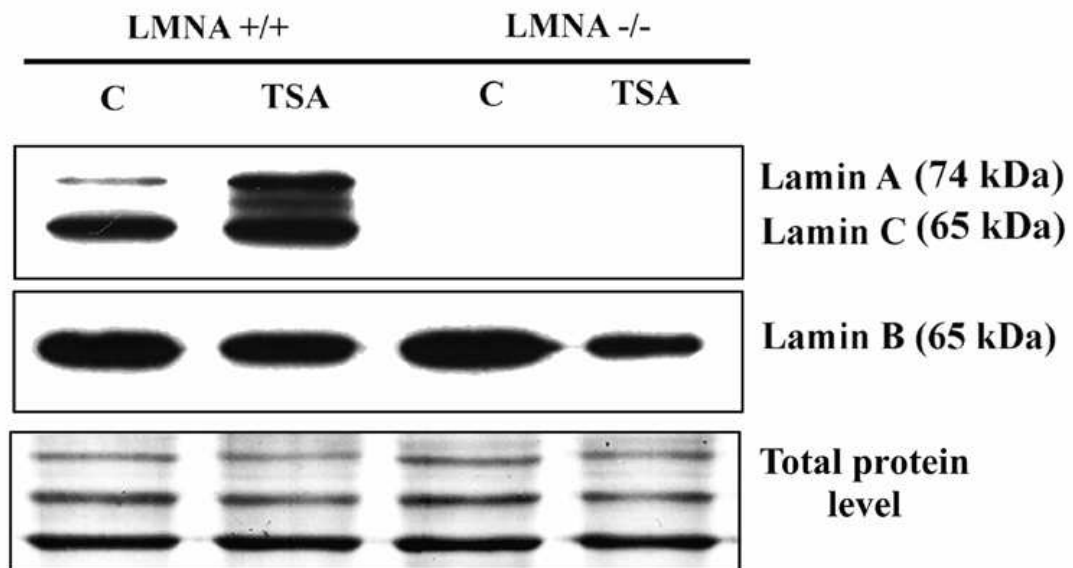
Nuclear changes caused by lamin A/C deficiency can be partially compensated by HDAC inhibition.

Interaction between lamins and specifically modified histones plays an important role in the higher-order chromatin organization, which influences transcriptional activity.

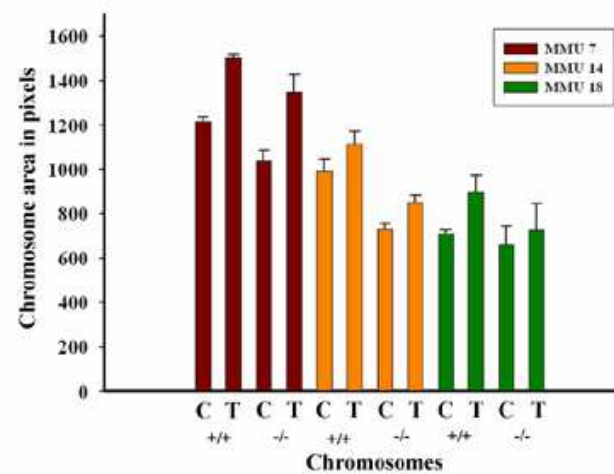
Acetylace a deacetylace histonů

- nukleozom – oktamer histonů, dsDNA, histon H1
- N-koncové části histonů (tails)
- histonacetyltransferázy (HAT)
- histondeacetylázy (HDAC)
- sestavování nukleozomů, rozlišení heterochromatinu a euchromatinu, **regulace genové exprese** (reorg.chromatinu)

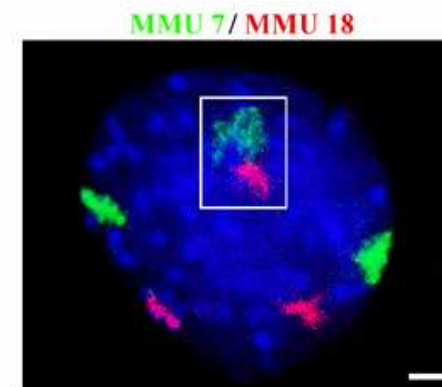




A

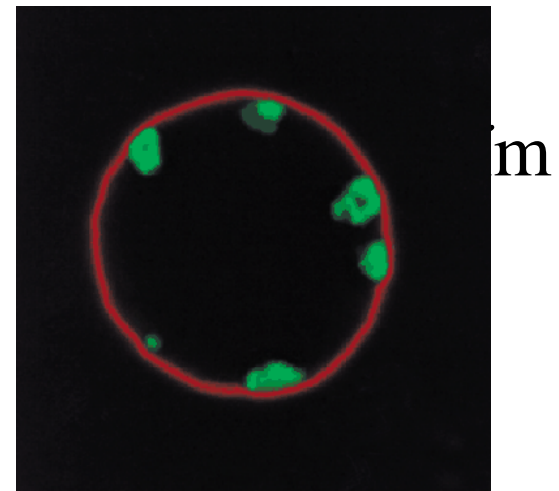


B

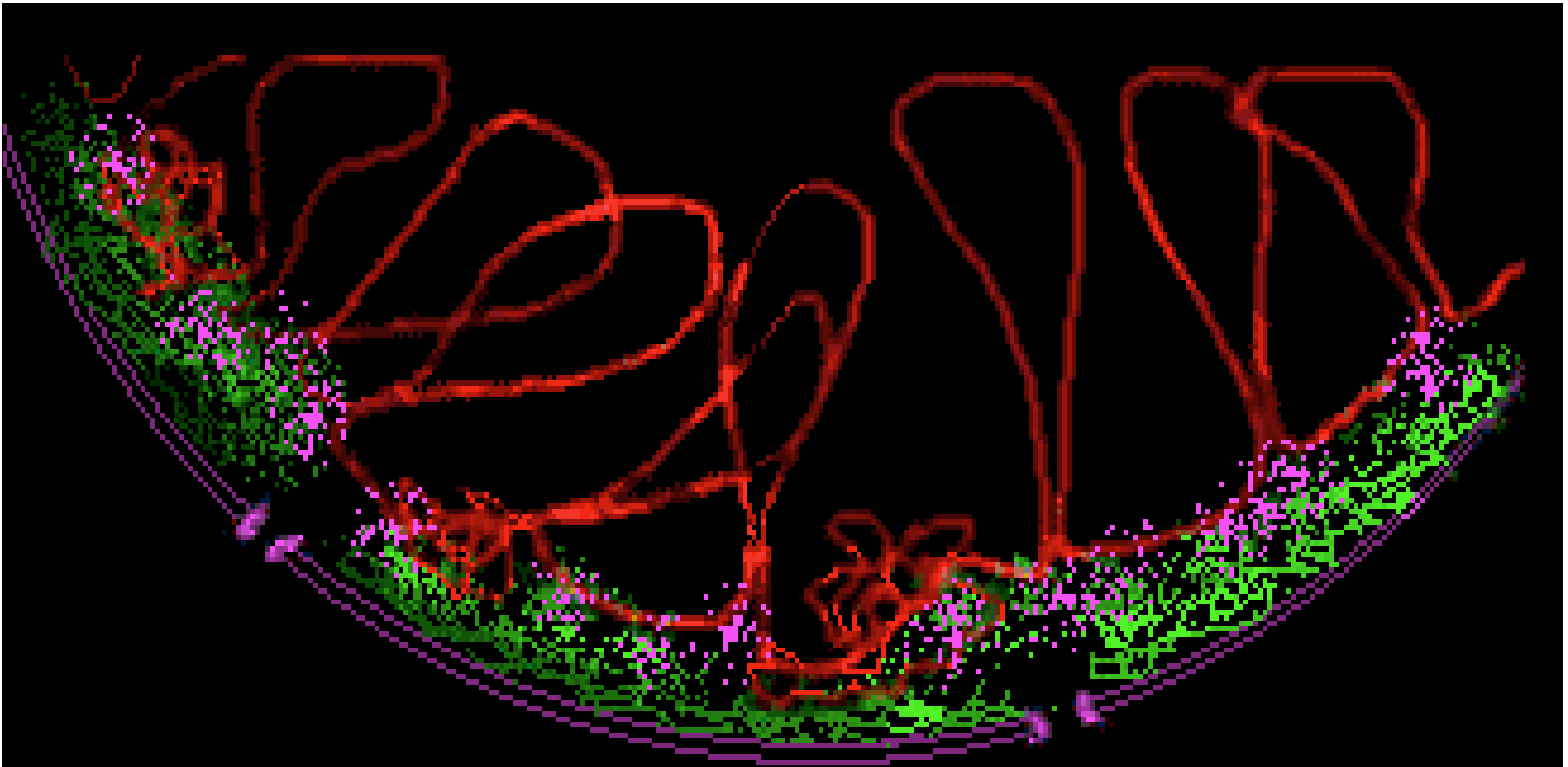


Laminy a chromatin

- 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 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.

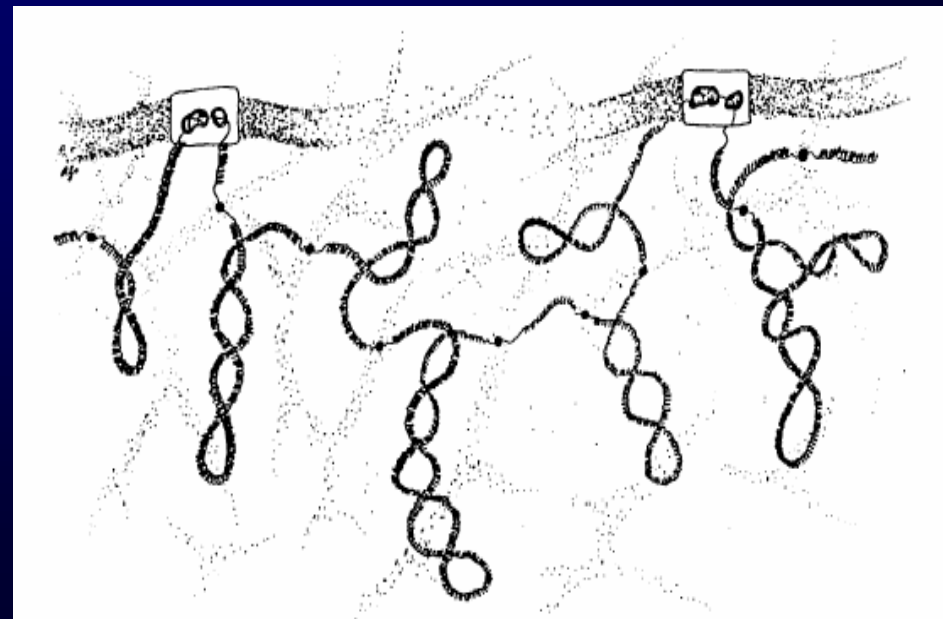
Existuje tak zvaný „**radial loop model**“. V tomto modelu, velká chromatinová vlákna tvoří smyčky, které jsou uspořádány do chromosomů. Oblast, kde přiléhá DNA k proteinovému lešení „scaffold“ se nazývá scaffold attachment region.

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 chromosomů, 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.

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

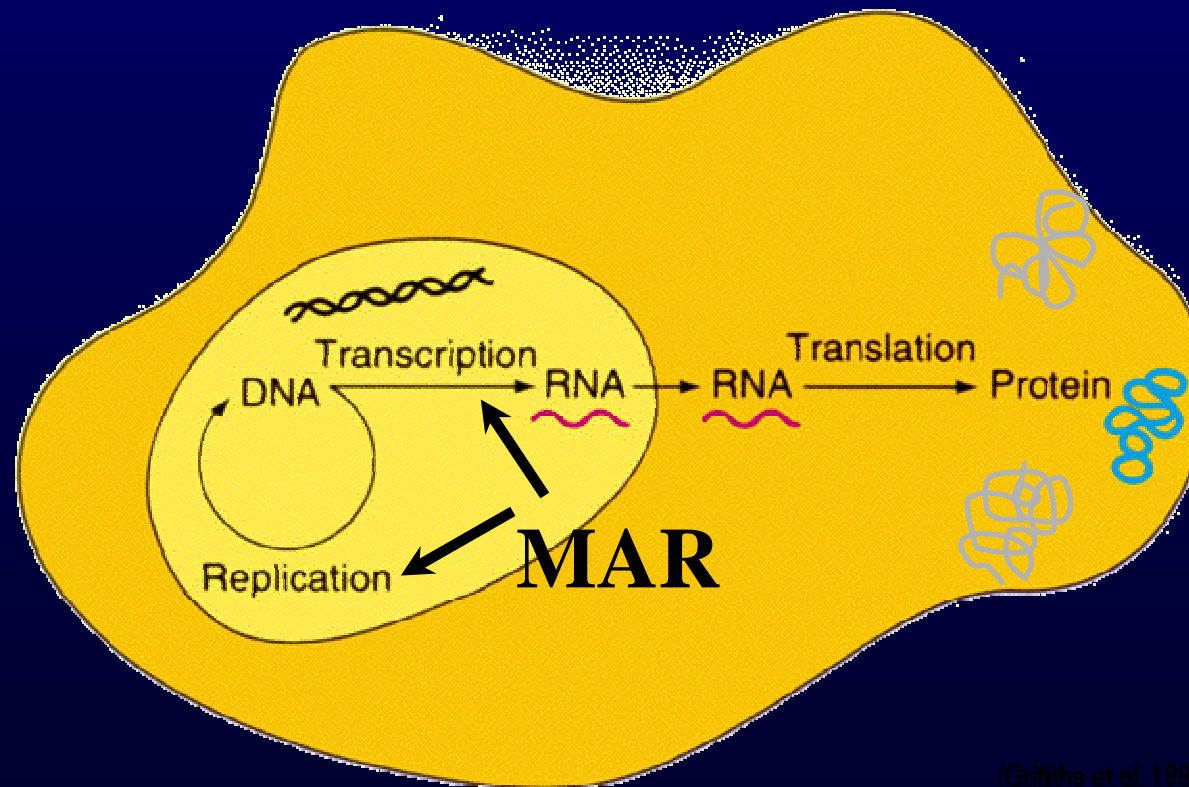
- 1) Scaffold Attachment Region (SARs)
- 2) Matrix attachment regions (MARs)
- 3) Loop basement attachment regions (LBARs)



LBARs

Function of MARs

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



(Griffiths et al. 1996)

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.**

