



## **De Cel: Structuur, functie (en analyse)**

### ***SYNOPSIS – aanvulling hoorcolleges***

***FACULTEIT GENEESKUNDE & FARMACIE***

1<sup>e</sup> Bachelor Geneeskunde & 1<sup>e</sup> Bachelor Biomedische Wetenschappen

Titularis: Prof. Dr. T. VandenDriessche

Assistenten: H. Evens; D. Boon

## Voorwoord

Beste studenten,

Deze synopsis is bedoeld als aanvulling voor de hoorcolleges: “*De Cel: Structuur en Functie*” (1<sup>ste</sup> Bachelor Geneeskunde) en “*De Cel: Structuur, Functie en Analyse*” (1<sup>ste</sup> Bachelor Biomedische Wetenschappen) op basis van een aantal *capita selecta*. Deze synopsis is een kernachtige samenvatting van een aantal basisconcepten, principes en celbiologische technieken die in de hoorcolleges aan bod komen. Het is deels gebaseerd op de referentie “*Molecular Biology of the Cell*” – Alberts et al. 5de uitgave; ISBN 978-0-8153-4111-6. De informatie in deze synopsis is **complementair** aan de hoorcolleges en de audiovisuele opnames, de powerpoint presentaties (cursus - “*handouts*”), die trouwens ook op het PointCarré elektronisch platform beschikbaar zijn. Het is dus geenszins de bedoeling dat deze synopsis beschouwd wordt als een vervanging van dit studiemateriaal of de hoorcolleges. Het is een hulpmiddel om de leerstof nog beter te kunnen verwerken en de inzichten nog beter te kunnen consolideren.

Ik wil hierbij van de gelegenheid gebruik maken om mijn assistenten, *Hanneke Evens* en *Dimitri Boon*, te bedanken voor hun constructieve en essentiële bijdrage bij het opmaken van deze synopsis.

We hopen dat jullie deze synopsis nuttig vinden om de leerstof nog beter te kunnen begrijpen en te verwerken.

*Prof. Dr. Thierry Vandendriessche*

Titularis “*De Cel: Structuur en Functie*” (1<sup>ste</sup> Bachelor Geneeskunde)

Titularis “*De Cel: Structuur, Functie en Analyse*” (1<sup>ste</sup> Bachelor Biomedische Wetenschappen)

Vrije Universiteit Brussel (VUB)

Directeur Departement Gentherapie & Regeneratieve Geneeskunde

Gewoon Hoogleraar – Faculteit Geneeskunde & Farmaceutische Wetenschappen

Laarbeeklaan 103

B-1090 Jette

Phone: +32 477 529653

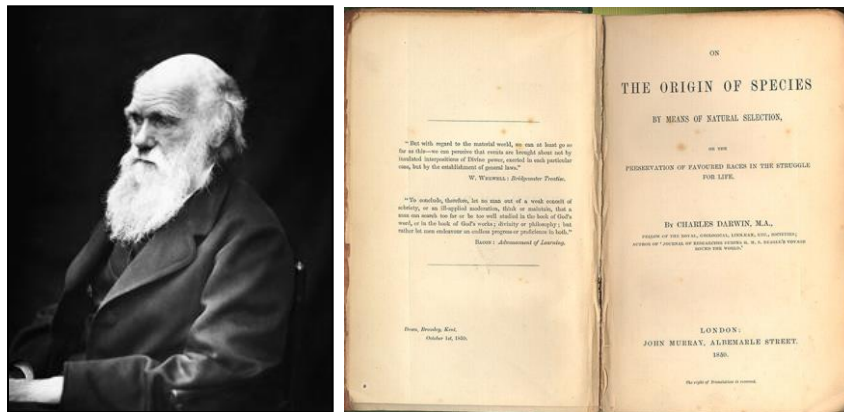
[thierry.vandendriessche@vub.ac.be](mailto:thierry.vandendriessche@vub.ac.be)

## **Inhoudstafel**

Voorwoord.....	2
Evolutie.....	5
Microscopie.....	6
Polarisatiemicroscopie.....	6
Fluorescentie microscopie.....	7
Confocale laser-scanning microscopie.....	8
Elektronenmicroscopie.....	9
Monoclonale antilichamen.....	11
Fluorescence resonance energy transfer (FRET).....	13
Membranen.....	14
Signaaltransductie.....	15
Laterale diffusie van membraaneiwitten.....	15
Polariteit.....	18
Membraantransport.....	19
Multipass-transmembranaire eiwitten.....	19
Zenuwimpuls.....	24
Intracellulaire compartimenten: Eiwit-sortering.....	26
Oorsprong van intracellulaire organellen.....	28
Nucleus.....	29
Gated transport.....	29
Peroxisomen.....	32
Endoplasmatisch reticulum (ER).....	33
Co-translationeel transport.....	35
Chaperones.....	37
Proteasoom.....	38
Unfolded protein response.....	39
GPI verankering.....	41
Synthese fosfolipiden.....	43
Intracellulair vesiculair transport.....	44
Vesiculaire coating.....	46
Vesiculaire fusie.....	48
Het Golgiapparaat.....	51
Glycosylatie.....	55
Oligosaccharide verwerking in het Golgi-apparaat.....	56
Lysosomen/Lysosomaal transport.....	57
Receptor-gemedieerde endocytose.....	60

Multivesiculaire lichamen .....	62
Mitochondriën – energie conversie .....	65
Mitochondriële erfelijkheid .....	68
Cytoskelet.....	70
Ciliën en flagellen .....	76
Spiercontractie .....	77

## Evolutie



De universele eigenschappen van cellen komen voort uit selectiedruk om belangrijke en essentiële erfelijke eigenschappen te conserveren. Dit ontstond reeds heel vroeg in de evolutie van het leven.

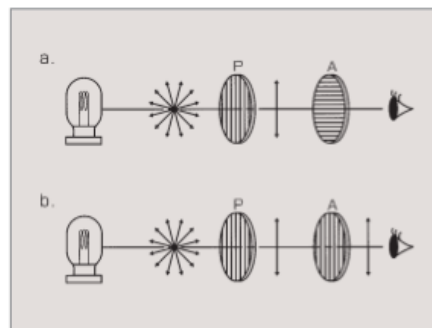
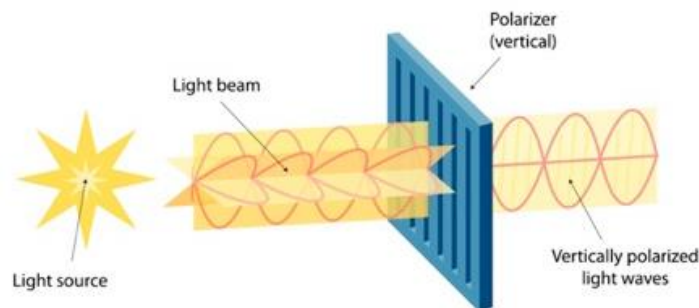
Charles (Robert) Darwin (1809 – 1882) was een Engelse natuuronderzoeker die vooral gekend is voor zijn evolutietheorie, die beschreven is in het boek *“The Origin of Species”*, dat in 1859 werd gepubliceerd. Darwin stelde voor dat **natuurlijke selectie** de drijfkracht was van evolutie. Natuurlijke selectie is het proces waarbij erfelijke eigenschappen, die ervoor zorgen dat een organisme een grotere kans op overleving en voortplanting hebben, vaker voorkomen in een populatie in opeenvolgende generaties: *“Survival of the fittest”*. Populaties met een brede genetische variatie hebben een grotere kans dat verscheidene individuen overleven en deze genetische eigenschappen vervolgens succesvol kunnen doorgeven aan volgende generaties. Een celbiologisch voorbeeld van **Darwiniaanse selectie** is de resistentie van kankercellen voor chemotherapeutica. Dit wordt uitgelegd in het hoofdstuk *Membrantransport – ABC-transporters*.

*Intermezzo* : Een ander voorbeeld van selectief groeivoordeel en antibioticaresistentie met bacteriën (<https://www.youtube.com/watch?v=plV4kNVIUh8> – The evolution of bacteria on a “mege-plate” petri dish; Credits go to Harvard Medical School)

# Microscopie

## Polarisatiemicroscopie

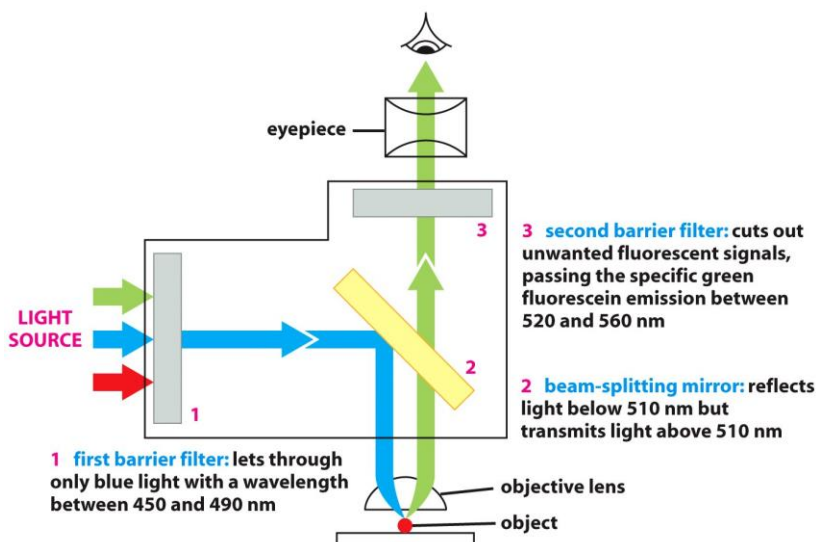
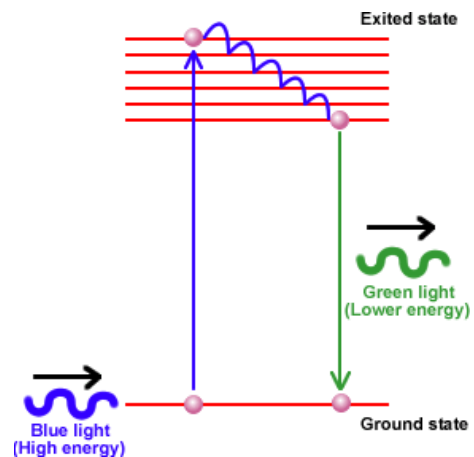
Bij een polarisatiemicroscop zijn er twee polarisatiefilters die loodrecht op elkaar staan. Een lichtstraal van een normale lichtbron wordt op een eerste polarisatiefilter gericht. Deze filter zorgt ervoor dat het licht lineair gepolariseerd wordt en het specimen kan bereiken. Indien er optisch actieve structuren aanwezig zijn in het specimen, zal de polarisatierichting van het licht veranderen, waardoor het ook kan passeren door een tweede polarisatiefilter. Deze is 90° gedraaid ten opzichte van de eerste filter. Dus enkel materialen met optisch actieve structuren kunnen gevisualiseerd worden in een polarisatiemicroscop.



● Fig. 1.3 a) crossed nicols and b) parallel nicols ●  
P: polarizer A: analyzer

## Fluorescentie microscopie

**Fluorochromen** zijn moleculen die licht van een bepaalde golflengte absorberen en licht van een langere golflengte uitzenden. Wanneer een fluorochroom bestraald wordt met licht van een bepaalde golflengte, wordt de energie van de fotonen overgebracht op het fluorochroom (excitatie). Hierdoor worden de elektronen van het fluorochroom op een hoger energieniveau gebracht. Deze elektronen keren echter zeer snel terug naar een intermediair energieniveau, waarbij ze een deel van de opgenomen energie afgeven onder de vorm van warmte. Vervolgens keren ze terug naar hun basisenergieniveau. Hierbij wordt de resterende opgenomen energie afgegeven als licht (emissie). Doordat een deel van de energie reeds als warmte werd afgegeven, is dit licht minder energetisch dan het excitatielicht, m.a.w. dit emissielicht heeft een **langere** golflengte.

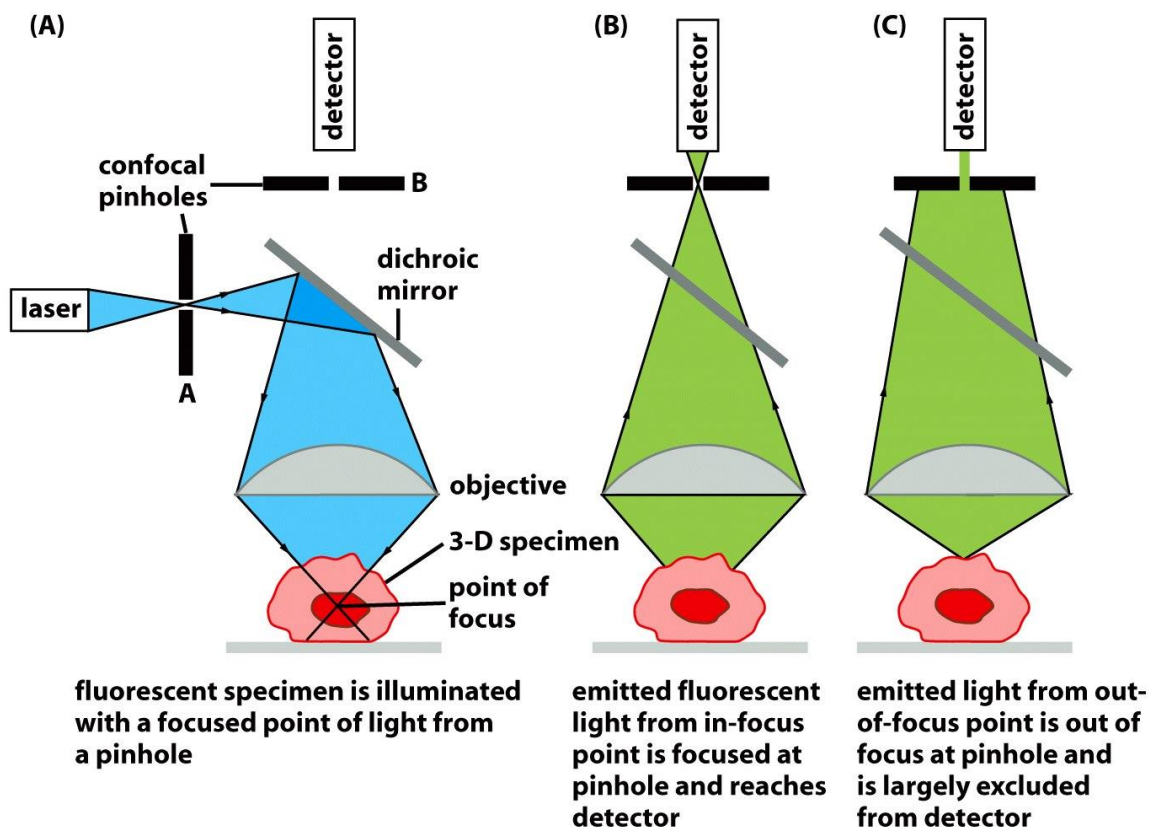


Een **fluorescentiemicroscop** bestaat uit twee barrière filters en één dichroïsche spiegel. Het licht zal eerst langs een barrière filter passeren, die enkel licht met de excitatie-golflengte doorlaat. Dit licht wordt weerkaatst door de dichroïsche spiegel, die enkel

licht boven een bepaalde golflengte doorlaat, en komt zo op het specimen terecht. Na emissie van het fluorochroom passeert het licht de dichroïsche spiegel en vervolgens de tweede barrière filter. Deze laatste zorgt ervoor dat enkel het geëmitteerde licht wordt doorgelaten en licht van andere golflengtes wordt geëlimineerd.

## Confocale laser-scanning microscopie

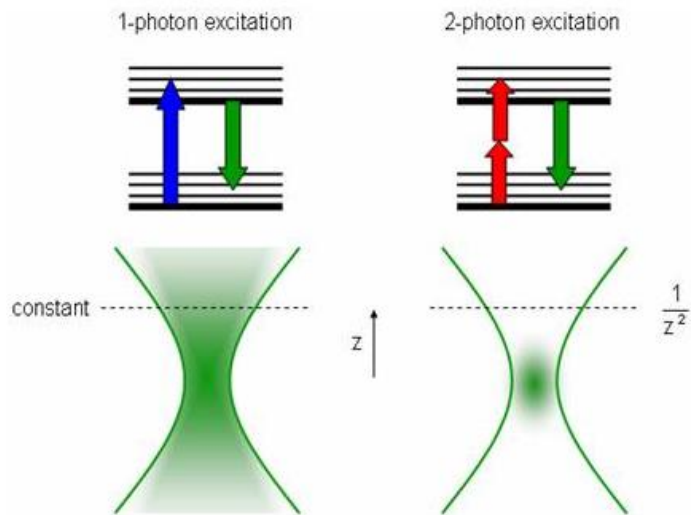
**Confocale laser-scanning microscopie** is een vorm van fluorescentiemicroscopie. Hierbij passeert laserlicht van een welbepaalde golflengte (monochromatisch licht: bijv. blauw licht) via een kleine opening (*pinhole*) en wordt het selectief gefocuseerd op een gewenste locatie en diepte van het specimen. Het monochromatische fluorescente licht dat uitgestraald wordt vanuit dit focaal punt op een bepaalde diepte in het specimen is van een andere, langere golflengte (bijv. groen licht) en wordt in een tweede *pinhole* gefocuseerd en vervolgens opgevangen door een detector. Deze tweede *pinhole* valt dus samen met het focaal punt van het uitgestraalde licht (= confocaal). Het fluorescente licht dat uitgestraald wordt vanuit een punt op een andere diepte (ander focaal vlak) van het specimen, is niet “in focus” en wordt grotendeels verhinderd om de detector te bereiken. Hierdoor bekomt men een veel scherper beeld.



Met deze techniek kunnen er enerzijds 2D beelden gemaakt worden, als het gehele focale vlak wordt ‘gescand’, maar ook een 3D reconstructie is mogelijk door dit op verschillende dieptes in het specimen te herhalen. Dit gaat echter niet bij dikke specimen ( $>150\ \mu\text{m}$ ).



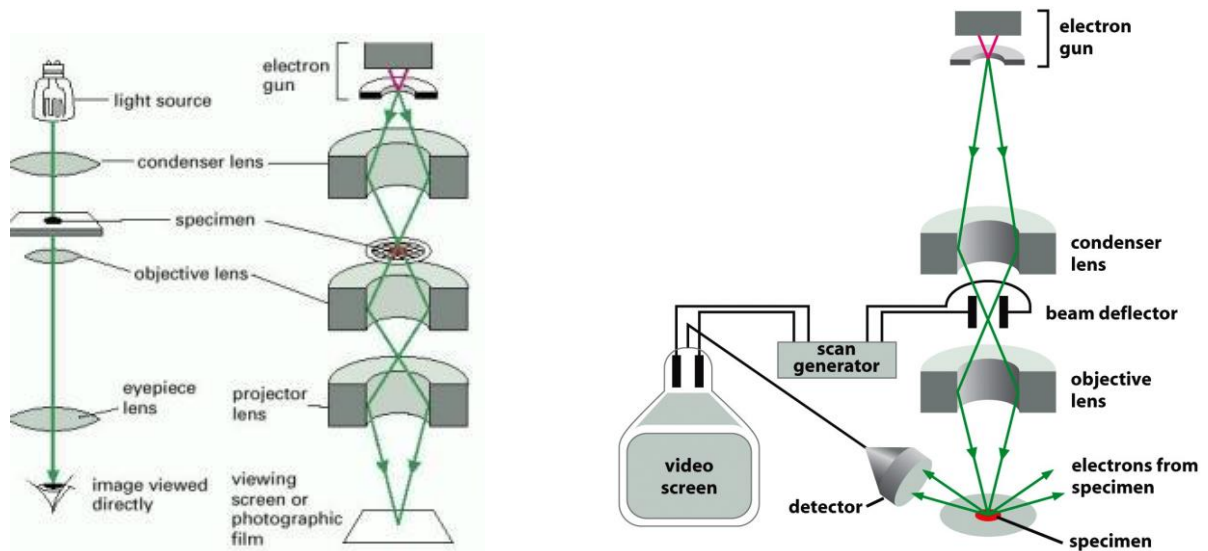
Bij **multi-foton laser confocale microscopie** wordt er gebruik gemaakt van laserlicht dat een excitatiegolflengte heeft die 2 keer groter is dan de excitatiegolflengte van het fluorochroom (Bijv. fluorochroom  $\lambda_{\text{excitatie}} = 488 \text{ nm}$ ; excitatielicht  $\lambda = 970 \text{ nm}$  (rood)). Indien in het focaal vlak 2 excitatiefotonen dicht bijeen komen, kunnen deze interfereren en samen het fluorochroom exciteren. Dit zal vervolgens fluorescent licht emitteren. De fluorescentie vermindert in functie van  $1/z^2$ , waarbij  $z$  gelijk staat aan de axiale afstand tot het focaal punt. Hierdoor komt het fluorescentielicht bijna uitsluitend in het confocaal vlak, met nagenoeg geen fluorescentie boven of onder dit vlak.



Het voordeel van het gebruik van rood excitatielicht is dat het een diep penetrerend vermogen heeft ( $400 \mu\text{m}$ ), waardoor dikkere structuren bekeken kunnen worden. Daarnaast is het licht minder energetisch en zal het dus minder schadelijk zijn voor levende cellen.

## Elektronenmicroscopie

Een andere vorm van microscopie is **elektronenmicroscopie**. Hiermee kunnen intracellulaire organellen en macromoleculaire complexen gevisualiseerd worden met een nagenoeg **atomaire resolutie** ( $0,1 \text{ nm}$ ). Ook hier zijn er 3D-analyses mogelijk. Het is echter niet geschikt voor levende cellen, “real-time” of high-throughput imaging. Daarnaast is de preparatie van de specimens complex en is er een groter risico voor artefacten.



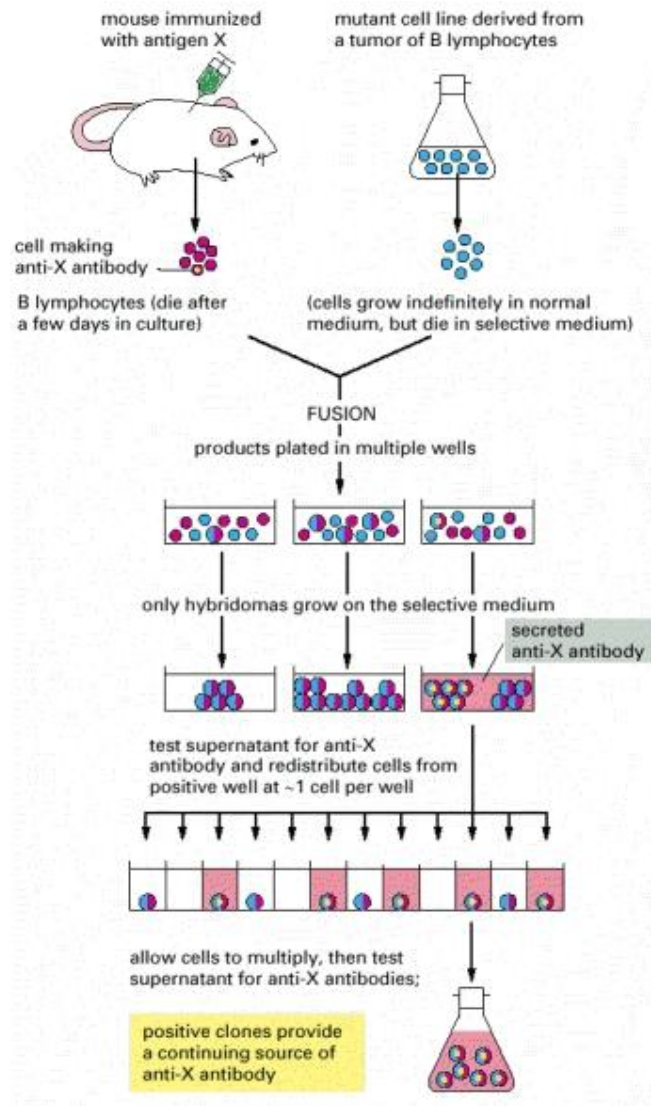
Er zijn twee vormen van elektronenmicroscopie: **transmissie elektronenmicroscopie** (TEM, afbeelding links) en **scanning elektronenmicroscopie** (SEM, afbeelding rechts).

In een **TEM** worden elektronen geëmitteerd door een kathode in een vacuüm systeem. Deze worden op het specimen gefocuseerd door magneten. Het specimen wordt 'gekleurd' met 'electron-dense material', zoals zware metalen of zouten. Deze stoten elektronen af (scattering) tijdens het passeren van het specimen. De rest van de elektronen wordt gefocuseerd en er wordt een beeld gevormd op een fotografische plaat of een fosforescent scherm. De gescatterde elektronen komen niet op het beeld terecht, waardoor structuren die 'gekleurd' zijn, en dus minder elektronen hebben doorgelaten, donker worden weergegeven op het beeld.

Bij **SEM** gaat de elektronenbundel niet doorheen het preparaat, maar wordt deze afgeketst op het specimen. Een elektronenbundel (in een vacuüm) wordt eerst geconvergeerd door een condensorlens tussen deflectorplaten, waarna de stralen weer gedivergeerd worden. De objectieflens convergeert de bundel weer. Door middel van het veranderen van de spanning tussen de deflectorplaten, kan de elektronenbundel afgebogen worden en zo het preparaat afscannen. De reflecterende elektronen (secundaire elektronen) worden opgevangen door een detector en vormen zo een beeld.

## Monoclonale antilichamen

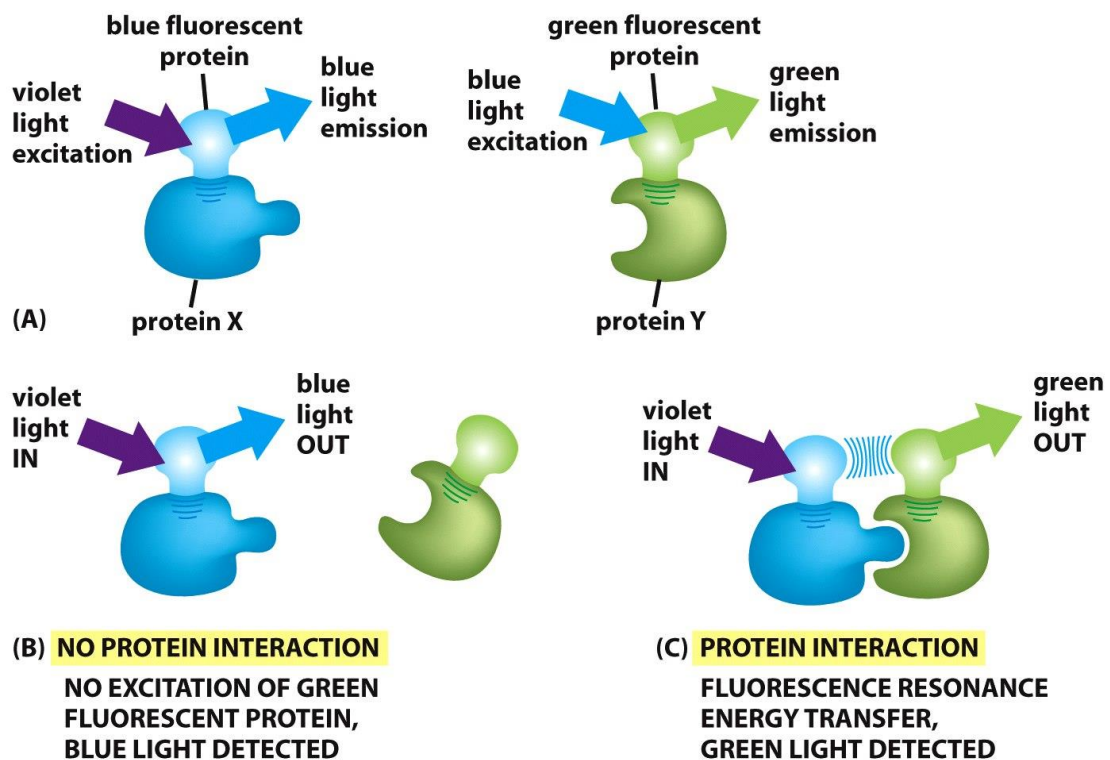
**Monoclonale antilichamen** zijn antilichamen die geproduceerd zijn door één B-cel clone. Ze herkennen slechts één epitoom op antigen X. Hierdoor zal de specifieke binding van antilichamen beperkt zijn en zal er minder achtergrondkleuring te zien zijn. Om monoclonale antilichamen te produceren wordt een muis geïmmuniseerd met antigen X, waardoor deze antilichamen tegen antigen X aan gaat maken. De antilichaam-producerende B-cellen worden vervolgens geïsoleerd. Helaas kunnen B-cellen niet lang overleven in een cultuur en sterven ze af, zodat het onmogelijk is om grote hoeveelheden antilichamen te bekomen vanuit deze B-cel culturen. Het is dus essentieel om de B-cellen “onsterfelijk” te maken. Daarom worden ze gefuseerd met een B-cel tumor cellijn, welke wel ongelimiteerd deelt. Hierdoor ontstaan heterocaryons, die na mitose hybride cellen worden. Deze zogenoemde **hybridoma's** kunnen zowel een specifiek antilichaam aanmaken (net zoals de B-cel waarvan ze zijn afgeleid) als ongelimiteerd delen (net als de tumorcel waarvan ze zijn afgeleid). Na het groeien in *wells* in selectief medium, waarin alleen de hybridoma cellen overleven, wordt het supernatant getest op anti-X antilichamen. Indien een *well* het antilichaam bevat, worden hieruit alle cellen individueel uitgeplaat.



Na het vermenigvuldigen van de cellen wordt het individuele supernatant getest voor anti-X antilichamen. Indien de clones positief zijn, zullen deze cellen gecultiveerd kunnen worden als een continue bron van anti-X antilichamen. Bijgevolg zal 1 onsterfelijke hybridoma clone, 1 monoclonaal antilichaam aanmaken dat bindt op 1 specifiek epitoom van antigen X. Omdat ze slechts één epitoom herkennen, zullen monoclonale antilichamen aspecifieke binding of achtergrondkleuring beperken. Hierin onderscheiden ze zich van **polyclonale antilichamen**, een heterogeen mengsel van antilichamen specifiek voor antigen X, aangemaakt door verschillende B-cel clones. Omdat deze verschillende epitopen van één antigen kunnen herkennen, kan er aspecifieke binding of achtergrondkleuring ontstaan.

## Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

**Fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging** wordt gebruikt voor de visualisatie van **eiwit-eiwit interacties**. Hierbij worden twee verschillende eiwitten gefuseerd met een verschillend fluorescent eiwit. Het emissiespectrum van het ene fluorescerende eiwit overlapt met het excitatiespectrum van het tweede eiwit. Het geëmitteerde licht van het eerste eiwit kan dus benut worden om het tweede eiwit te exciteren. Als beide eiwitten interageren en dus zeer dicht bij elkaar komen (1-10 nm), dan zal de energie van het geabsorbeerde licht getransfereerd worden van het ene fluorescente eiwit naar het andere. Er zal dus licht van een langere golflengte geëmitteerd worden dan wanneer er geen eiwitinteractie is.



## Membranen

**Membranen** zijn essentieel voor het leven. Ze omsluiten cellen en scheiden op deze manier het cytosol van de extracellulaire omgeving. Ook omsluiten ze de intracellulaire organellen, zodat er een verschil kan zijn in de samenstelling tussen deze organellen en het cytosol. Membranen kunnen ook gebruikt worden om ionengradiënten te vormen, wat belangrijk is bij de ATP-synthese, trans-membranair transport of transmissie van elektrische signalen. In membranen zitten receptoren, die als sensor voor externe signalen dienen, waardoor de cel kan reageren op omgevingsstimuli of signalen van andere cellen.

Elk membraan heeft de volgende **structurele eigenschappen**:

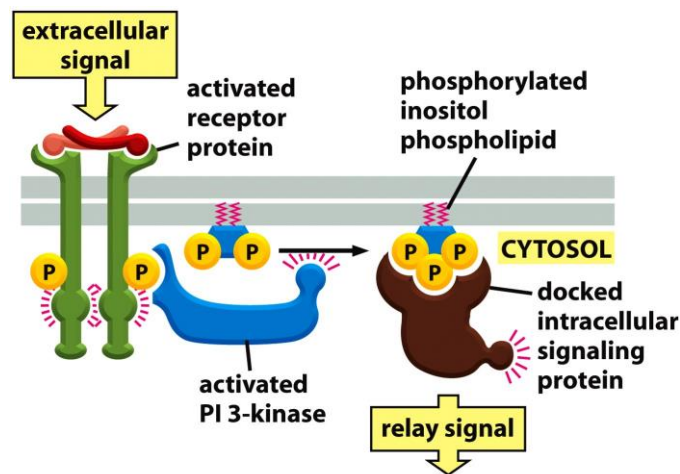
- Een membraan bestaat uit een dunne film van lipiden en eiwitten, samengehouden door vooral non-covalente bindingen
- Membranen zijn dynamische, fluïde structuren, waarin de meeste moleculen vrij kunnen bewegen
- De lipiden zijn gearrangeerd in een lipide 'bilayer' van ongeveer 5 nm dik, waardoor deze relatief impermeabel is voor H<sub>2</sub>O
- Transmembranaire eiwitten mediëren vrijwel alle andere functies van het membraan, zoals het transporteren van moleculen of het katalyseren van membraan-geassocieerde reacties, zoals ATP-synthese
- Transmembranaire eiwitten zorgen ook voor structurele en functionele interacties met het cytoskelet en intracellulaire moleculen

De belangrijkste **functies** van membranen zijn:

- Transmembranair transport van moleculen
- Signaaltransductie
- Cel-cel interactie en adhesie
- Intracellulaire 'trafficking' van eiwitten (interne membranen)
- ATP synthese
- Endocytose en exocytose

## Signaaltransductie

Omdat membranen **asymmetrisch** zijn, kan er **signaaltransductie** plaatsvinden van de extracellulaire omgeving naar de intracellulaire omgeving. Door modificatie van lipide polaire hoofdgroepen kunnen bindingsplaatsen voor eiwitten gecreëerd worden. Een voorbeeld hiervan is **fosfatidyl-inositol**, een fosfolipide dat zich in de cytosolische laag van de celmembranen bevindt. Een extracellulair signaal activeert fosfoinositide 3-kinase (PI 3-kinase), wat vervolgens de inositol fosfolipiden fosforyleert. Hierdoor wordt er een docking-site gecreëerd voor verschillende intracellulaire signaal eiwitten aan de cytosolische kant van het membraan, die vervolgens het signaal doorgeven.



## Laterale diffusie van membraaneiwitten

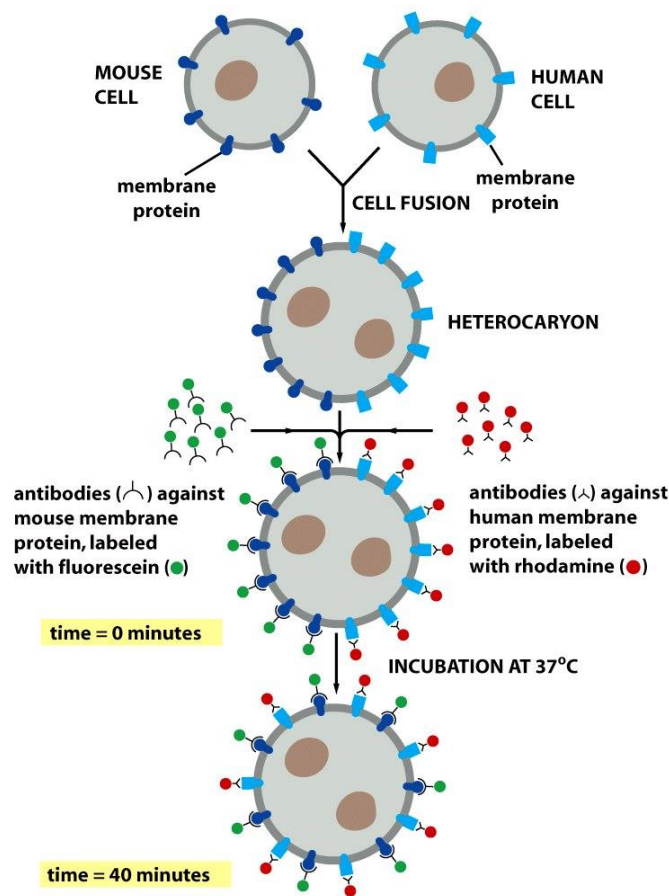
Membranen zijn fluïde structuren, waarin de membraaneiwitten zowel om hun eigen as kunnen bewegen (rotationele diffusie) als lateraal doorheen het membraan (laterale diffusie).

Om deze laterale diffusie experimenteel aan te tonen zijn er drie mogelijkheden :

### 1) Heterocaryons

Een eerste mogelijkheid is om heterocaryons te vormen tussen cellen van een muis en mens. Deze heterocaryons worden gelabeld met verschillende gelabelde fluorescente antilichamen gericht tegen muis- en mens-specifieke membraaneiwitten. Initieel zijn de muis- en mens-specifieke eiwitten ieder begrensd tot één helft van het heterocaryon. Na verloop van tijd

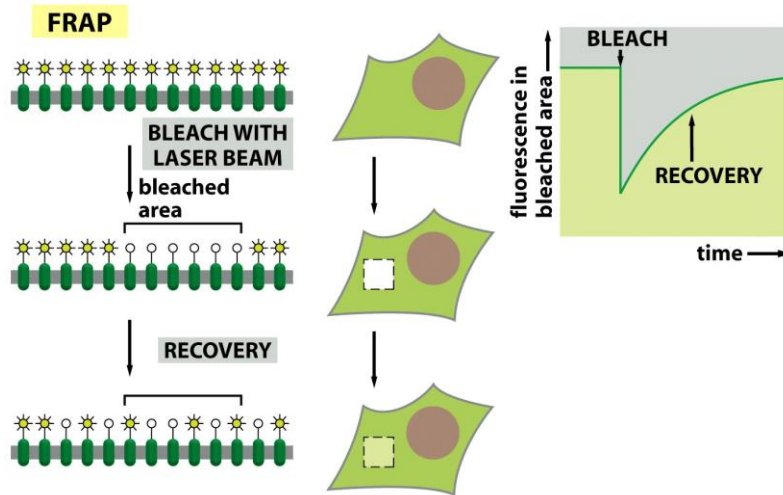
zullen de membraanewitten lateraal diffunderen en zullen de eiwitten verdeeld zijn over het gehele plasmamembraan.



## 2) FRAP

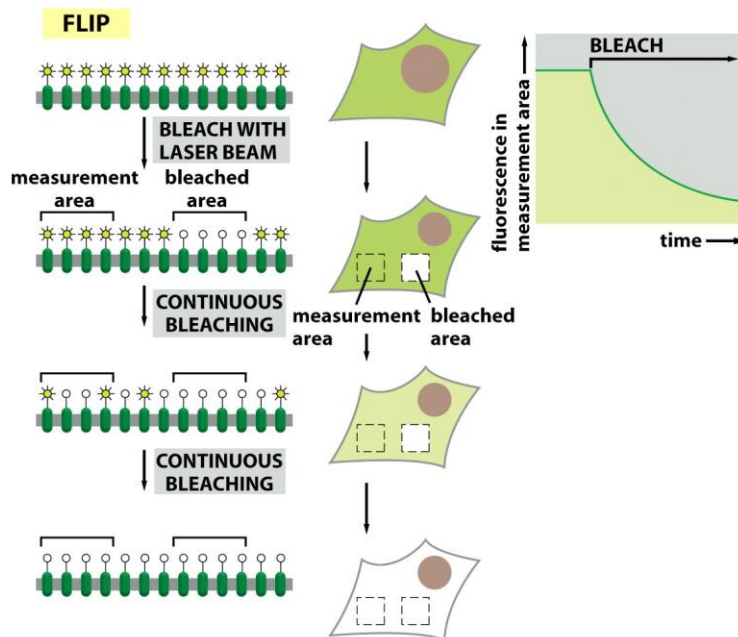
Een tweede mogelijkheid om de fluiditeit te visualiseren is de techniek 'fluorescence recovery after photobleaching' (FRAP). Hierbij worden membraanewitten gelabeld met fluorescente markers. In een kleine regio van het membraan worden deze fluorescente markers gebleached door een laser. Na verloop van tijd neemt de fluorescentie in dit gebied weer toe, omdat de gebleachte moleculen diffunderen vanuit deze regio en ongebleachte moleculen hiervoor in de plaats komen.





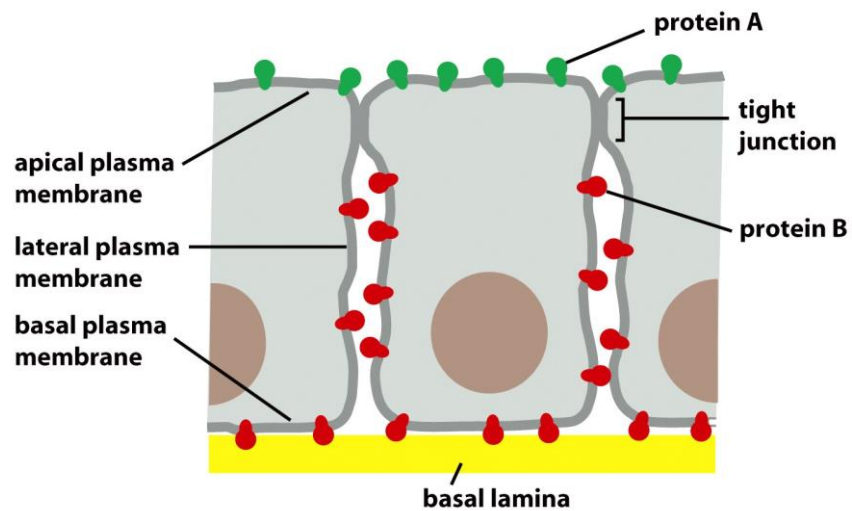
### 3) FLIP

Als laatste kan 'fluorescence loss in photobleaching' (FLIP) gebruikt worden. Bij deze techniek worden de membraan eiwitten ook fluorescent gelabeld. Een bepaald gebied van het plasmamembraan wordt voortdurend aangestraald met een laser, waardoor er continue photobleaching plaatsvindt van alle moleculen in deze regio. Omdat het membraan fluïde is, zullen op een gegeven moment alle membraan eiwitten eenmaal deze regio gepasseerd zijn, waardoor het gehele plasmamembraan fluorescentie verliest.



## Polariteit

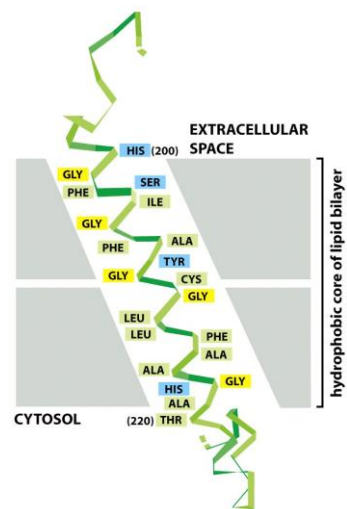
Membranen zorgen ook voor de **polariteit** van cellen, zoals bijvoorbeeld in epitheelcellen. In deze cellen zijn bepaalde eiwitten specifiek gelokaliseerd aan de apicale zijde van de cel, en andere aan de basale/laterale zijde van de cel. Deze barrière wordt bepaald door een specifieke intercellulaire verbinding, namelijk de **tight junction**, waardoor er geen eiwitten of lipiden van de apicale naar de basale zijde kunnen migreren (of omgekeerd).



## Membraantransport

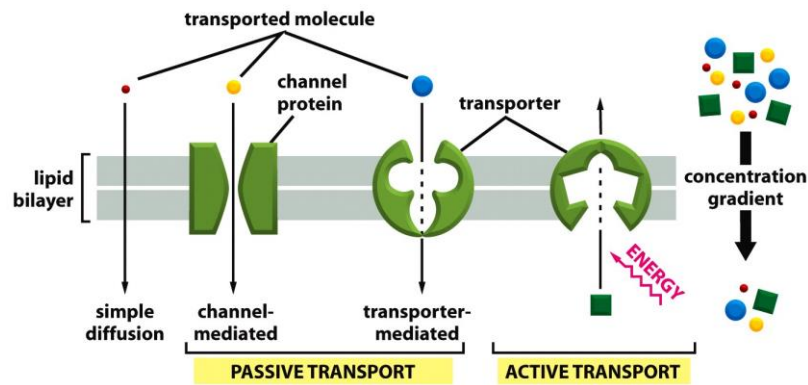
Omdat membranen uit een hydrofobe lipide bilayer bestaan, worden alleen water en niet-polaire moleculen doorgelaten door simpele diffusie. Voor polaire moleculen, zoals ionen, suikers, aminozuren en nucleotiden, gaat diffusie te traag en zijn er **membranaire transporteiwitten** nodig. Indien er een defect is in deze transporteiwitten worden er ziektes veroorzaakt zoals mucoviscidose. Hierbij is er een defect in het CFTR-eiwit, waardoor het transport van chloride-ionen in de longen verstoord is.

Het transmembranaire karakter van eiwitten wordt gekenmerkt door hun structureel motief: de  **$\alpha$ -helix**. Dit is energetisch de meest gunstige structuur. De  $\alpha$ -helices bestaan uit aminozuren waarvan de zijgroep meestal hydrofoob is. De peptide binding zelf is polair en interageert met zichzelf via waterstofbruggen, aangezien  $H_2O$  ontbreekt. Het maximaal aantal waterstofbruggen kan enkel voorkomen indien er een  $\alpha$ -helix structuur gevormd is.

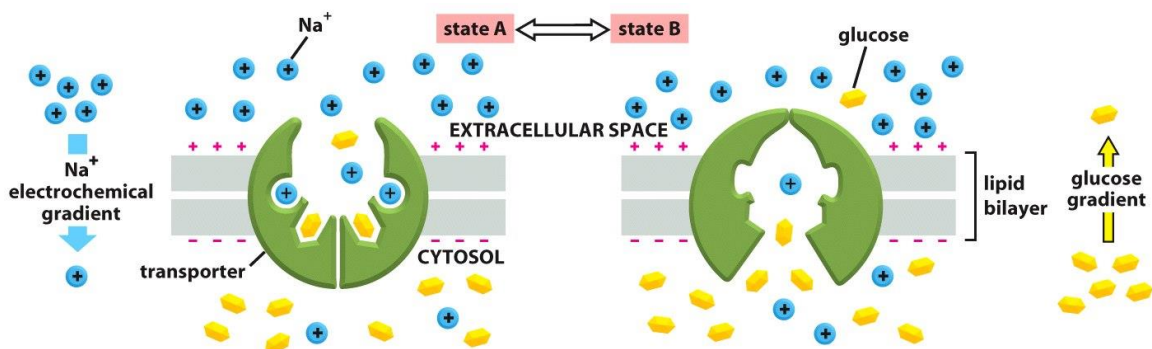


## Multipass-transmembranaire eiwitten

Membranaire transporteiwitten zijn altijd “multipass”-transmembranaire eiwitten. Hierin bestaan er twee klassen: **kanalen** en **transporters**. Een kanaal vormt een porie gevuld met  $H_2O$ , en gaat een beperkte interactie aan met het te transporteren molecule. Kanalen zorgen enkel voor passief transport, waarbij het te transporteren molecule met de concentratiegradiënt (of elektrochemische gradiënt) mee wordt getransporteerd, waardoor dit geen energie kost. Een transporter bindt specifiek aan het te transporteren molecule en ondergaat vervolgens conformationele wijzigingen om het molecule doorheen het membraan te transporteren. Dit transport kan zowel actief als passief zijn. Er is sprake van actief transport als het molecule tegen de elektrochemische gradiënt in getransporteerd wordt, omdat hier energie voor nodig is. Deze is afkomstig van ATP-hydrolyse of een ionengradiënt.

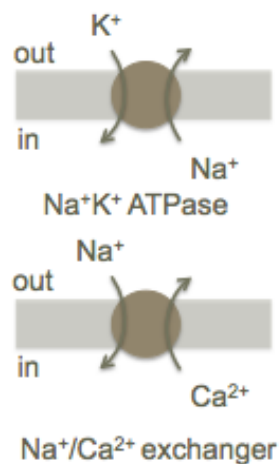


Een voorbeeld van actief transport gedreven door een ionengradiënt is het transport van glucose de cel in, via de **Na<sup>+</sup>/glucose-transporter**. In het plasmamembraan is er een Na<sup>+</sup>-gradiënt, waardoor transport van Na<sup>+</sup> van buiten naar binnen de energie levert voor het actief transport van andere moleculen tegen de gradiënt in. Na<sup>+</sup> dat naar binnen wordt getransporteerd, wordt weer de cel uitgepompt door een ATP-afhankelijke Na<sup>+</sup>-pomp om de gradiënt te onderhouden. Deze pomp levert dus indirect de energie voor het transport van de moleculen die co-transport ondergaan met Na<sup>+</sup>. Dit wordt ook wel **secundair actief transport** genoemd. De Na<sup>+</sup>/glucose-transporter heeft twee reversibele toestanden, waarbij de binding van Na<sup>+</sup> en glucose **coöperatief** is. Dit wil zeggen dat de binding van de ene molecule zorgt voor een conformationele wijziging die de affiniteit voor het andere molecule vergroot. Enkel als beide moleculen gebonden zijn zal het transport plaatsvinden. Aangezien de Na<sup>+</sup>-concentratie buiten de cel hoger is, is het waarschijnlijker dat de glucosetransporter bindt in toestand A dan in toestand B. Het transport van Na<sup>+</sup> en glucose de cel in (toestand A naar B) is dus meer waarschijnlijk dan omgekeerd.



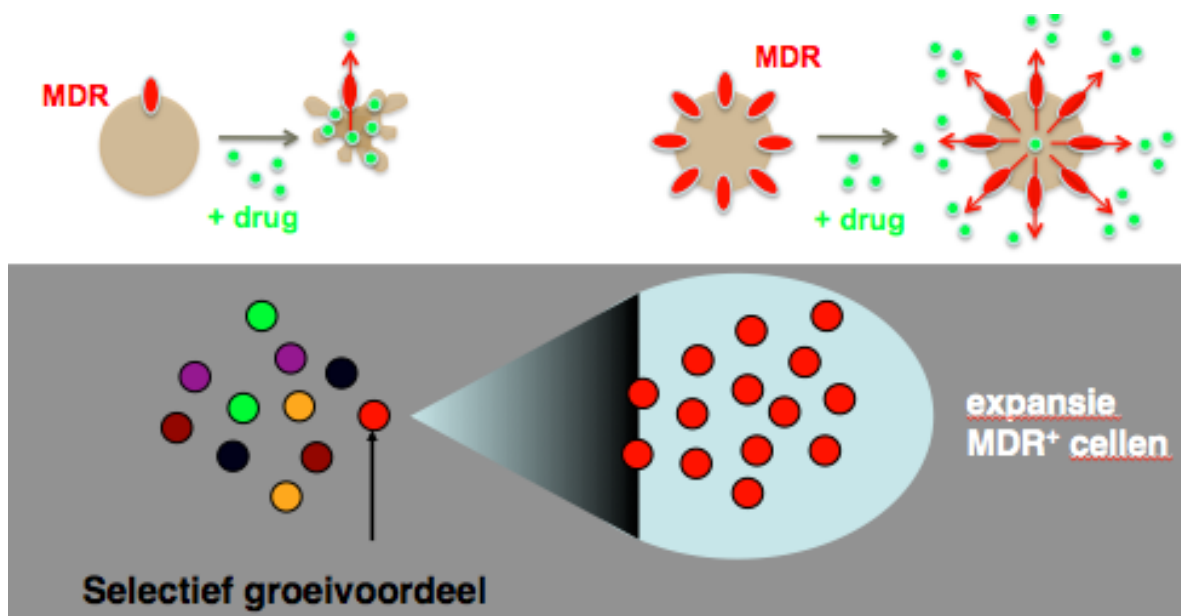
## 1) $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

In het plasmamembraan bevinden zich ook **ATP-afhankelijke pompen**, oftewel transport ATPases, zoals **P-type pompen**. Dit zijn multipass transmembranaire eiwitten die vooral gebruikt worden om ionengradiënten op te bouwen. Een voorbeeld hiervan is de  **$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**. Deze antiporter pompt  $\text{Na}^+$  tegen de elektrochemische gradiënt naar buiten en  $\text{K}^+$  naar binnen, waarvoor de energie geleverd wordt door ATP-hydrolyse. Deze pomp kan geïnhibeerd worden door bijvoorbeeld het cardiotoxine **digoxine**. Dit wordt gebruikt als geneesmiddel om de hartslagfrequentie te verminderen, maar de contractiekracht te vergroten. Indien de pomp niet meer werkt, neemt de  $\text{Na}^+$ -concentratie in de cel toe. Door de toename in intracellulair  $\text{Na}^+$  zal er minder  $\text{Na}^+$  in de cel en minder  $\text{Ca}^{2+}$  uit de cel getransporteerd worden door de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger (passief transport). Hierdoor neemt de  $\text{Ca}^{2+}$ -concentratie in de cel toe, wat zorgt voor een verhoogde contractiekracht.



## 2) ABC-transporters

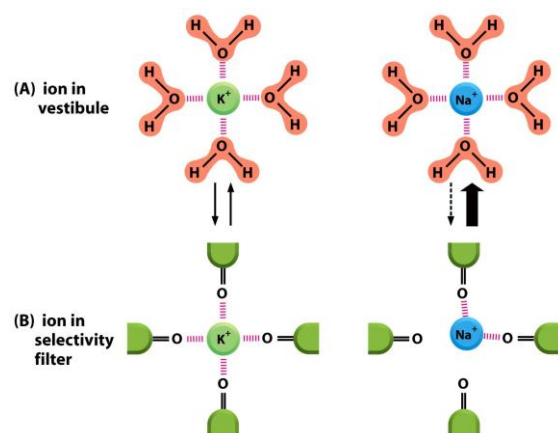
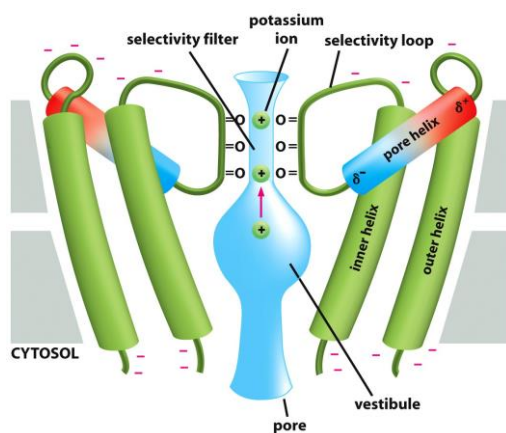
Een ander type ATP-afhankelijke transporter is de **ABC-transporter**. Deze bevat **ATP-Binding Cassettes**, welke kleine moleculen doorheen membranen transporteren. Dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld P-type, V-type en F-type pompen, welke enkel ionen transporteren. Een voorbeeld is het CFTR-eiwit dat defect is bij *mucoviscidose*. Dit eiwit zorgt voor passief transport van chloride-ionen met de elektrochemische gradiënt mee, maar ATP is nodig om het kanaal te openen en sluiten. ABC-transporters zijn ook betrokken bij het ontstaan van **resistentie** tegen chloroquine (bij malaria), of anti-kanker medicijnen. In het plasmamembraan van kankercellen zitten ABC-transporters (**MDR**, multidrug resistentie glycoproteïne) die chemotherapeutica naar buiten transporteren. In een normale cel zijn er niet voldoende transporters om alle hydrofobe chemotherapeutica naar buiten te transporteren en de cel zal hierdoor sterven. In kankercellen die meer MDR-eiwitten in hun plasmamembraan hebben, zullen de medicijnen efficiënter naar buiten getransporteerd worden, waardoor ze wel kunnen overleven. Deze hebben dus een **selectief groeivoordeel** en kunnen zich vermenigvuldigen.



### 3) Ionenkanalen

**Ionenkanalen** zijn nauwe, selectieve poriën, die bestaan uit polaire aminozuren die de opening begrenzen, en hydrofobe aminozuren die interageren met de lipide bilayer. Deze poriën fluctueren tussen een open en een gesloten toestand. In de open toestand kunnen ionen via diffusie (dus passief transport) door het kanaal getransporteerd worden. Dit gaat  $10^5$  keer sneller dan met een gewone transporter. De poriën laten enkel ionen van een bepaalde grootte doorheen het kanaal, waarbij de kleinste opening als een **selectiviteitsfilter** dient. De kanalen zijn niet continu open, maar ze zijn **'gated'**, waardoor ze enkel openen na een specifieke stimulus, zoals een elektrische ('voltage gated'), een mechanische, of het binden van een ligand (bijv. neurotransmitters, ionen of nucleotiden). Indien er een continue chemische of elektrische stimulus is, gaan de meeste kanalen over in een geïnactiveerde toestand, waardoor ze niet meer geactiveerd kunnen worden totdat de stimulus verdwijnt.

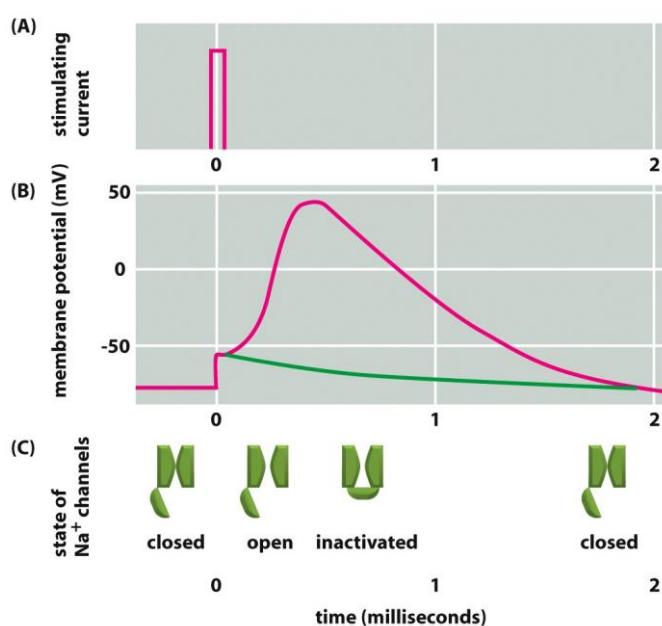
De meest voorkomende ionenkanalen zijn **K<sup>+</sup>-kanalen**. Deze kanalen hebben een porie bestaande uit vier subunits, die een vestibule en een selectiviteitsfilter vormen. In de vestibule wordt K<sup>+</sup> gestabiliseerd door het negatieve uiteinde van de "pore helix", welke K<sup>+</sup> naar de selectiviteitsfilter trekt. In de selectiviteitsfilter zitten carbonyl-zuurstof atomen. Als K<sup>+</sup> de porie binnengaat wordt het gedehydrateerd, maar het verlies aan energie wordt gecompenseerd door een interactie met de carbonylgroepen (surrogaat voor H<sub>2</sub>O). Deze zuurstofatomen zijn zo gepositioneerd dat enkel K<sup>+</sup> kan binden. Voor een Na<sup>+</sup>-ion, dat kleiner is, zijn de carbonyl-zuurstof atomen te ver weg, waardoor het niet door de porie gaat.



Een bepaald type  $K^+$ -kanaal bevindt zich altijd in geopende toestand, namelijk de ' **$K^+$ -leak channels**'. Deze zijn essentieel voor het in stand houden van het membraanpotentiaal van het plasmamembraan. Een membraanpotentiaal is een verschil in elektrische lading aan beide zijden van een membraan. Dit wordt veroorzaakt door elektrogene pompen en kanalen, zoals onder andere de  $Na^+/K^+$ -pomp. Deze pompt  $Na^+$  naar buiten en  $K^+$  naar binnen.  $K^+$  zorgt voor de neutralisatie van de negatief geladen ionen binnen de cel, wat de lekkage van  $K^+$  door de  $K^+$ -leak channels compenseert. Als de elektrische aantrekkingskracht het effect van de concentratiegradiënt compenseert, zal er een rust membraanpotentiaal ontstaan (= negatief).

## Zenuwimpuls

In neuronen vindt er **signaaloverdracht** plaats aan de hand van veranderingen in het membraanpotentiaal. Deze signalen verspreiden zich naar andere delen van de cel. Normaal gezien zou dit signaal verzwakken, tenzij het geamplificeerd wordt, wat belangrijk is bij lange

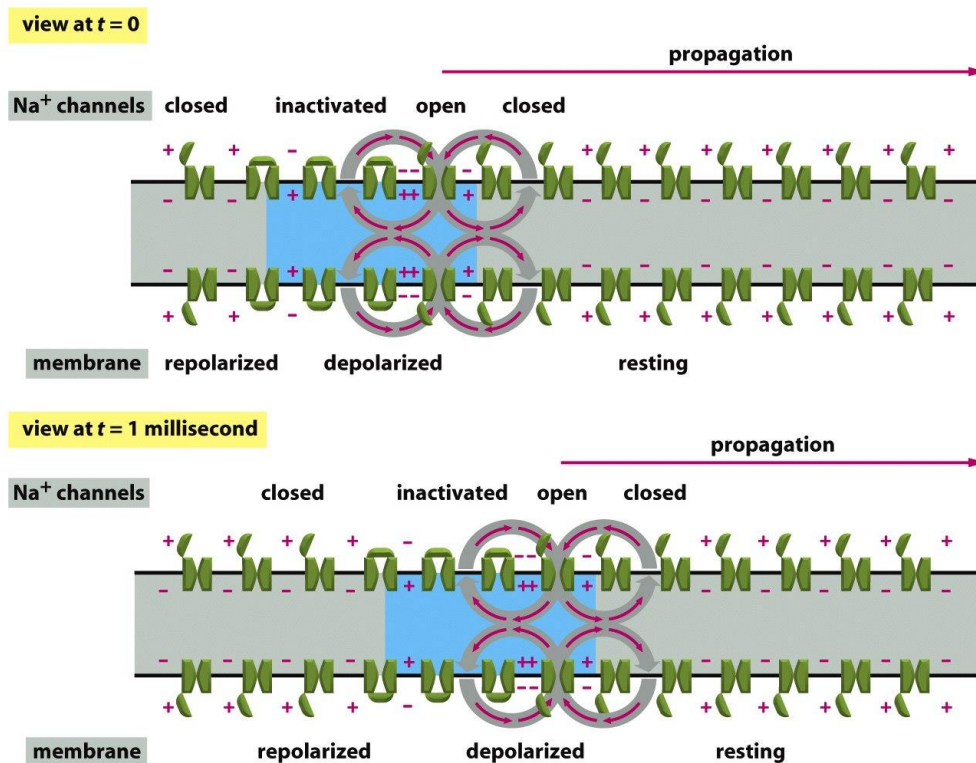


afstanden zoals in neuronen. Indien een elektrische stimulus een bepaalde drempel ("threshold") overschrijdt, stimuleert het een 'explosie' van elektrische activiteit die zich propageert via de neuronale plasmamembraan. Dit wordt onderhouden door een automatische amplificatie wat tot de voortbeweging van het signaal leidt. Zo een zenuwimpuls wordt ook wel een **actiepotentiaal** genoemd.

Een actiepotentiaal wordt geïnitieerd door **depolarisatie** van het plasmamembraan, waardoor het membraanpotentiaal positief wordt. Indien de depolarisatie een drempelwaarde overschrijdt, gaan er 'voltage-gated'  $Na^+$ -kanalen open, waardoor  $Na^+$  de cel binnenstroomt met de elektrochemische gradiënt mee. Deze influx van  $Na^+$  leidt tot verdere depolarisatie, waardoor er nog meer  $Na^+$ -kanalen opengaan: **zelf-amplificatie**. Als de elektrochemische drijfkracht nihil is, worden de  $Na^+$ -kanalen **geïnactiveerd**. Ze kunnen dan



enkel opnieuw geopend worden als het membraanpotential terug de initiële negatieve waarde bereikt heeft. Ondertussen worden ook 'voltage-gated'  $K^+$ -kanalen geopend, die  $K^+$  de cel uit laten stromen, waardoor het membraanpotential zich sneller herstelt. Er kan geen nieuwe actiepotential plaatsvinden als de  $Na^+$ -kanalen geïnactiveerd zijn. Hierdoor kan het signaal ook maar *één richting* op gaan en zich zo verplaatsen over de zenuwuiteinden.



## ***Intracellulaire compartimenten: Eiwit-sortering***

De intracellulaire compartimenten kunnen in 4 grote families ingedeeld worden:

1. Nucleus en cytosol
2. Alle organellen die functioneren in de secretorische en endocytotische pathways
3. Mitochondriën
4. Plastiden

Eiwitten worden gesynthetiseerd door ribosomen. Om deze naar specifieke compartimenten te brengen zijn er specifieke sorteersignalen nodig. Eiwitten die geen sorteersignaal hebben blijven in het cytosol.

Er zijn 3 verschillende sorteerprincipes:

### **1) Gated transport**

Bij dit type transport worden eiwitten getransporteerd tussen het cytosol en de nucleus, welke topologisch equivalent zijn, via nucleaire porie complexen (NPC's) in het nucleaire membraan. Deze nucleaire porie complexen zijn selectief en gebruiken actief transport om macromoleculen en macromoleculaire complexen te transporteren. Kleine moleculen kunnen echter ook passeren via diffusie (passief transport).

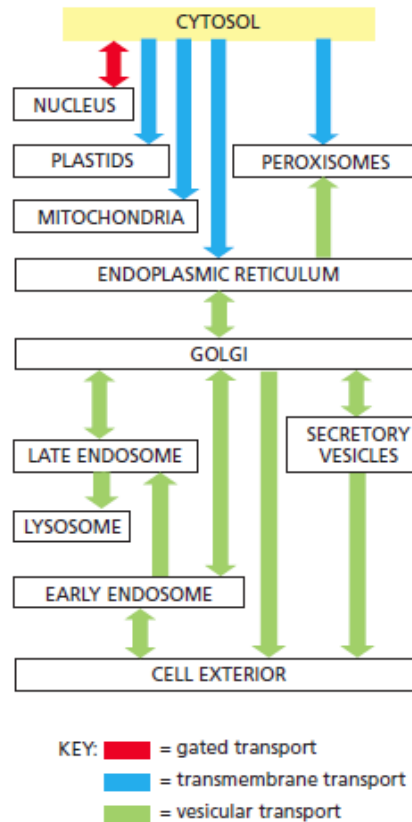
### **2) Transmembranair transport**

Transmembranaire eiwit-translocators transporteren eiwitten direct doorheen het membraan vanuit het cytosol naar een topologisch verschillend compartiment. Om getransporteerd te kunnen worden dienen eiwitten meestal ontvouwen te zijn. Het transport vanuit het cytosol naar het ER of de mitochondriën vindt op deze manier plaats.

### **3) Vesiculair transport**

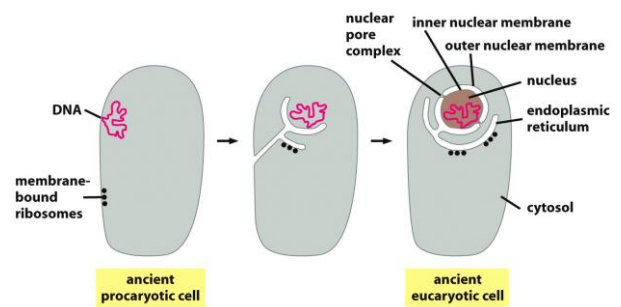
Bij vesiculair transport worden eiwitten van het ene compartiment naar het andere getransporteerd door membraan-omsloten intermediären. Dit kunnen kleine, sferische transportvesikels zijn, maar ook grotere, onregelmatig gevormde organelfragmenten. De vesikels of fragmenten worden geladen met moleculen afkomstig van het lumen van het ene

compartiment en splitsen vervolgens hiervan af. Het cargo wordt in het andere compartiment afgegeven door het fuseren van het vesikel met het doelwitmembraan. Omdat er geen transmembranair transport gebeurt, kan dit transport enkel plaatsvinden tussen topologisch equivalente compartimenten. Een voorbeeld hiervan is het transport van solubele eiwitten tussen het ER en het Golgi apparaat.



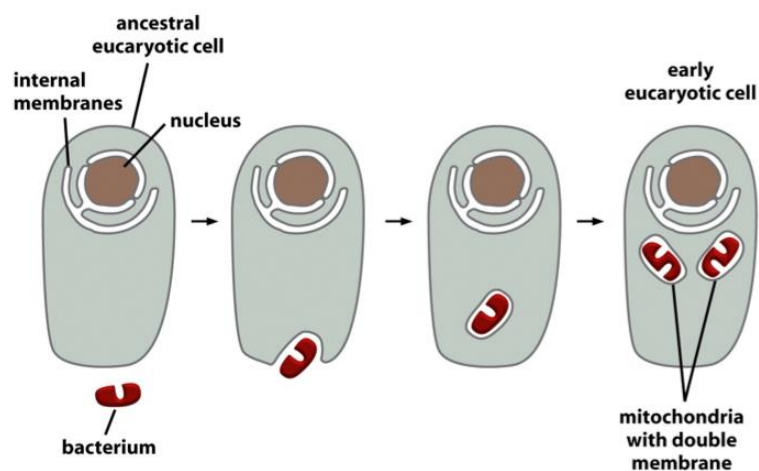
## Oorsprong van intracellulaire organellen.

De oorsprong en evolutie van intracellulaire organellen in eukaryote cellen is gebaseerd op zowel membraaninvaginatie als invaginatie van prokaryotische cellen (**endosymbiotische theorie**). De nucleus en het ER zouden zijn ontstaan door invaginatie van het



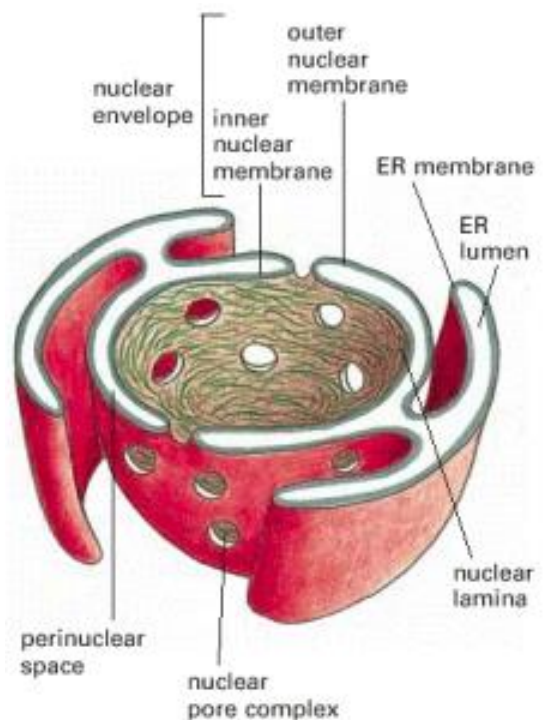
plasmamembraan van prokaryotische cellen. Dit plasmamembraan bevatte zowel membraangebonden ribosomen als DNA dat bevestigd was aan het membraan. De invaginatie van het membraan heeft het DNA omsloten en zo de kern gevormd, en de ribosomen zijn deel uit gaan maken van het ER. Dit verklaart waarom het lumen van het ER topologisch equivalent is met het extracellulaire milieu en de nucleus topologisch equivalent is met het cytosol.

De endosymbiotische theorie houdt in dat eukariotische intracellulaire organellen zijn verworven door de evolutie van geïnternaliseerde prokaryotische cellen. De mitochondriën zouden zijn ontstaan door de opname van een aerobische eubacterie in een vroege eukariotische cel. Ook de chloroplasten in een plantcel zouden ontstaan zijn door de opname van een fotosynthetische eubacterie. Beide hebben een eigen genoom, een eigen functie, en een unieke interne membraan, welke equivalent is aan het plasmamembraan van bacteriën en ook gelijkaardige eiwitten bevat. Mitochondriaal DNA vertoont nog steeds overeenkomsten met bacterieel DNA.



## Nucleus

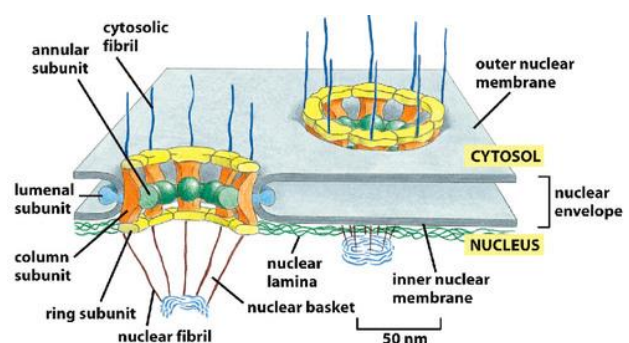
De nucleus wordt omgeven door een dubbele membraan. Deze is continu, maar desondanks zijn de eiwitcomposities van de binnenste en buitenste membraan verschillend. De **binnenste nucleaire membraan** bevat specifieke eiwitten die dienen als verankeringsplaatsen voor chromatine en de nucleaire lamina – een fibreus netwerk dat steun geeft aan de nucleaire membraan. De **buitenste nucleaire membraan** is continu met het membraan van het endoplasmatisch reticulum (ER). Het membraan bevat ribosomen, net zoals het ER, die betrokken zijn bij eiwitsynthese. De eiwitten die door deze



ribosomen worden gesynthetiseerd, worden naar de perinucleaire ruimte (tussen de binnenste en buitenste membraan) getransporteerd. Deze ruimte is continu met het ER lumen. Genetische defecten aan het nucleaire membraan leiden tot **laminopathieën** zoals musculaire dystrofie (spier), neuropathie (zenuwstelsel), dermopathie (huid), cardiomyopathie (hart), melorheostosis (beenderen), lipodystrofie (vetten) en progeria (veroudering).

## Gated transport

Transport tussen de nucleus en het cytosol vindt plaats doorheen **nucleaire porie complexen (NPC's)**. De NPC's bestaan uit 4 verschillende types subunits, met daarnaast fibrillen aan zowel de cytosolische als de nucleaire zijde. Aan de nucleaire zijde vormen deze een korfstructuur. Omdat de NPC's grote, hydrofiele poriën zijn, kunnen grote moleculen getransporteerd worden zonder dat deze ontvouwen hoeven te worden.

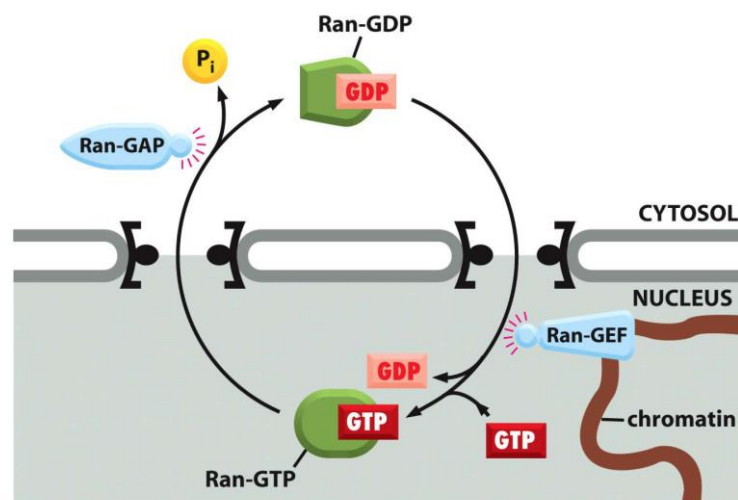


**Nucleaire lokalisatiesignalen (NLS)** richten het transport van nucleaire eiwitten naar de nucleus. Ze zijn verantwoordelijk voor de selectiviteit van de (actieve) nucleaire import. Het signaal bestaat uit korte sequenties van de positief geladen aminozuren lysine en arginine. Deze lokalisatiesignalen kunnen op elke plaats in de aminozuursequentie voorkomen en vormen 'loops' of 'patches' op het eiwitoppervlak. Ook kunnen de signalen via een linker aan cytosolische eiwitten gekoppeld worden.

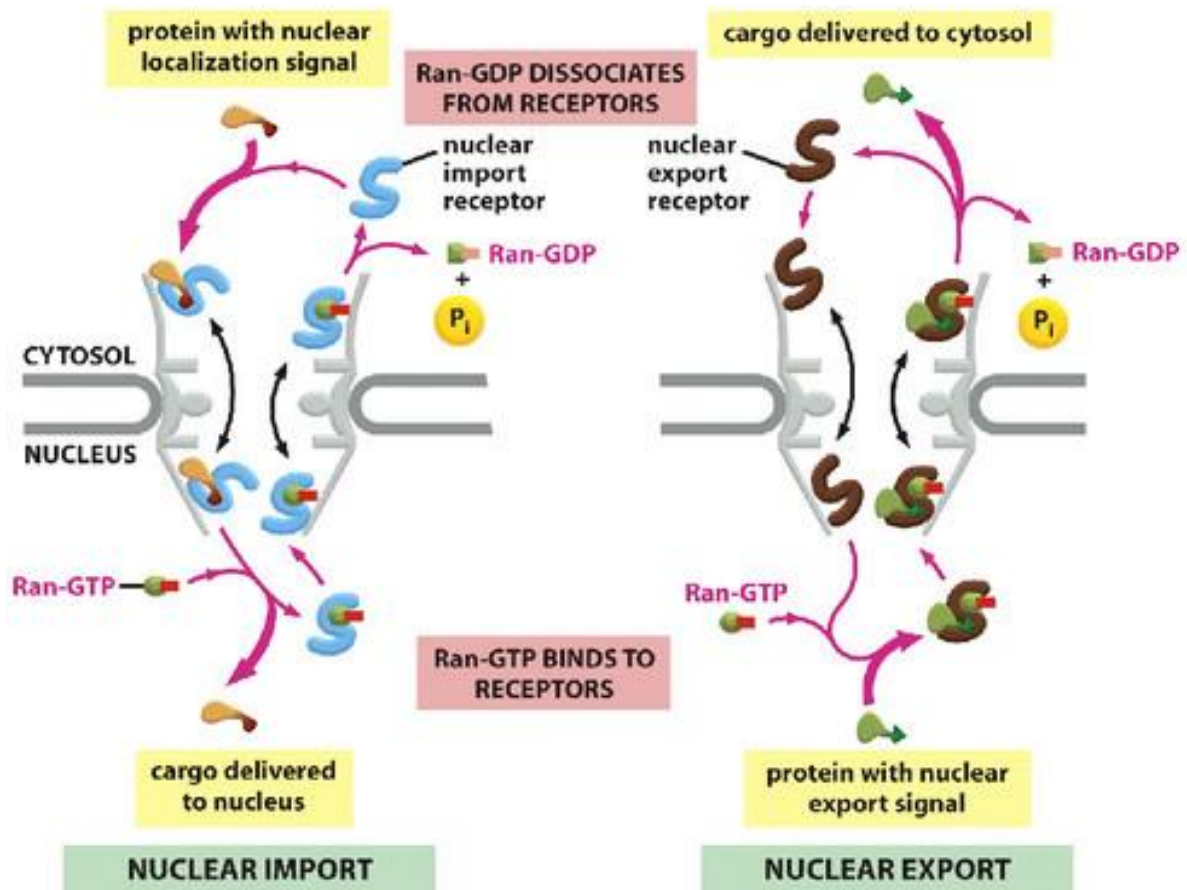
Om nucleaire import plaats te laten vinden, moeten de NLS herkend worden door **nucleaire import receptoren (NIR)**. Elk type NIR bindt een bepaalde subset van cargo-eiwitten. Sommige NIR eiwitten kunnen enkel aan de NLS binden met behulp van een **nucleaire import adaptor**. Tijdens de import bindt de NIR op de fibrillen en op NPC porie eiwitten welke **FG-repeats** bevatten. Dit zijn aminozuursequenties rijk aan fenylalanine en glycine. Door telkens aan de volgende FG-repeat sequentie te binden, 'hopt' de NIR doorheen de NPC.

Nucleaire export verloopt op een gelijkaardige manier. Het cargo-eiwit zal een **nucleair exportsignaal (NES)** bevatten, dat bindt op een **nucleaire export receptor (NER)**. Deze wordt vervolgens op dezelfde manier doorheen de NPC getransporteerd.

Het transport doorheen de NPC's wordt gefaciliteerd door de **hydrolyse van GTP** door het GTPase **Ran**. Ran is een eiwit dat in twee conformaties bestaat, afhankelijk van de binding van GTP of GDP. Twee Ran-specifieke regulatorische eiwitten zorgen voor de omzetting tussen beide conformaties.



In het cytosol zorgt **GTPase-activating protein (Ran-GAP)** voor de omzetting van Ran-GTP tot Ran-GDP. In de nucleus zorgt **guanine exchange factor (Ran-GEF)** voor de omzetting van Ran-GDP tot Ran-GTP. Door de verschillende lokalisatie van Ran-GEF en Ran-GAP, bevindt er zich meer Ran-GDP in het cytosol en Ran-GTP in de nucleus. Dit bepaalt de directionaliteit van het nucleaire transport.

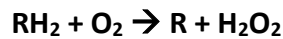




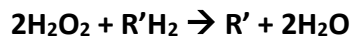
## Peroxisomen

**Peroxisomen** zijn structuren die omgeven worden door één enkel membraan. Omdat ze geen DNA of ribosomen bevatten, worden alle peroxisomale eiwitten vanuit het cytosol geïmporteerd.

In de peroxisomen bevinden zich enzymen die *oxidatiereacties* aangaan waarbij waterstofperoxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gevormd wordt:



Vervolgens wordt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> door **catalase** gebruikt om andere substraten, zoals fenolen en alcohol, te oxideren door middel van een *peroxidatie reactie*:



Dit gebeurt vooral in de lever en nieren, waar er belangrijke detoxificatiereacties plaatsvinden.

Een belangrijke functie van de oxidatiereacties is de **beta-oxidatie**: het verkorten van vetzuurketens tot **Acetyl-CoA** moleculen. Deze Acetyl-CoA moleculen worden dan terug naar het cytosol getransporteerd voor verdere reacties.

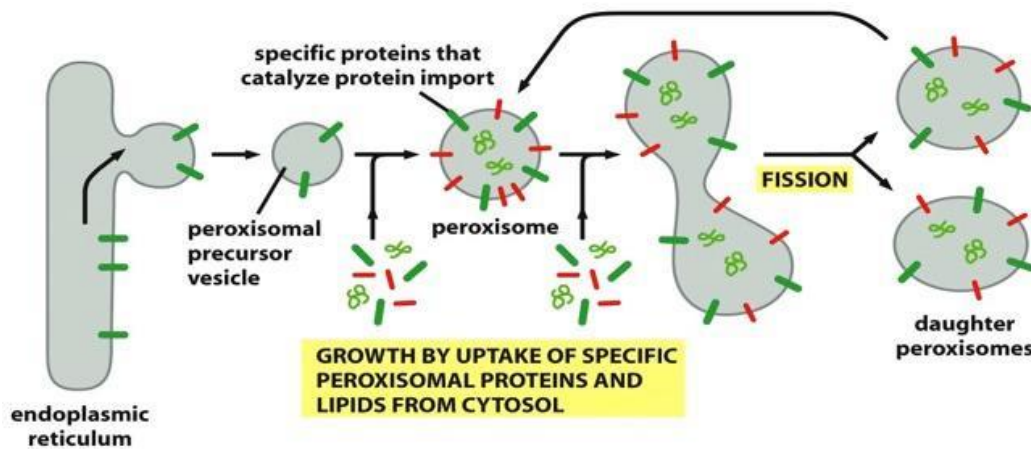
Een andere essentiële functie van peroxisomen is het katalyseren van de eerste reacties van de biosynthese van **plasmalogens**. Dit zijn de belangrijkste fosfolipiden in myeline.

Een signaalsequentie op de C-terminus van veel peroxisomale eiwitten dient als import signaal voor deze eiwitten. Solubele receptoreiwitten in het cytosol en dockingeiwitten op de cytosolische kant van de peroxisomen binden aan deze signaalsequenties. Bij dit ATP-afhankelijke importproces zijn **peroxines** betrokken. Deze peroxines vormen membraan translocators waardoor het eiwit getransporteerd kan worden. Het eiwit hoeft hierbij niet ontvouwen te worden, waardoor het transport dus op eiwittransport naar de nucleus lijkt.

Peroxisomale precursorvesikels ontstaan vanuit het ER. Deze kunnen met elkaar of met al bestaande peroxisomen fuseren. De peroxisomale eiwitten en lipiden worden opgenomen



vanuit het cytosol. Peroxisomen kunnen ook splitsen (**fission**) tot twee 'dochter'-peroxisomen.



Bij het **Zellweger syndroom** is er bijvoorbeeld een mutatie in een van de specifieke eiwittransporters voor peroxisomen. Dit leidt tot 'lege', dysfunctionele peroxisomen, met hersen-, lever- en nierdysfuncties tot gevolg. Ook is er een verstoorde biosynthese van plasmalogen, waardoor er demyelinisatie ontstaat. Dit maakt het tot een neurologisch syndroom.

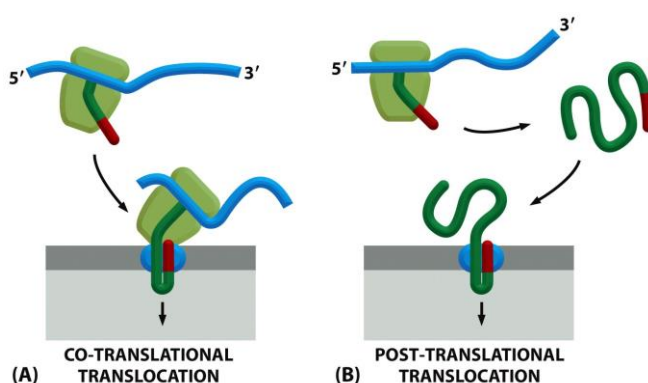
## ***Endoplasmatisch reticulum (ER)***

Het **endoplasmatisch reticulum (ER)** bevat meer dan 50% van de membranen in een cel. Het is een continuatie van de nucleaire membraan. De ruimte tussen de membranen wordt ook wel het **ER-lumen** of **ER-cisterna** genoemd.

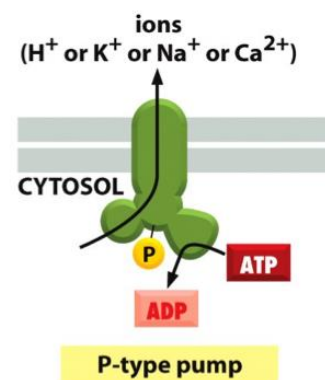
De belangrijkste **functies** van het ER zijn:

- Eiwit biosynthese
- Lipide biosynthese
- Opslagplaats voor intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$
- Het ER membraan zorgt voor de productie van alle transmembranaire eiwitten en lipiden van de meeste organellen, waaronder het ER, Golgi apparaat, lysosomen, endosomen, secretorische vesikels en het plasma membraan
- De meeste lipiden voor mitochondriële en peroxisomale membranen worden in het ER membraan gesynthetiseerd
- Vrijwel alle eiwitten die gesecreteerd worden, of deze bestemd voor het ER lumen, Golgi apparaat en de lysosomen, worden initieel afgeleverd in het ER lumen

Het ER heeft een structurele en functionele diversiteit in verschillende celtypes. Hiervoor zullen regio's van het ER zich specialiseren. Het **ruw ER** is de regio waar de eiwitsynthese plaatsvindt. Dit gebeurt door middel van ribosomen die op het ER membraan zijn gebonden via **co-translatieel transport**. Co-translatieel transport gaat gepaard met het SRP-eiwit en zijn respectievelijke receptor die het transport faciliteert. Import van eiwitten waarvan de polypeptide keten volledig is gesynthetiseerd, naar mitochondriën, nucleus, peroxisoom of chloroplast, wordt ook wel **post-translatieel transport** genoemd.



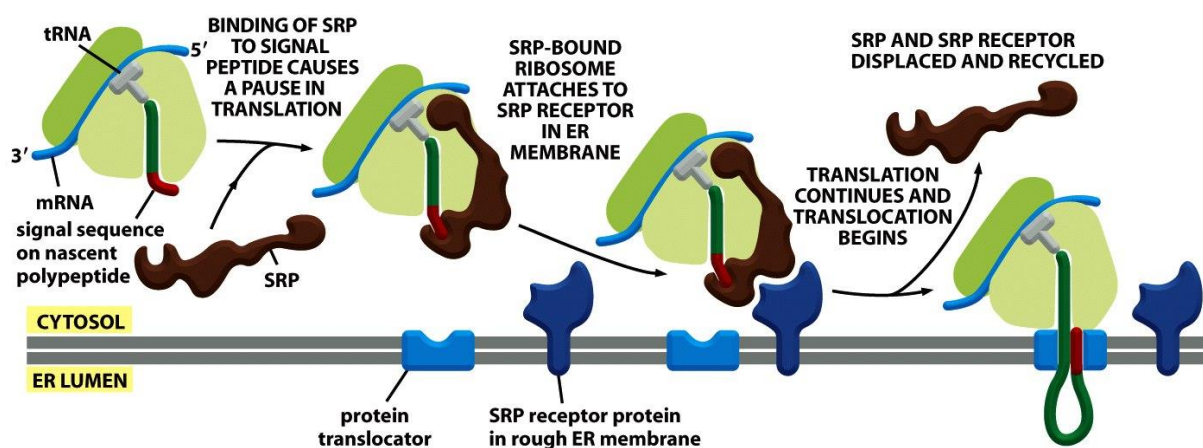
Regio's zonder membraangebonden ribosomen worden het **glad ER** genoemd. Het glad ER zorgt voor de biosynthese van lipiden, lipoproteïne partikels (Bijv. in hepatocyten) en hormonen (Bijv. in testosteron-producerende Leydig cellen in de testis). Ook kan het detoxificatie-enzymes bevatten (Bijv. detoxificatie-enzyme cytochrome P450 in hepatocyten) en een intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$ -pool vormen. In spiercellen wordt het glad ER ook wel het sarcoplasmatisch reticulum genoemd. Hierbij speelt het **SERCA eiwit** een belangrijke rol. Het SERCA eiwit fungeert als een P-type calciumpomp die er voor zorgt dat  $\text{Ca}^{2+}$  actief getransporteerd wordt in een spiercel. Bij spiercontractie zal  $\text{Ca}^{2+}$  uit het ER in het cytosol gepompt worden, terwijl bij spierrelaxatie  $\text{Ca}^{2+}$  terug uit het cytosol in het ER lumen gepompt wordt. De regio van het glad ER van waaruit transportvesikels afgesplitst worden om naar het Golgi-apparaat getransporteerd te worden, wordt ook wel het **transitionele ER** genoemd.



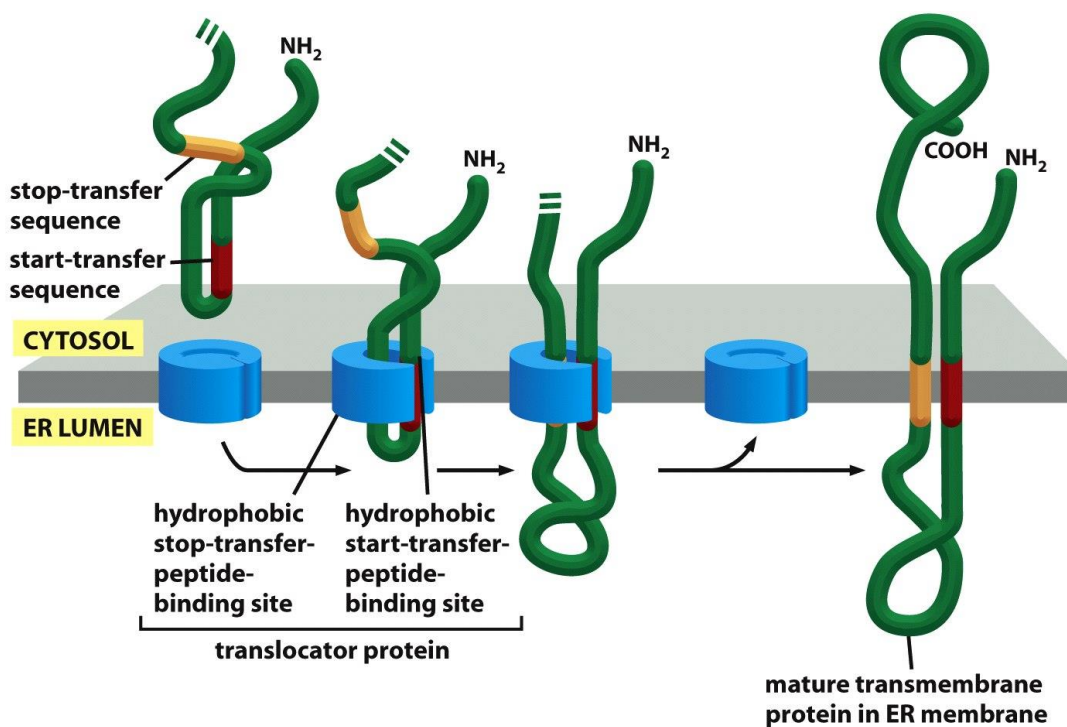
Langs het ER membraan worden **transmembranaire eiwitten** gesynthetiseerd die zich uiteindelijk via het Golgi apparaat en vesiculair transport een weg banen naar andere membranen die een onderdeel vormen van de endocytosiche/secretorische pathway. Ook eiwitten die gesecreteerd worden, worden eerst in het ER membraan gesynthetiseerd en komen via het ER lumen in andere topologisch equivalente compartimenten terecht om uiteindelijk in het extracellulaire milieu te belanden.

## Co-translationeel transport

Voor de synthese van niet-cytosolische eiwitten, speelt de ER-signaalsequentie of het N-terminaal “leader” peptide een belangrijke rol. Het “signal-recognition particle eiwit” (**SRP eiwit**) en de “signal-recognition particle receptor” (**SRP receptor**) zijn betrokken in dit proces. Het SRP eiwit bevindt zich in het cytosol en zorgt voor de binding op de signaalsequentie van een eiwit. Het SRP-eiwit pauzeert de eiwitsynthese door de binding van elongatiefactoren op het ribosoom te verhinderen. Dit complex (bestaande uit het mRNA, ribosoom, de gevormde polypeptideketen met signaalsequentie en SRP) wordt dan getransporteerd naar het ER-membraan en bindt via het SRP-eiwit op de SRP-receptor die ingebed ligt in het ER-membraan. Vervolgens bindt de signaalsequentie op de **eiwit translocator**, zodat het SRP-eiwit opnieuw vrijkomt en zijn functie kan hervatten. Bijgevolg kan het SRP de binding van de elongatiefactoren op het ribosoom niet meer verhinderen, zodat de polypeptide synthese weer kan voortgezet worden. De polypeptide keten wordt dan tijdens de synthese simultaan getransporteerd doorheen het ER membraan. Dit proces wordt ook wel **co-translationeel transport** genoemd.



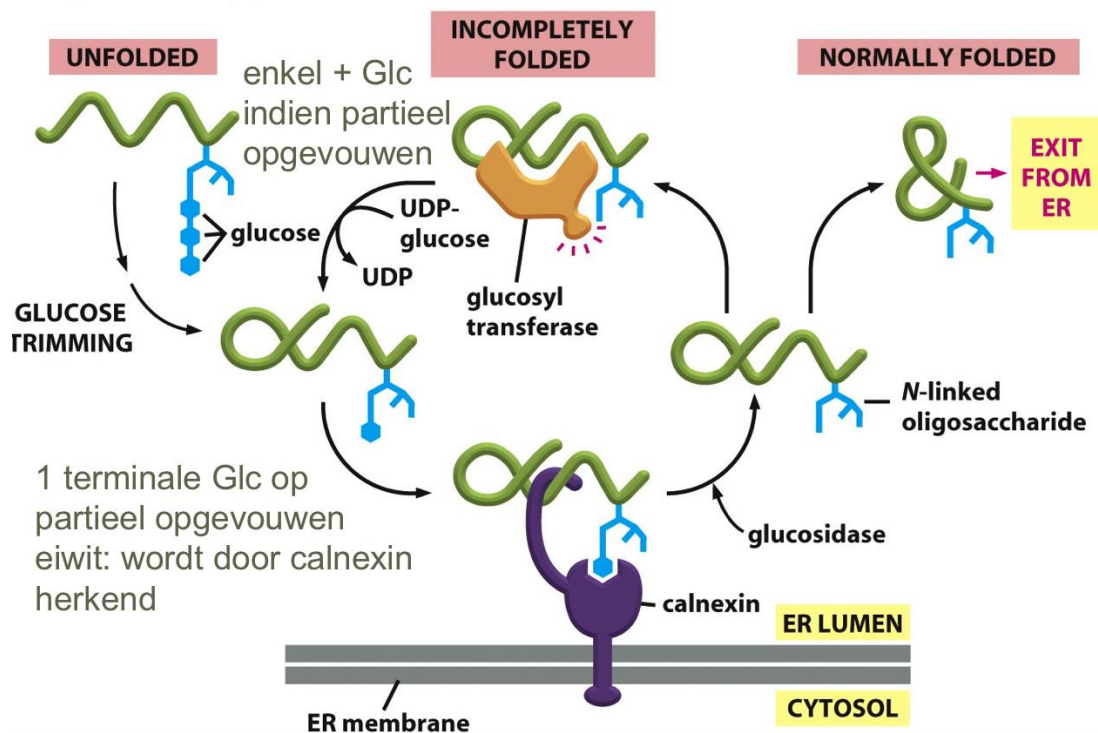
De binding van het ribosoom zich aan de ER-translocator zorgt voor de opening van de ER-porie. De kern van de ER-translocator heet het **Sec61-complex** en bestaat uit drie subeenheden. Het N-terminaal ER-“leader”-peptide fungeert vervolgens als hydrofoob **start-transfer signaal** en zal doorheen de dubbele fosfolipide laag van het ER membraan getransfereerd worden. Indien het eiwit in kwestie ook een hydrofoob **stop-transfer signaal** bevat, dan zal de ER-translocator een conformationele verandering ondergaan als het stop-transfer signaal de ER-translocator betreedt en bindt met de binding site. Deze conformationele verandering leidt tot dissociatie van het eiwit, zodat het andere uiteinde van het eiwit zich lateraal van de dubbele fosfolipide laag van het ER membraan bevindt. Het eindresultaat vormt een **doublepass transmembranair eiwit**. In het geval van complexe multipass transmembranaire eiwitten zijn er meerdere start- en stop-transfersequenties, met een **multipass transmembranair eiwit** als eindresultaat.



## Chaperones

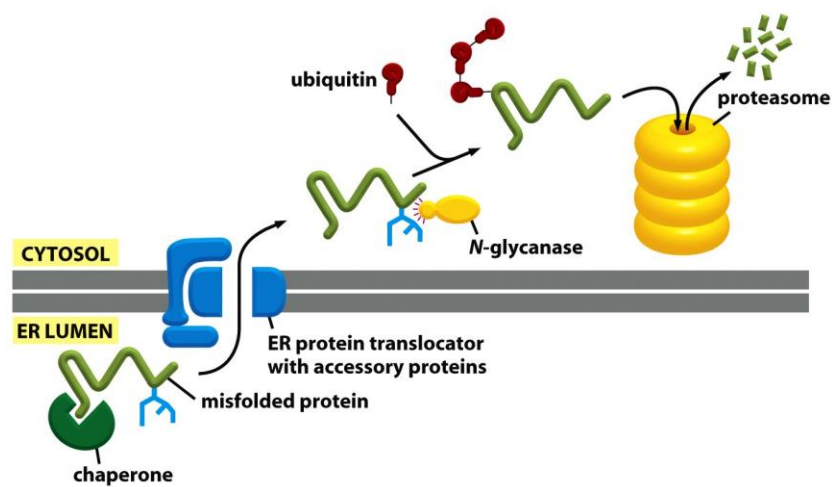
**Chaperone**-eiwitten staan in voor het post-translationeel transport en het begeleiden van incorrect opgevouwen eiwitten. Bij dit laatste zal het chaperone-eiwit binden op incorrect opgevouwen sequenties (Bijv.  $\beta$ -sheet motief) van het gesynthetiseerd eiwit om te verhinderen dat het eiwit zal aggregereen en op deze manier het eiwit in het ER-lumen te houden. Het chaperone-eiwit faciliteert de heropvouwing van het incorrect opgevouwen eiwit.

*Calnexine* is een chaperone-eiwit dat terminale glucose residu's herkent op incorrect opgevouwen glycoproteïnes. Bijgevolg zit het incorrect opgevouwen glycoproteïne als het ware "gevangen" in het ER lumen. Het glucosidase-enzyme zal vervolgens de terminale suiker verwijderen zodat het eiwit opnieuw vrijkomt. Indien het eiwit dan correct is opgevouwen kan het eiwit het ER verlaten. Indien het eiwit echter nog steeds niet correct is opgevouwen dan ondergaat het eiwit een glycosylatie, zodat een terminaal glucose residu op de oligosaccharidestructuur van het glycoproteïne gekoppeld wordt. Dit glycoproteïne met terminale glucoseresidu's kan opnieuw gebonden worden door calnexine. De cyclus kan zich herhalen tot het eiwit de correcte conformatie aangenomen heeft.



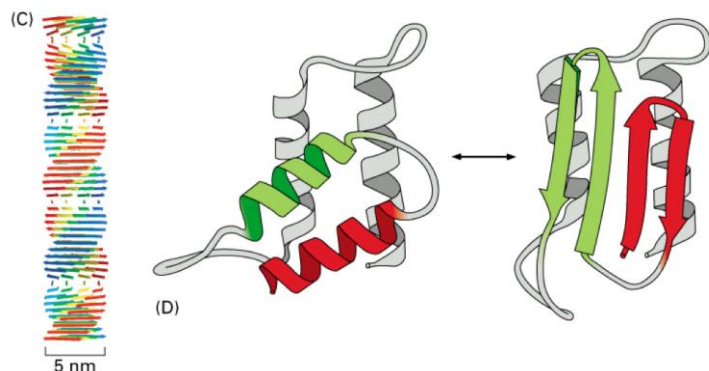
## Proteasoom

Eiwitten die ondanks de werking van deze chaperones toch niet correct zijn opgevouwen, worden geëxporteerd vanuit het ER-lumen om in het cytosol gedegradieerd te worden via het **proteasoom**. Het proteasoom is een multicomplex eiwit, bestaande uit verschillende compartimenten, dat instaat voor de degradatie van het incorrecte opgevouwen eiwit, gemedieerd via **poly-ubiquitylatie**. **Ubiquitine** zal binden op het target (slecht opgevouwen eiwit) en is verantwoordelijk voor de begeleiding naar het proteasoom. De centrale cylinder van het proteasoom, met protease als actieve site, staat in voor het knippen van het slecht opgevouwen eiwit tot kleine polypeptiden.



## Medische relevantie – voorbeeld

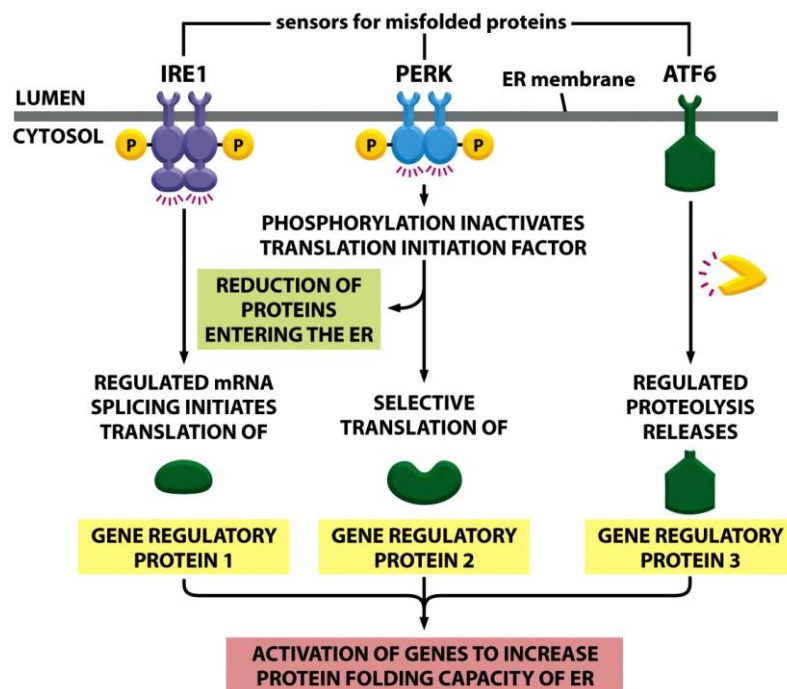
In sommige gevallen zijn er incorrect opgevouwen eiwitten, resistent aan proteasen, die aggregaten veroorzaken en toxisch kunnen zijn. **Creutzfeldt-Jakob** is een neurodegeneratieve ziekte die veroorzaakt wordt door amyloïde aggregaten. Dit pathologische eiwit-aggregaat bestaat uit een cross- $\beta$ -filament dat leidt tot een amyloïde depositie, welke resistent is tegen proteolyse. Dit eiwit, ook wel **prion** genoemd, is infectieus en zal andere correct gevormde eiwitten vervormen tot homodimeren met als eindresultaat een amyloïde plaque.





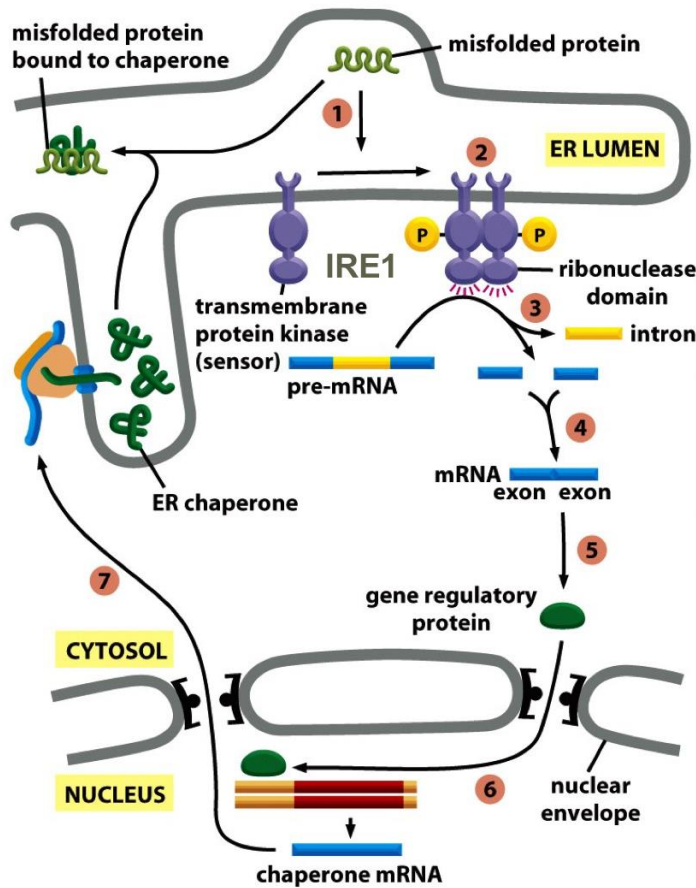
## Unfolded protein response

Om de potentieel schadelijke effecten van incorrect opgevouwen eiwitten tegen te gaan, zal een accumulatie van incorrect opgevouwen eiwitten in het ER een “**unfolded protein response**” (UPR) stimuleren. Dat houdt in dat meerdere transcripties van genen, die coderen voor *ER chaperone-eiwitten* en eiwitten betrokken in *retro-translocatie* en *eiwit-degradatie*, gestimuleerd zullen worden. Hierbij worden 3 verschillende pathways geactiveerd om de opbouw-capaciteit van eiwitten in het ER te verbeteren: (1) Activatie van IRE1, (2) Activatie van PERK en (3) Activatie van ATF6.



### Specifiek : IRE1-pathway

Incorrect opgevouwen eiwitten kunnen de IRE-1 receptor activeren via fosforylatie. De IRE-1 receptor is een transmembranair kinase. Deze geactiveerde IRE-1 kinase verwerft vervolgens endoribonuclease-activiteit, wat leidt tot splicing van specifieke RNA's die op hun beurt coderen voor specifieke **transcriptiefactoren (TF)** die de expressie van chaperonegenen kunnen activeren. De overeenkomstige chaperone-eiwitten worden in het ER aangemaakt via co-translationeel transport, waarna ze in het ER lumen accumuleren. Daar kunnen ze hun functie vervullen en door binding op incorrect opgevouwen eiwitten conformationele wijzigingen induceren, die leiden tot een correcte 3D-conformatie van het betrokken eiwit in kwestie.



1 MISFOLDED PROTEINS IN ER SIGNAL THE NEED FOR MORE ER CHAPERONES BY ACTIVATING A TRANSMEMBRANE KINASE

2 ACTIVATED KINASE TURNS INTO AN ENDORIBONUCLEASE

3 ENDORIBONUCLEASE CUTS SPECIFIC RNA MOLECULES AT TWO POSITIONS, REMOVING AN INTRON

4 TWO EXONS ARE LIGATED TO FORM AN ACTIVE mRNA

5 mRNA IS TRANSLATED TO MAKE A GENE REGULATORY PROTEIN

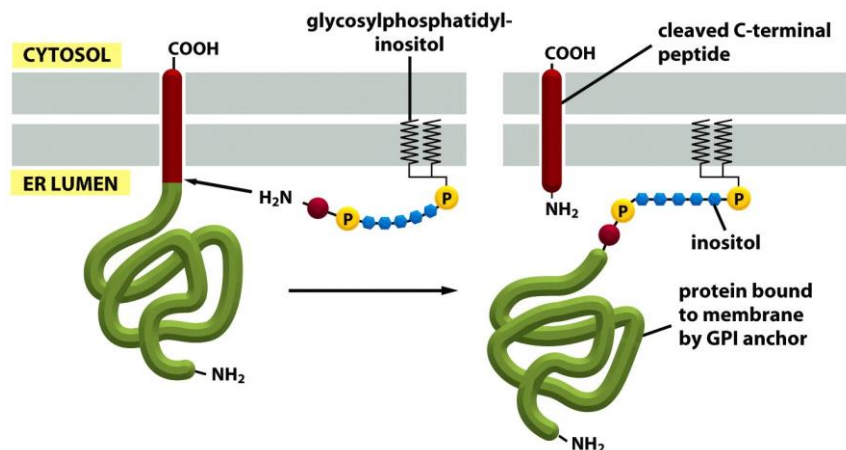
6 GENE REGULATORY PROTEIN ENTERS NUCLEUS AND ACTIVATES GENES ENCODING ER CHAPERONES

7 CHAPERONES ARE MADE IN ER, WHERE THEY HELP FOLD PROTEINS



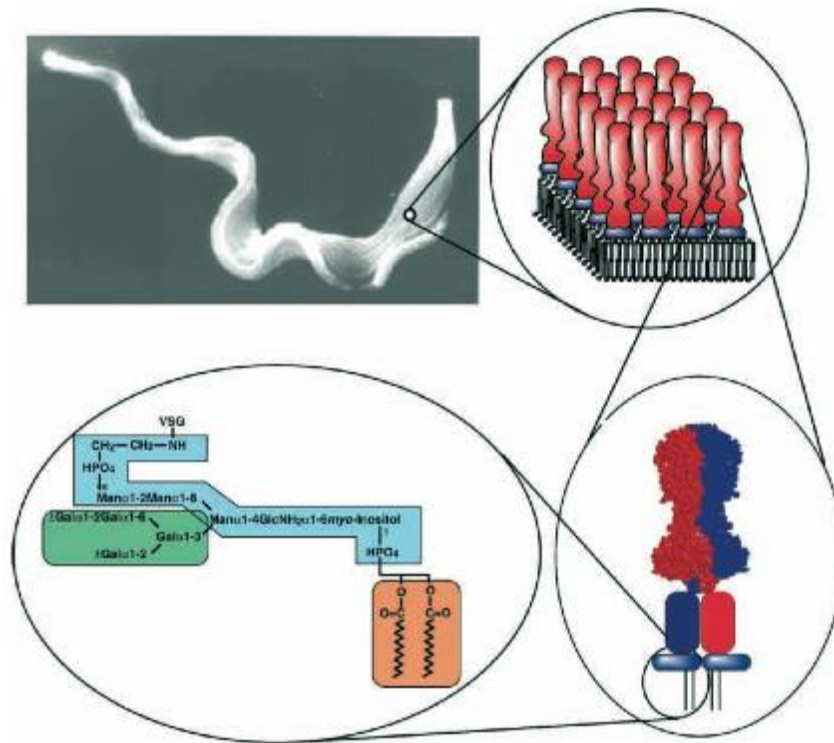
## GPI verankering

Eiwitten kunnen ook vast geankerd zijn aan het membraan via een **glycosyl-fosfatidyl inositol (GPI)** structuur. Het ER-membraan bevat enzymen die covalente GPI-modificatie van een membraaneiwit katalyseren. Deze GPI of glycosyl-phosphatidyl inositol zorgt ervoor dat het membraaneiwit geknipt wordt van het ER-membraan door fosfolipase en vervolgens vrijkomt in het ER-lumen.



### Medische relevantie – voorbeeld

**Slaapziekte** is een ziekte die veroorzaakt wordt door een protozoaire parasiet, **trypanosoom**, die overgebracht wordt door de tsetseevlieg. Slaapziekte kan in een sluimerende staat voorkomen zolang de ziekte zich nog niet in de hersenen heeft gevestigd. Bij de West-Afrikaanse slaapziekte (*t. brucei gambiense*) kan dit jaren duren. De Oost-Afrikaanse slaapziekte (*t. brucei rhodesiense*) verloopt echter agressiever en kan in enkele maanden fataal zijn. Wanneer de parasiet de hersenen binnendringt, ontstaan verwardheid, slaapstoornissen, epileptische aanvallen, moeite met lopen en gevoelloosheid in handen en voeten. Uiteindelijk vermagert de patiënt snel, raakt in coma en sterft. De ziekte loopt, wanneer zij niet wordt behandeld, altijd dodelijk af. Afrikaanse slaapziekte bedreigt dagelijks meer dan 60 miljoen mensen in rurale gebieden onder de Sahara.



De **trypanosoom-parasiet** is omgeven door variabele oppervlakte-eiwitten (VSG) welke verankerd zijn via GPI-ankers. Deze **VSG-eiwitten** spelen een zeer belangrijke rol om de immuunrespons tegen de parasiet te omzeilen, op basis van verschillende mechanismen.

### 1) Coating van het membraan met VSG

De VSG-moleculen zorgen voor een dichte eiwit “coating” waardoor de parasiet afgeschermd wordt voor een mogelijke aanval van het immuunsysteem van de gastheer

### 2) Antigenische variatie

Bij blootstelling aan trypanosoom-parasieten, zal het immuunsysteem na verloop van tijd antilichamen genereren die op de VSG-eiwitten kunnen binden. Door moleculaire recombinatie in het DNA van de trypanosoom-parasiet, slaagt deze erin een andere VSG-variant op zijn membraan tot expressie te brengen. Die nieuwe variant wordt dan niet meer herkend door de oorspronkelijke antilichamen, en nieuwe antilichamen moeten aangemaakt worden om op deze nieuwe variant te kunnen binden. Dit proces herhaalt zich voortdurend, waardoor de parasiet telkens een stap voor blijft op een mogelijk aanval van het immuunsysteem. Dankzij antigenische variatie van het VSG kan de trypanosoom-parasiet op deze manier het immuunsysteem van de gastheer omzeilen (= immuno-evasie).

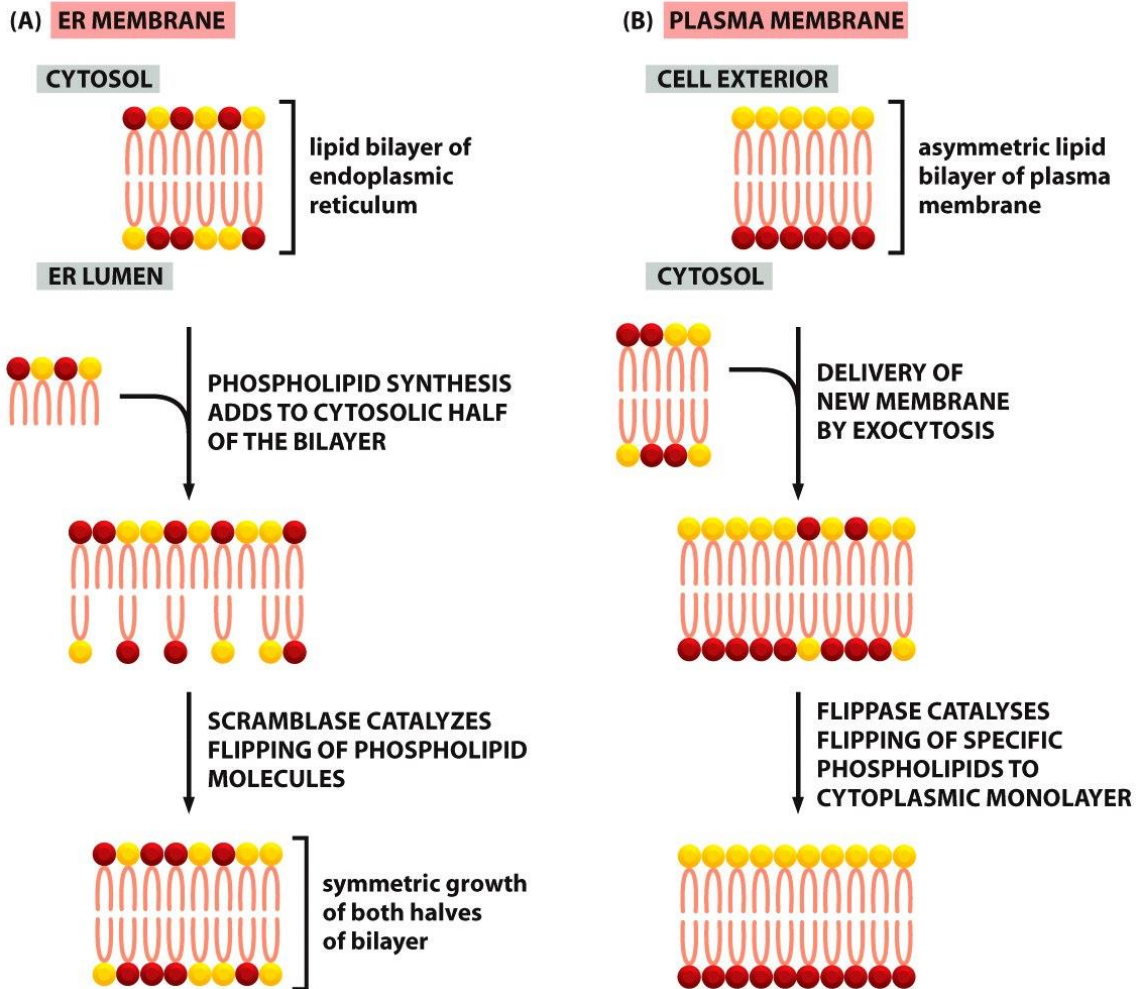
### 3) Afknippen VSG als afleidingsmanoeuvre

De VSG-moleculen kunnen afgeknipt worden van het plasmamembraan van de parasiet door fosfolipase. Deze afgeknipte, vrije VSG-moleculen doen dan dienst als 'afleidingsmanoeuvre' waarop antilichamen kunnen binden zonder consequenties voor het trypanosoom zelf, welke hierdoor opnieuw kan ontkomen aan het immuunsysteem.

### Synthese fosfolipiden

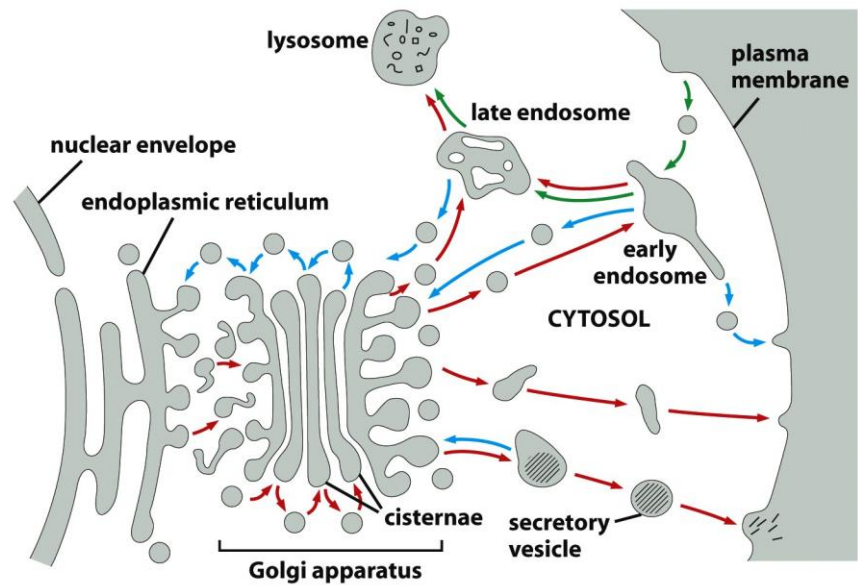
Fosfolipiden zijn essentieel voor de vorming van membranen. De synthese hiervan vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum. Nieuwe fosfolipiden worden enkel toegevoegd aan de cytosolische zijde van het ER-membraan. Spontane '**flip-flop**' van deze fosfolipiden naar de luminale zijde van het ER-membraan gaat zeer langzaam, dus wordt deze stap gekatalyseerd door een fosfolipide-translocator, namelijk **scramblase**. Hierdoor ontstaat er een membraan waarbij de verschillende fosfolipiden evenredig verdeeld zijn over beide zijden.

In het plasmamembraan zit een andere fosfolipide-translocator, namelijk **flippase**, aangedreven door ATP-hydrolyse. Deze translocator verplaatst fosfatidylserine en fosfatidylethanolamine van de extracellulaire zijde naar de cytosolische zijde, nadat er nieuwe membraanonderdelen via exocytose naar het plasmamembraan zijn gebracht. Op deze manier blijft de asymmetrische eigenschap van het plasmamembraan behouden.

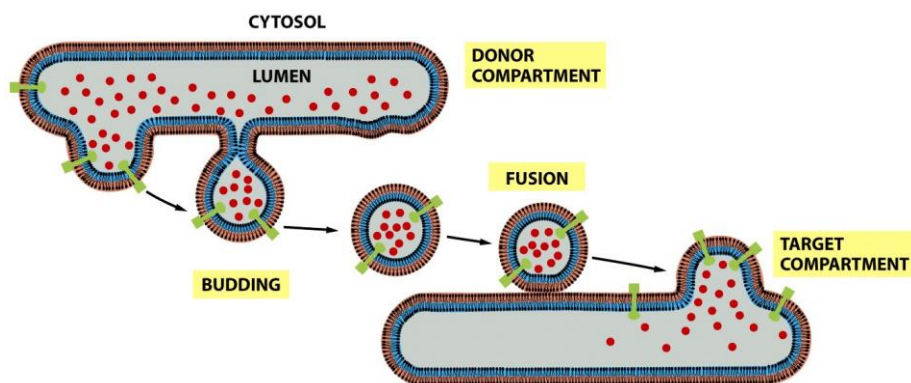


### *Intracellulair vesiculair transport*

Intracellulair vesiculair transport zorgt voor de transfer van moleculen tussen verschillende compartimenten van de **endocytische, biosynthetische-secretorische en retrieval pathway**. De compartimenten die in deze pathways betrokken zijn, zijn topologisch equivalent. Dit intracellulair vesiculair transport omvat **exocytose**, een biosynthetische/secretorische pathway, waardoor nieuw gesynthetiseerde eiwitten, carbohydraten en lipiden naar het plasma membraan of extracellulaire ruimte getransporteerd worden. **Endocytose** is het tegenovergestelde proces, waarbij het plasmamembraan een invaginatie ondergaat en er vesikels ontstaan die hun inhoud afleveren aan interne compartimenten, zoals de **endosomen**. In het geval van exocytose is de inhoud van het **transportvesikel** afkomstig van de intracellulaire ruimte, bij endocytose van de extracellulaire ruimte. De **retrieval pathway** zorgt voor het omgekeerde transport naar het ER.



De vesikels worden afgesnoerd van één compartiment (**donorcompartiment**) om vervolgens te fuseren met een ander compartiment (**targetcompartiment**). Deze vesikels worden geladen met een bepaald **cargo**. **Vesiculaire 'budding'** (afsnoeren) en fusie zijn *niet symmetrisch* omdat elk transport een geschikte bestemming met specifieke cargo bevat. Bovendien zal bij budding eerst de binnenlaag van de 'bilayer'-membraan versmelten en dan pas de buitenlaag, terwijl bij fusie eerst de buitenlagen van de respectievelijke compartimenten versmelten en dan pas de respectievelijke binnenlagen.

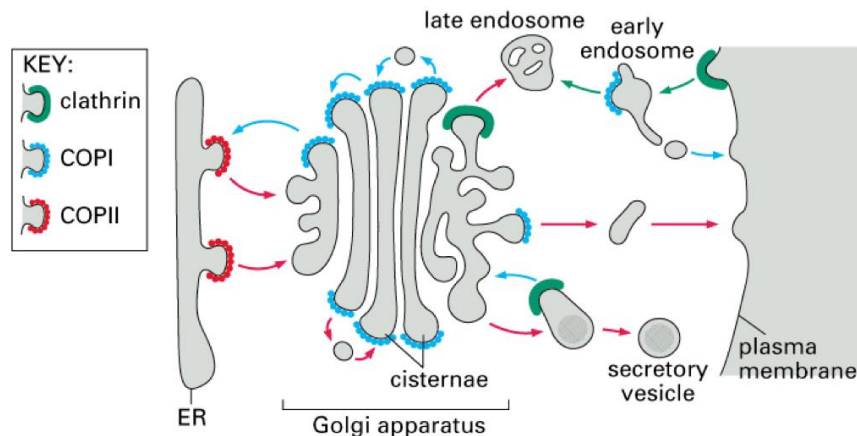


Vesiculair transport vereist ook specifieke moleculaire merkers.

## Vesiculaire coating

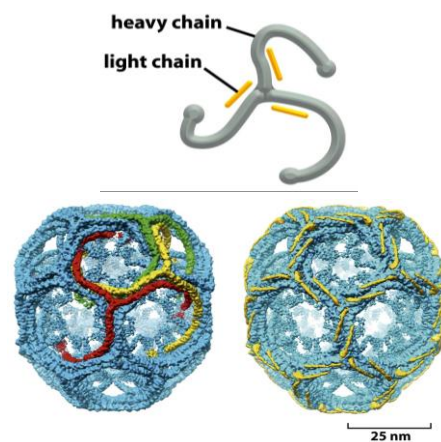
Er is een grote variëteit in het aantal **vesiculaire coatings**, maar drie types van vesiculaire coating zijn goed gekarakteriseerd :

- **Clathrine-coating** → medieert transport vanuit het plasmamembraan & Golgi-endosoom
- **COPI-coating** → medieert transport vanuit het Golgi-apparaat
- **COPII-coating** → medieert transport vanuit het ER

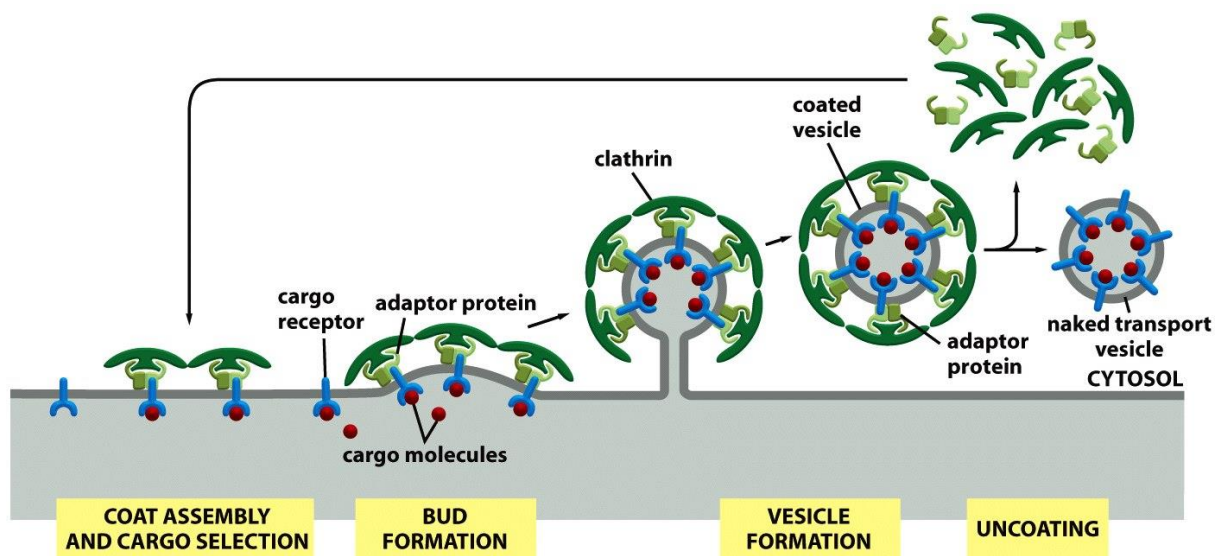


Het hoofdcomponent van het clathrine-coated vesikel bestaat uit **clathrine**, waarvan elk subeenheid bestaat uit drie grote (heavy chain) en drie kleinere (light chain) polypeptide ketens. De gevormde drie-benige structuur wordt ook wel **triskelion** genoemd. Een ander hoofdcomponent is het **adaptoreiwit**, dat zich bevindt tussen clathrine en het membraan. **Adaptoreiwitten** zorgen voor de associatie van verschillende soorten

transmembranaire receptoren met de clathrine-coat. Deze transmembranaire receptoren bevatten het cargo en worden **cargoreceptors** genoemd. Adaptoreiwitten kunnen, zoals retromeereiwitten, ook binden op fosfo-inositiden. De associatie en dissociatie gebeurt als volgt: Adaptoreiwitten en clathrine assembleren met de cargoreceptor. Nadien vormt zich een *bud*, welke uiteindelijk afsnoert tot een transportvesikel. Vervolgens worden de adaptoreiwitten met clathrine gerecycleerd en wordt het transportvesikel samen met het cargo en de cargoreceptor getransporteerd naar een targetcompartiment.

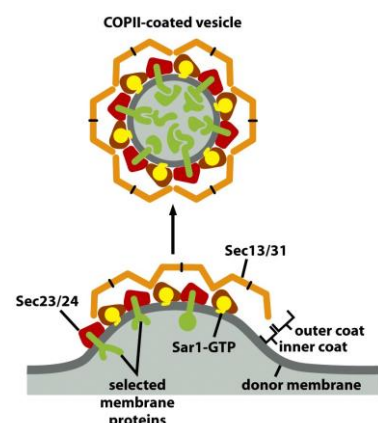




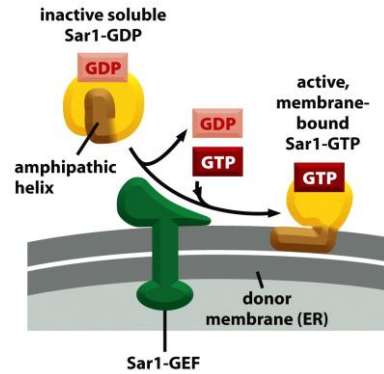


Sommige coatings hebben een directe link met een specifiek cargoeiwit. Deze worden **retromeereiwitten** genoemd. Een retromeer is een multicomplex eiwit dat cargo transporteert van het endosoom naar het Golgi-apparaat. Dit gebeurt enkel als het kan binden op de cytoplasmatische staart van de cargoreceptor, er directe interactie is met de gebogen dubbele fosfolipidelaag, en als het kan binden op specifieke gefosforyleerde fosfatidyl-inositol lipiden (ook wel **fosfoinositiden** (PIP) genoemd). Fosfoinositiden, of PIPs, spelen een belangrijke rol als moleculaire merker van compartimentidentiteit en bij de controle over het vesiculair verkeer. Aangezien deze vereisten simultaan moeten voorkomen, en ook op een welbepaalde plaats en tijdstip, fungeren retromeereiwitten als **coïncidentiedetectoren**. Verder vormen additionele retromeereiwitten dimeren, die de membraankromming stabiliseren. Deze **coöperatieve assemblage** van retromeereiwitten leidt tot de vorming van budding en uiteindelijk tot transportvesikels die ervoor zorgen dat het cargo getransporteerd wordt naar het Golgi-apparaat.

**“Coat-recruitment” GTPase eiwitten** zijn nodig voor de clathrine-coating van endosomen en de coating met COPI en COPII van het Golgi-apparaat en ER-membraan. Coat-recruitment GTPase eiwitten behoren tot de familie van de monomeric GTPases, en zijn verantwoordelijk voor de vorming van COPI-coating van het Golgi-membraan (**Arf**



**eiwitten**) en voor de vorming van COPII-coating van het ER-membraan (**Sar1 eiwitten**). Het coat-recruitment GTPase eiwitcomplex bevindt zich in het cytosol vooral in de inactieve toestand (GDP-gebonden). Wanneer een COPII-coated vesikel zich vormt vanuit een bud van het ER-membraan, bindt Sar1-GDP met het ER-membraan. Hierbij komt GDP vrij en wordt dit vervangen door GTP. Deze spontane reactie is mogelijk door

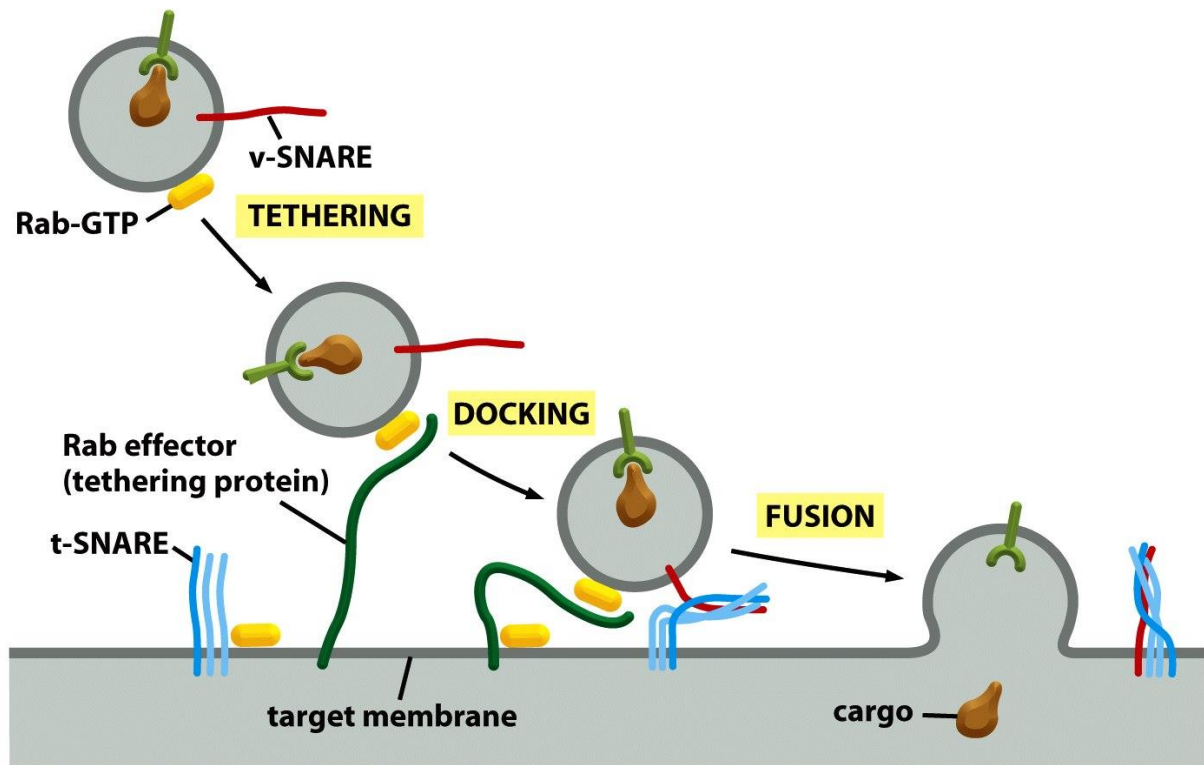


het feit dat GTP in hogere concentratie aanwezig is in het cytosol dan GDP. De binding van Sar1-GTP op het ER-membraan zal er voor zorgen dat verschillende coateiwit subeenheden gerekruteerd worden om vervolgens de budvorming te initiëren. Hydrolyse van het gebonden GTP naar GDP zal zorgen voor een conformationele verandering van de GTPase, met als gevolg dat de coating demonteert.

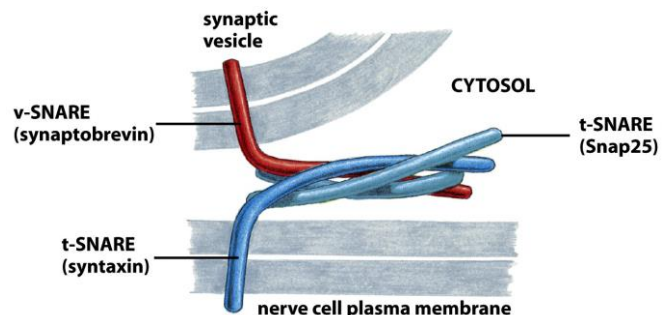
## Vesiculaire fusie

Om ervoor te zorgen dat het vesiculair verkeer ordelijk en specifiek gebeurt, moeten transportvesikels selectief het targetmembraan kunnen herkennen waarmee de fusie plaats gaat vinden. **Rab-eiwitten** spelen een centrale rol in de specificiteit van dit vesiculair verkeer. Rab-eiwitten zijn, zoals coat-recruitment GTPase eiwitten, ook geassocieerd met de familie van de monomerische GTPases. Dankzij hun hoge selectieve distributie zijn ze geschikt als moleculaire merker voor verschillende membraantypes en hun specifieke vesiculaire verkeer. De werking van Rab-eiwitten is analoog aan deze van de coat-recruitment GTPase eiwitten. Eens het actieve Rab-eiwit gebonden is op het membraan (Rab-GTP) van een vesikel, bindt het met **Rab-effectoren** die vesikel transport, membraan tethering en fusie faciliteren. In tegenstelling tot geconserveerde Rab-eiwitten zijn Rab-effectoren erg variabel. Sommige Rab-effectoren fungeren als motoreiwit, dat vesikels transporteert langs actinefilamenten en microtubuli. Andere Rab-effectoren fungeren meer als **tethering-eiwitten**. Deze tethering-eiwitten omvatten domeineiwitten met lange 'slierten' die kunnen binden aan Rab-GTP op vesikels, en deze vervolgens richting het targetmembraan bewegen. Rab-effectoren spelen ook een rol in de interactie met **SNARE-eiwitten** en hierdoor ook een rol in de koppeling van membraantethering aan fusie, aangezien SNARE-eiwitten membraanfusie mediëren.



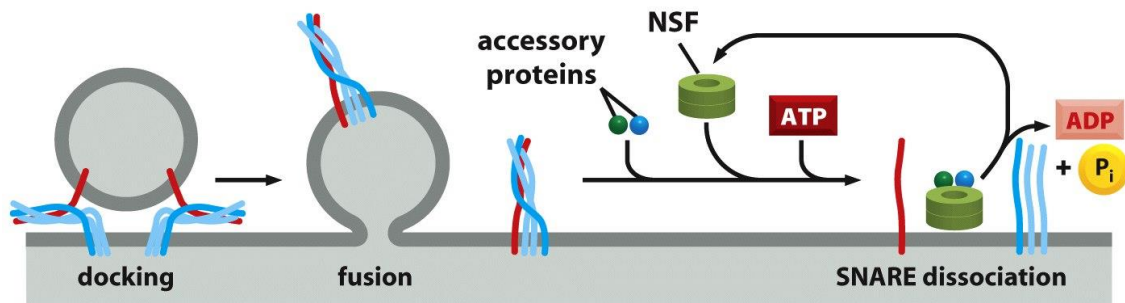


SNARE-eiwitten zijn verantwoordelijk voor de katalysering van het membraan bij de fusie van het vesiculair verkeer. Ook spelen ze een additionele rol in de specificiteit bij het transportproces. Deze transmembranaire eiwitten



bestaan uit een complementaire set van **v-SNARE-eiwitten** en **t-SNARE-eiwitten**. De v-SNARE-eiwitten zijn enkele polypeptideketens die zich op vesikels bevinden, terwijl t-SNARE-eiwitten bestaan uit twee of drie eiwitten die zich op het targetmembraan bevinden. Interacties tussen het v-SNARE helixdomein en t-SNARE helixdomein resulteren in een complex dat het **trans-SNARE complex** wordt genoemd. Het trans-SNARE eiwitcomplex zorgt voor de docking en fusie van synaptische vesikels die zich bevinden op het plasmamembraan van zenuwceluiteinden tijdens de vrijlating van neurotransmitters. De energie die nodig is voor de katalysering van membraanfusie door het trans-SNARE eiwitcomplex is afkomstig van de energie die vrij komt wanneer de helices interageren om de membranen dicht bij elkaar te brengen. Het **NSF-eiwit** is een cruciaal eiwit dat instaat voor de dissociatie van trans-SNARE eiwitcomplexen. Wanneer t-SNARE-eiwitten constant actief zouden zijn op een

targetmembraan, dan zou er continu een complex gevormd kunnen worden met een v-SNARE-eiwit, waardoor twee membranen kunnen fuseren. Om deze constitutieve en ongecontroleerde membraanfusie te vermijden, zorgt het NSF-eiwit voor de dissociatie tussen beide eiwitten. Op deze manier zorgt het NSF-eiwit voor de gepaste tijd en plaats van de vorming van het trans-SNARE eiwitcomplex.



### Medische relevantie – voorbeeld

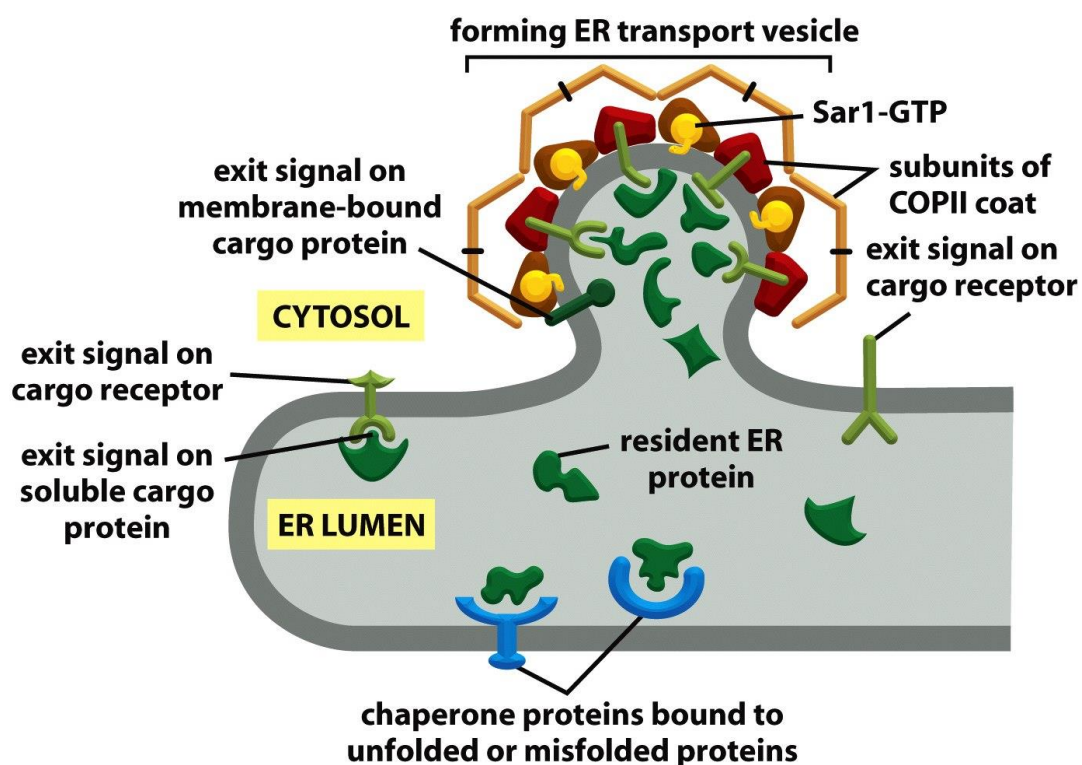
Er bestaan bacteriën, zoals *Clostridium tetani* en *Clostridium botulinum*, die proteolytische neurotoxines secreteren en vrijlaten in specifieke neuronen, met als doel de SNARE-eiwitten te knippen. Hierdoor blokkeert de synaptische transmissie, met bijvoorbeeld verlamming (botulisme) of spierspasmen (tetanus) tot gevolg. Een botox-behandeling voor cosmetische toepassingen werkt volgens hetzelfde principe, aangezien hierbij een botulinetoxine wordt geïnjecteerd om de gezichtsspieren te ontspannen.

## Het Golgiapparaat

Het **Golgi-apparaat**, ook wel Golgi complex genoemd, is verantwoordelijk voor :

- De synthese van polysacchariden
- De synthese van glycosaminoglycanen
- De synthese van oligosacchariden door glycosylatie van eiwitten en lipiden
- Transport van de meeste eiwitten en lipiden naar andere cellulaire compartimenten

Eiwitten die het ER binnentreden en voorbestemd zijn om naar het Golgi-apparaat getransporteerd te worden zijn verpakt in kleine *COPII-coated* transport vesikels. Deze vesikels komen van gespecialiseerde regio's van het ribosoom-vrije ER, die ook **ER-exit sites** worden genoemd. Opname van eiwitten in vesikels die het ER verlaten is een selectief proces waardoor eiwitten in deze vesikels geconcentreerd raken. Cargoreceptoren vertonen een exitsignaal dat herkend wordt door COPII-coat eiwitten. Eiwitten zonder exitsignaal kunnen ook opgenomen worden door het transportvesikel. Deze eiwitten, die zonder exitsignaal functioneren in het ER, worden ook **ER-residente eiwitten** genoemd, maar ze zijn minder efficiënt omdat ze uit het ER 'lekkend' zijn. Dit geldt ook voor secretorische eiwitten die het ER in hoge concentratie verlaten zonder de hulp van exit signalen of cargo eiwitten.

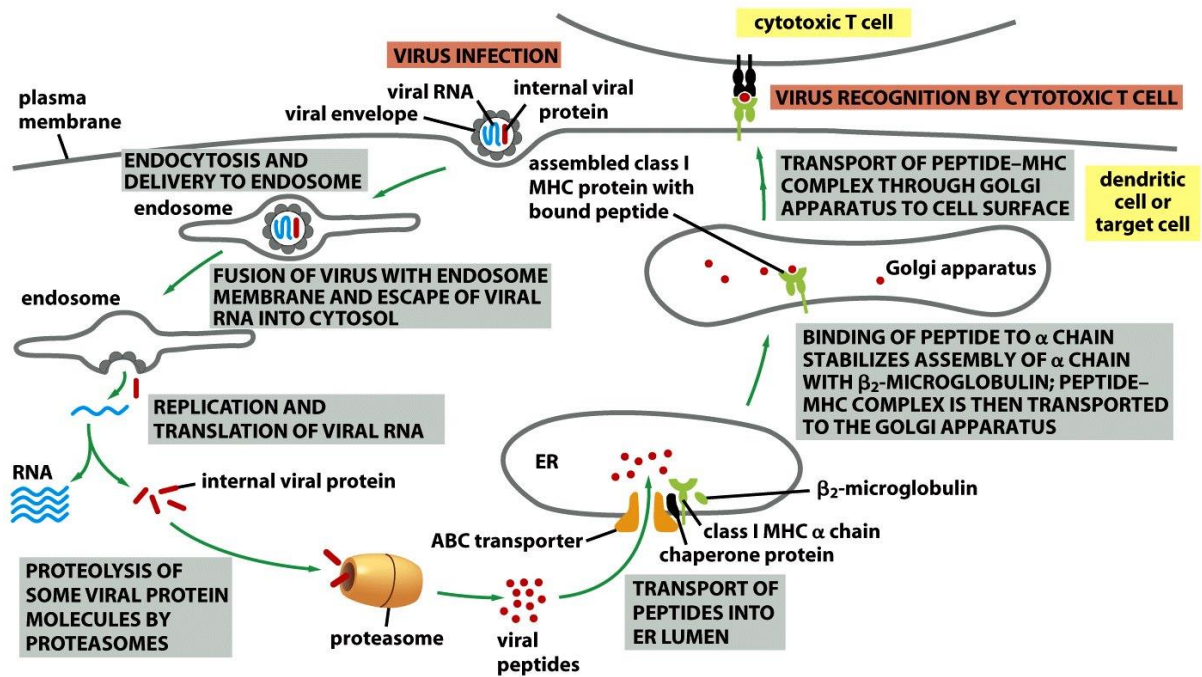


### Medische relevantie – voorbeeld 1

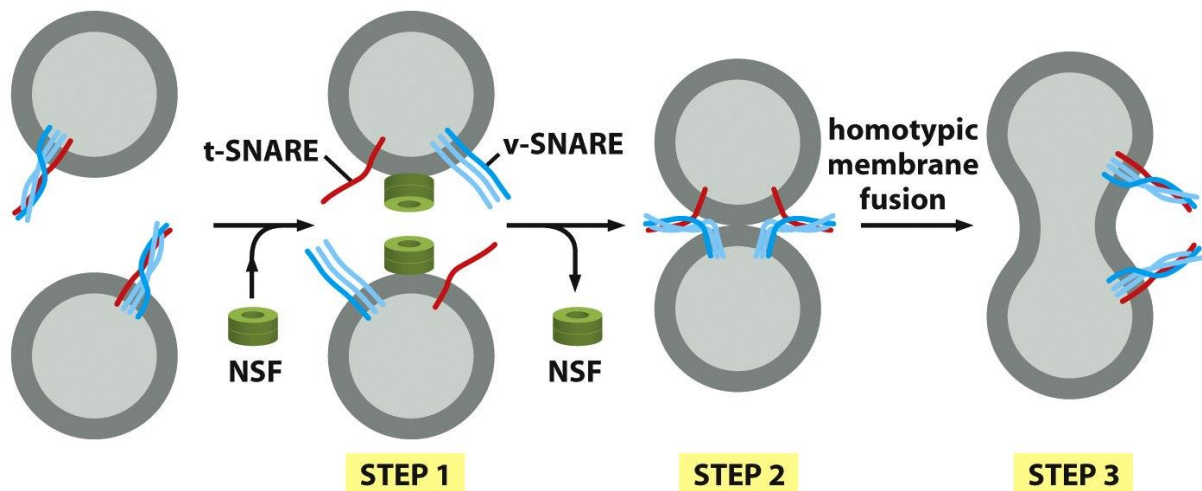
Sommige cargoreceptoren zijn lectines en binden oligosacchariden. Een voorbeeld hiervan is **ERGIC53**, dat zowel een lectine is als een cargoreceptor die bindt op mannose (oligosacchariden). Daarnaast herkent het ook de stollingsfactoren factor VIII (FVIII) en factor V (FV). ERGIC53 speelt een belangrijke rol in de verpakking van eiwitten in transportvesikels in het ER. Patiënten met mutaties in ERGIC53 hebben een verlaagd niveau van de stollingsfactoren FVIII en FV in het bloed, waardoor er een verhoogde kans is op bloedingen.

### Medische relevantie – voorbeeld 2

Cellen hebben de mogelijkheid om virussen die in de cel zijn binnengetroten op te merken, en hebben de capaciteit om via het intracellulair vesiculair transport antigenische peptiden te presenteren aan cytotoxische T-cellen. Bij dit proces komt een virus de cel binnen via endocytose en wordt het opgenomen door het endosoom. Tijdens de fusie van het virus met het endosoom komt het erfelijk materiaal van het virus vrij in de cel en zal dit replicatie en translatie ondergaan. Dit erfelijk materiaal kan zowel RNA als DNA zijn. Virale eiwitten, afkomstig van het virus, zullen door het proteasoom gedegradeerd worden tot virale peptiden. Deze zullen verder via een ABC-transporter in het ER-lumen getransporteerd worden. In het ER-lumen binden de virale peptiden met klasse I major histocompatibility complex (MHC) moleculen, om vervolgens getransporteerd te worden naar het Golgi-apparaat. Ten slotte zal dit peptide-MHC complex van het Golgi-apparaat naar het celoppervlak getransporteerd worden, waar deze door cytotoxische T-cellen herkend kunnen worden.

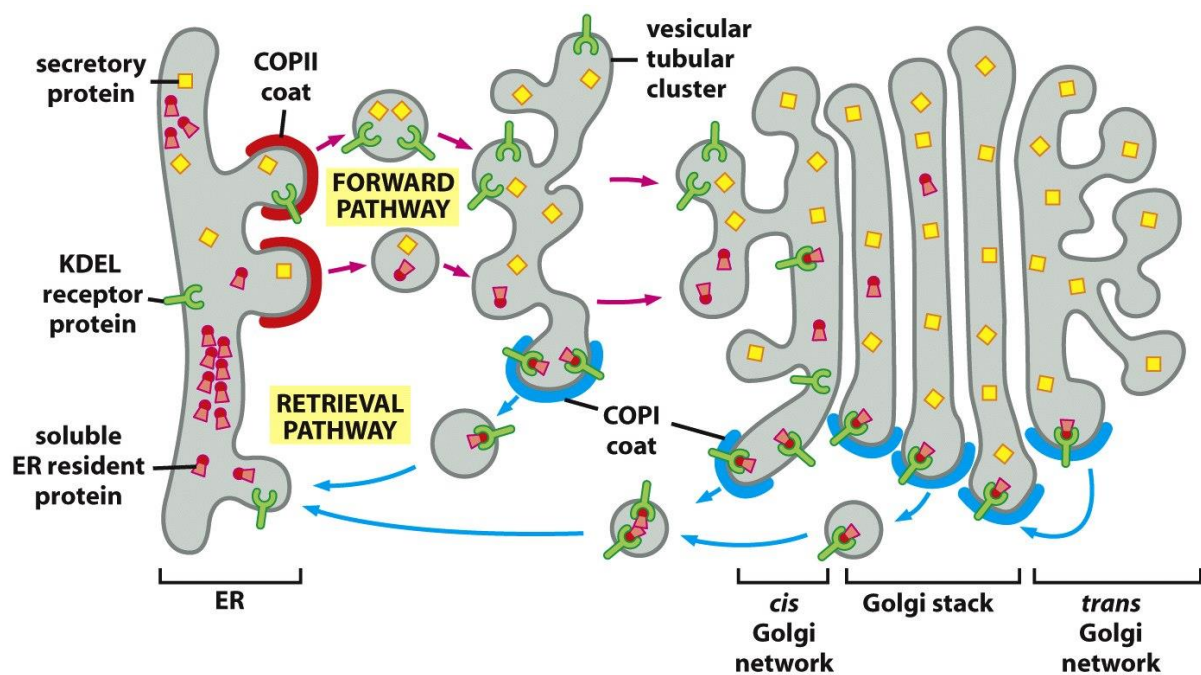


Verschillende transportvesikels gaan, nadat ze het ER hebben verlaten hebben en hun coat verliezen, met elkaar fuseren. Fusie van membranen van hetzelfde compartiment wordt **homotypische fusie** genoemd. Deze fusie wordt gemedieerd door t-SNARE, v-SNARE en Rab-eiwit interacties, welke in het vorige hoofdstuk besproken zijn.





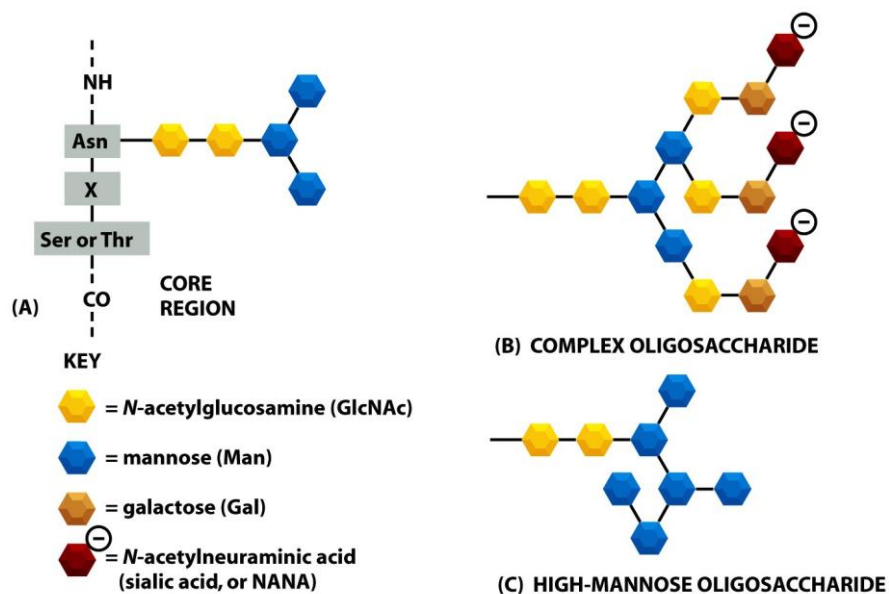
Het **retrograad transport** (retrieval pathway) wordt gemedieerd door **ER-retrieval signalen**. Resterende ER-membraaneiwitten zullen via het retrograad transport terug naar het ER getransporteerd worden dankzij ER-retrieval signalen die direct verbonden zijn aan *COPI-coats* (transmembranaire-verbonden eiwitten). *COPI*-coated transportvesikels verhogen de efficiëntie van het retrograad transport naar het ER. Solubele ER-residente eiwitten, zoals het chaperone-eiwit BiP, bevatten korte ER-retrieval signalen (**KDEL-sequentie**). Indien een ER-resident eiwit in het Golgi-apparaat terecht komt, zal het aan een KDEL-receptoreiwit binden, welke het eiwit via een *COPI*-coat weer terug naar het ER transporteert.



## Glycosylatie

Bij glycosylatie vormen verschillende groepen oligosacchariden een complex in samenwerking met specifieke enzymen. Deze enzymen zijn verschillend voor elke verwerkingsstap. Uiteindelijk worden zo **glycoproteïnen** en **glycosphingolipiden** gesynthetiseerd, waarbij elke oligosaccharide een belangrijke functie heeft. Twee klassen van **N-linked oligosacchariden** komen voor bij de dierlijke glycoproteïnen, dit zijn de **complexe oligosacchariden** en **high-mannose oligosacchariden**.

- Complexe oligosacchariden: N-linked oligosacchariden, die getrimd zijn in het ER, waar extra suikers (glucose, mannose, etc.) aan binden
- High-mannose oligosacchariden: N-linked oligosacchariden, die getrimd zijn in het ER, maar waar géén extra suikers aan binden. Ze bestaan enkel uit twee N-acetylglucosamines en mannoseresiduen.



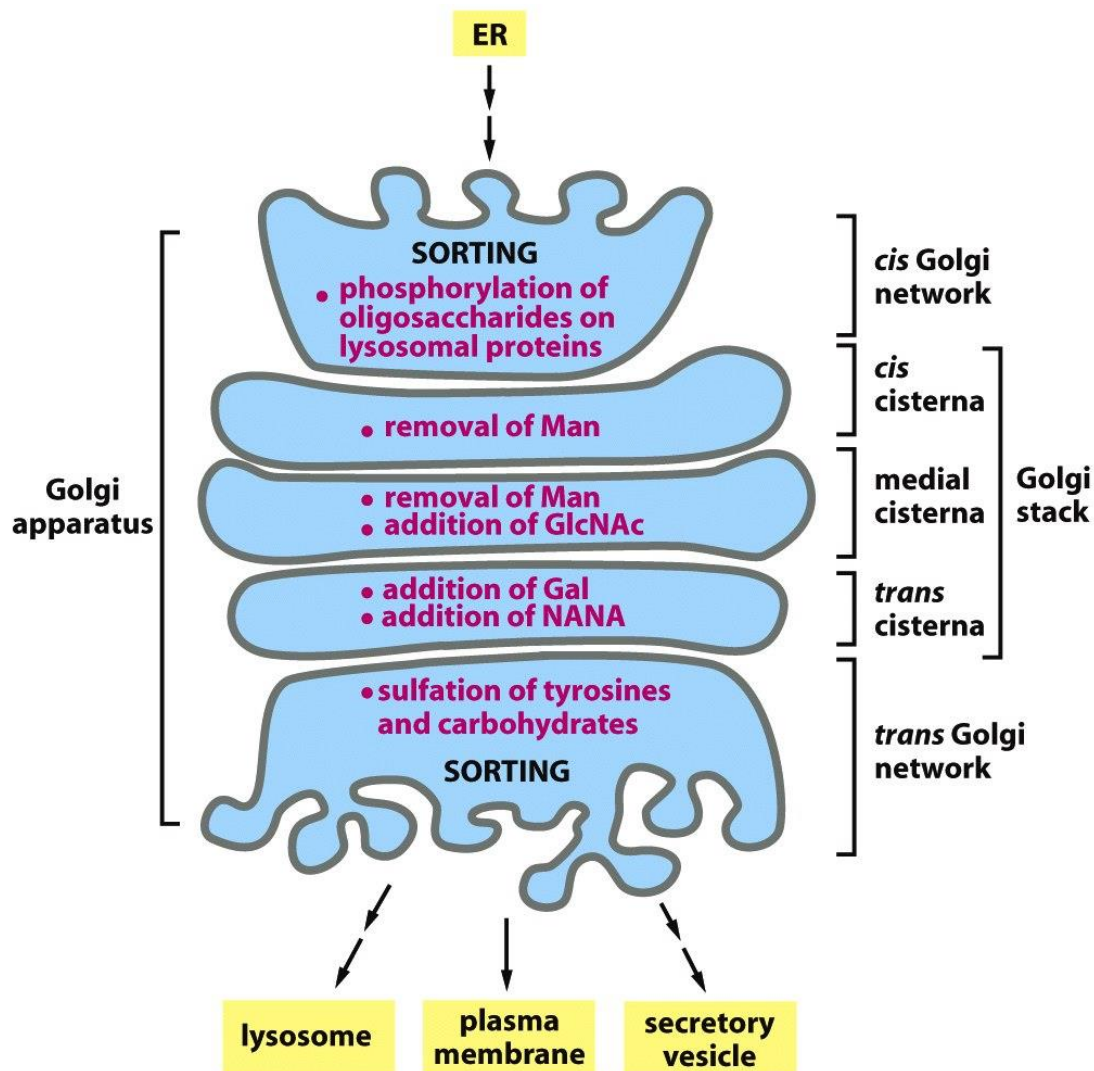
Alle oligosaccharideketens worden verwerkt in het Golgi-apparaat.



## Oligosaccharide verwerking in het Golgi-apparaat

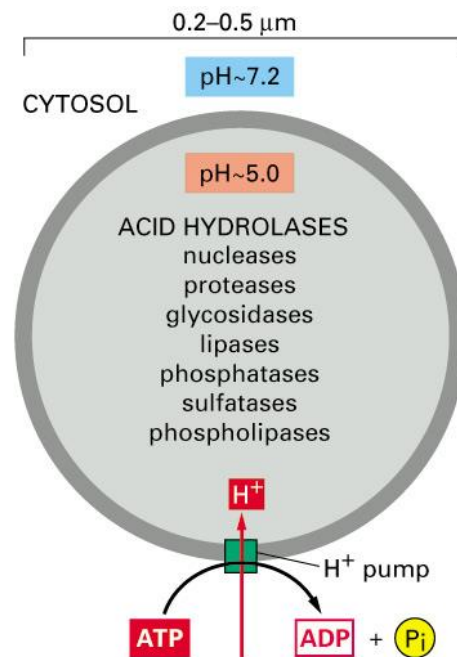
In het Golgi-apparaat vindt de verwerking van oligosacchariden plaats. Elk compartiment bevat **membraangebonden enzymen** die instaan voor de verwerking van deze sacchariden. De enzymen zijn verschillend in elk compartiment, en ook de concentratie hiervan verschilt tussen de compartimenten.

In het *cis*-Golgi vindt de katalyse van vroege reactiestappen plaats, terwijl in het *trans*-Golgi de late reactiestappen worden gekatalyseerd.



## Lysosomen/Lysosomaal transport

**Lysosomen** zijn cel-compartimenten, omgeven door een membraan, gevuld met hydrolytische enzymen die nodig zijn voor de intracellulaire **digestie** van macromoleculen. Deze enzymen zijn **zure hydrolasen**. Ze dienen proteolytisch geactiveerd te worden en zijn enkel actief bij een zure pH. De lysosomen zorgen hiervoor door een pH van 4.5-5.0 in stand te houden door middel van **V-type ATPases** in het membraan. Dit ATPase pompt  $H^+$  de lysosomen in met de energie die vrijkomt bij ATP-hydrolyse. De  $H^+$ -gradiënt wordt vervolgens gebruikt om afbraakproducten naar het cytosol te transporteren.



De rest van de cel wordt beschermd tegen deze hydrolasen door enerzijds de hogere pH in het cytosol (pH=7.2) en anderzijds het membraan van de lysosomen. Dit membraan bevat geglycolyseerde membraaneiwitten, welke helpen om het te beschermen tegen de proteases in het lumen van de lysosomen.

De lysosomen hebben een zeer heterogene morfologie. Dit heeft te maken met de verschillende **functies** die de zure hydrolases in het lysosoom hebben:

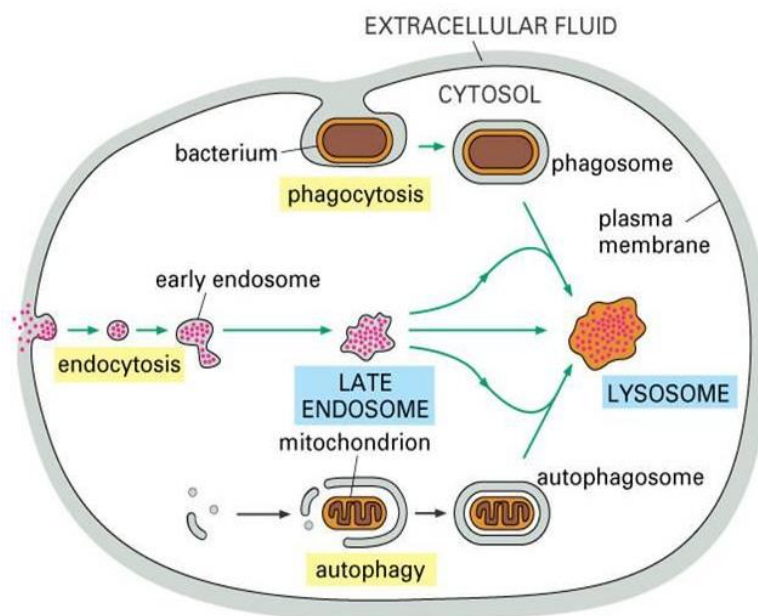
- Afbraak van macromoleculen
- Afbraak van intra- en extracellulaire debris
- Vernietigen van gefagocyteerde micro-organismen
- Productie van nutriënten voor de cel

Er zijn drie pathways die de producten die afgebroken moeten worden naar de lysosomen transporteren.

Macromoleculen uit de extracellulaire vloeistof worden door **endocytose** opgenomen. De moleculen worden in vesikels naar het **vroege endosoom** gebracht, waar al lysosomale hydrolases aanwezig zijn. Via het **late endosoom** (pH ~6), waar de digestie al begint, worden mature lysosomen gevormd.

Een tweede pathway is **autofagie**, het afbreken van ongebruikte/verouderde celonderdelen. Het af te breken organel wordt omgeven door een dubbele membraan en vormt zo een **autofagosoom**. Dit fuseert vervolgens met een lysosoom (of late endosoom), waarna het celorganel afgebroken kan worden.

Een derde pathway is **fagocytose**, dat vooral plaatsvindt in fagocyten zoals macrofagen en neutrofielen. Deze cellen nemen het vreemde object (bijv. micro-organismen) op in een **fagosoom**, dat op dezelfde manier verwerkt wordt als een autofagosoom.



De lysosomale eiwitten worden via co-translatieel transport in het ruwe ER getransporteerd en vervolgens door het Golgi-apparaat naar het **trans-Golgi netwerk (TGN)**. In het *cis*-Golgi netwerk worden lysosomale eiwitten gemodificeerd en wordt er een **mannose-6-fosfaat (M6P)** groep aan de *N*-linked oligosacchariden toegevoegd door middel van **GlcNAc-phosphotransferase**. In het TGN bevinden zich transmembranaire **M6P-receptoreiwitten** die de M6P-groepen herkennen. Deze receptoren binden op adaptoreiwitten tijdens de vorming van een *clathrine gecoat* vesikel, dat zich afsnoert van

het TGN. Vervolgens verliezen de vesikels deze coating en fuseren ze met het vroege endosoom.

In het vroege endosoom is de pH lager, waardoor de hydrolases dissociëren van de M6P-receptor. Ook wordt door zure fosfatases de fosfaatgroep van de mannose verwijderd, waardoor er geen signaal meer is, wat bijdraagt tot de release van de hydrolases van de M6P-receptor. De lege M6P-receptoren keren terug naar het TGN verpakt in vesikels met een retomeercoat.

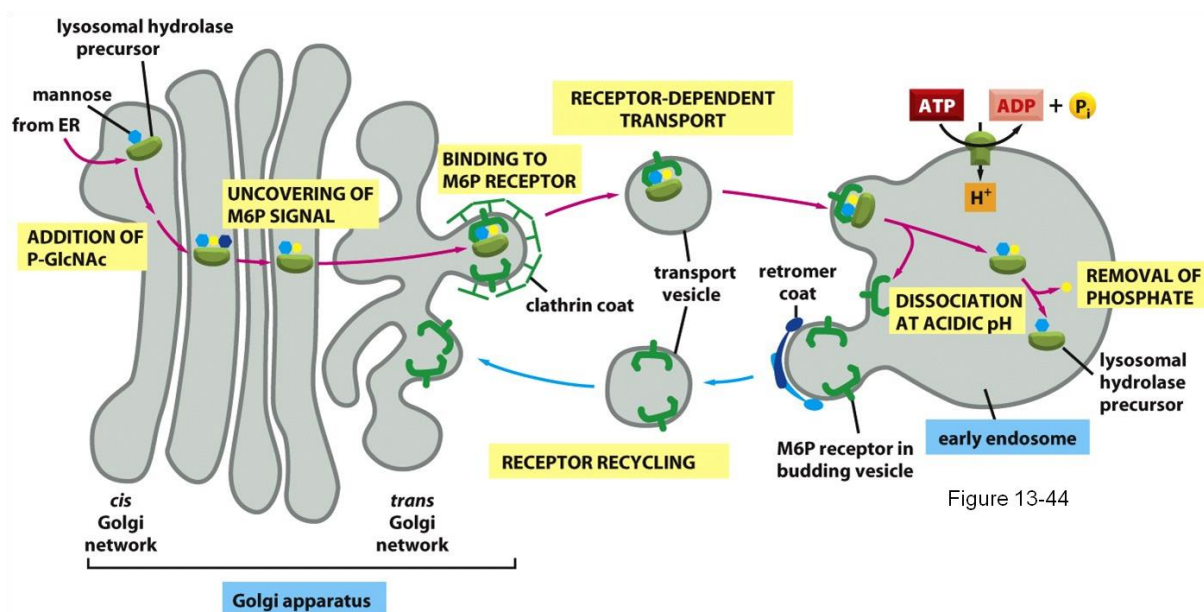


Figure 13-44

### Medische relevantie – voorbeeld

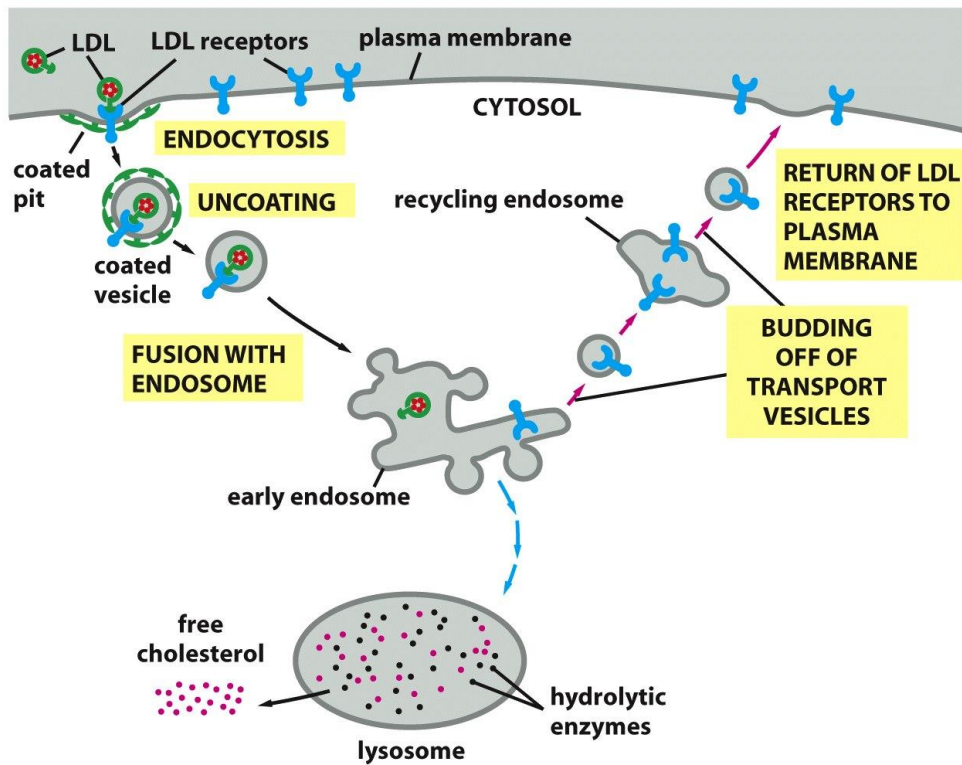
Genetische defecten in bijvoorbeeld de lysosomale hydrolases veroorzaken diverse **lysosomale opstapelingsziekten**. Door de defecten stapelen onverteerde producten zich op in de lysosomen, wat pathologische consequenties heeft, vooral in het zenuwstelsel. Meestal is er sprake van een mutatie in een gen dat codeert voor één van de specifieke hydrolases. Ook kan er een defect zijn in GlcNAc-phosphotransferase, waardoor er geen fosforylatie van de hydrolases meer plaatsvindt en er dus geen M6P gevormd wordt (**Hurler syndroom**). Er zal geen sortering plaatsvinden van de hydrolases, waardoor deze gesecreteerd worden en niet naar de lysosomen gebracht worden. In de lysosomen vindt er dus geen afbraak plaats, waardoor de afvalstoffen zich ophopen en grote intracellulaire inclusies ontstaan (**I-cell disease**).

Een andere manier van afbraak van macromoleculen, intra- en extracellulaire debris, enz. gebeurt via **ubiquitylatie**. Er bestaan drie ubiquitylatieprocessen met elk een verschillende uitkomst:

- Mono-ubiquitylatie: Ubiquitine bindt op één plaats en zorgt voor regulatie van histonmodificaties
- Multi-ubiquitylatie: Ubiquitine bindt op meer dan één plaats en zorgt voor endocytose
- Poly-ubiquitylatie: Ubiquitine bindt op één plaats, maar vormt een keten van ubiquitinemoleculen. Deze zorgt voor degradatie via het proteasoom, wat al eerder in deze synopsis beschreven is.

### ***Receptor-gemedieerde endocytose***

**Receptor-gemedieerde endocytose** is een zeer selectief proces voor de import van extracellulaire moleculen. Een voorbeeld van een molecule dat via deze methode in de cel wordt opgenomen is cholesterol, dat essentieel is voor de membraanfunctie. Cholesterol wordt in het bloed getransporteerd als cholesterylesters in de vorm van lipide-eiwitten, die ook wel **low-density lipoproteïnen** (LDLs) worden genoemd. Wanneer een cel cholesterol nodig heeft voor de synthese van membranen zal een LDL-receptor aangemaakt worden en getransporteerd worden naar het plasmamembraan. Hier kunnen LDL-partikels binden aan de receptor, welke vervolgens associeert met een *clathrine*-molecule via een adaptoreiwit. Dit complex wordt naar het endosoom getransporteerd. In het endosoom komt LDL vrij van zijn receptor door de lage pH en wordt het via late endosomen naar het lysosoom getransporteerd. Daar zullen de cholesterylesters in de LDL-partikels hydrolyseren, waardoor het cholesterol vrij komt en door de cel gebruikt kan worden voor membraansynthese. De LDL-receptoren die hun cargo hebben afgegeven worden gerecycleerd naar het plasmamembraan. Wanneer cholesterol in een grote hoeveelheid accumuleert in de cel zal een feedback-loop ervoor zorgen dat zowel de eigen cholesterolsynthese als de synthese van LDL-receptoren stopgezet worden.

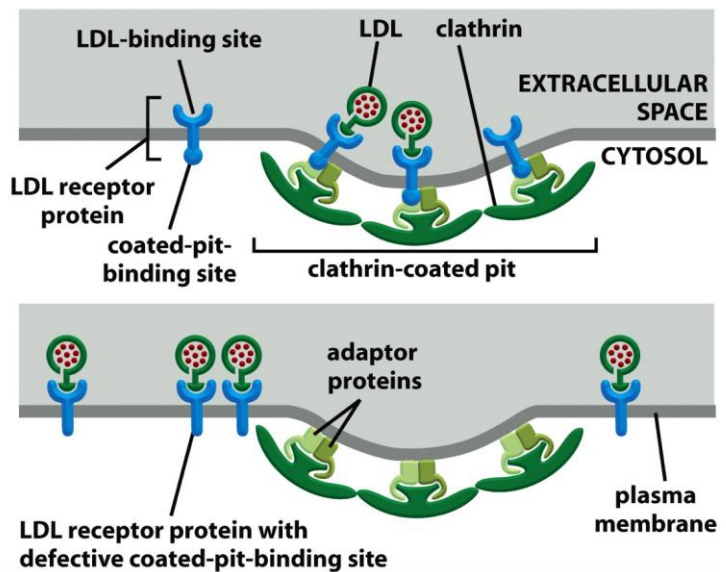


**Medische relevantie – voorbeeld**

**Familiale hypercholesterolemie (FH)**

is een erfelijke aandoening waarbij een te hoog cholesterolgehalte in het bloed aanwezig is. Deze individuen hebben een defect of ontbrekend gen voor de LDL-receptor, waardoor deze gereguleerde pathway verstoord wordt. Dit resulteert in een verhoogde hoeveelheid cholesterol

Normale en mutante LDL-R



in het bloed, die kan leiden tot de ontwikkeling van *atherosclerose*. Bij familiale hypercholesterolemie kan de LDL-receptor afwezig zijn, maar er kunnen ook defecten zijn in de extracellulaire binding van de receptor met LDL of een defecte internalisatie van de receptor. Indien dit laatste het geval is, verhindert dit de interactie van de LDL-receptor met de *coated-pit*.

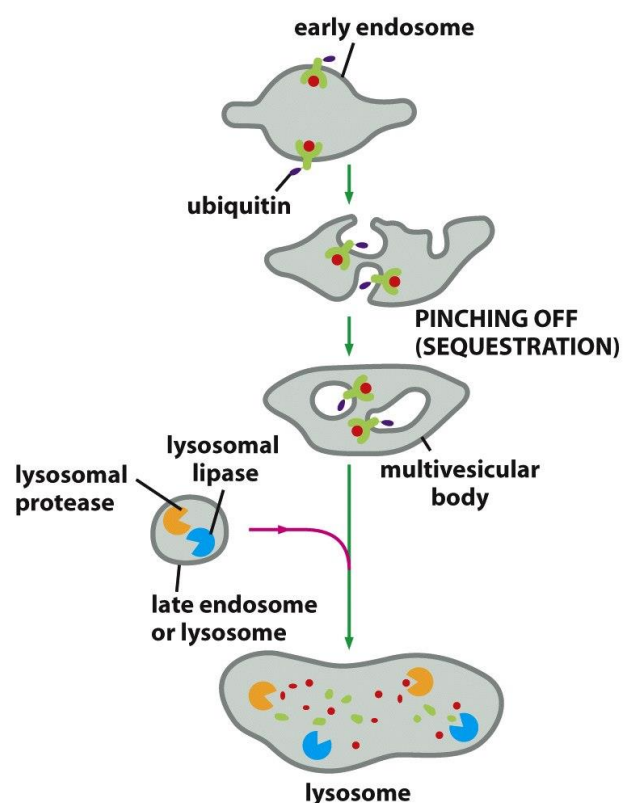


Indien een patiënt heterozygoot is voor een mutatie in het gen voor de LDL-receptor, heeft deze een verhoogd risico op atherosclerose en een hartinfarct. Homozygote patiënten zullen een zeer hoge mortaliteit hebben op jonge leeftijd door atherosclerose en hartinfarcten.

IJzer kan niet rechtstreeks opgenomen worden door cellen en wordt daarom in het bloed vervoerd terwijl het gebonden is aan **transferrine**. De **transferrinereceptor**, die bindt met transferrine-Fe<sup>2+</sup>, volgt een vergelijkbare recycling-pathway als LDL-receptoren. Anders dan bij de opname van LDL wordt ook de ligand gerecycleerd. In het endosoom ondergaat transferrine, door de lage pH, een conformatieverandering waardoor ijzer vrij komt. Het transferrine zelf blijft in de vorm van **apo-transferrine** echter op de transferrinereceptor gebonden. Dit complex zal vervolgens vanuit het vroege endosoom gerecycleerd worden en overgebracht worden naar het plasmamembraan. Bij de neutrale pH-waarde van de extracellulaire vloeistof zal het apo-transferrine dissociëren van de receptor en opnieuw beschikbaar zijn om opnieuw Fe<sup>2+</sup> te binden.

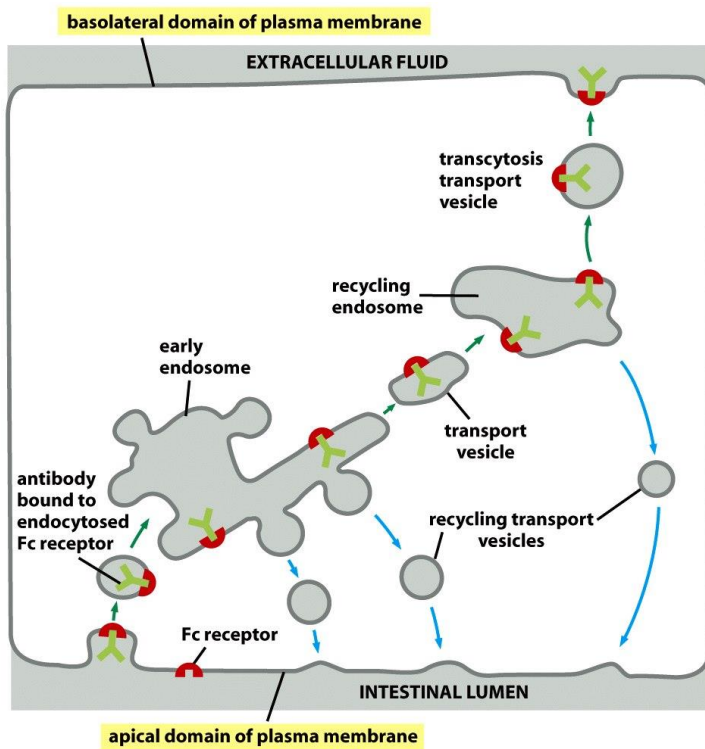
### Multivesiculaire lichamen

Door migrerende (vroege) endosomen worden er invaginaties gevormd die vesikels vormen. Deze **multivesiculaire lichamen** worden gevormd tussen het vroege endosoom en het late endosoom. De multivesiculaire lichamen fuseren uiteindelijk tot een laat endosoom of met andere late endosomen. Als laatste stap converteren late endosomen in lysosomen en zorgen lysosomale lipasen en proteasen voor digestie van geëndocyteerde eiwitten. **Invaginatie** is een essentiële stap voor de complete digestie van geëndocyteerde eiwitten, aangezien het buitenste membraan van het multivesiculair lichaam één wordt met het lysosomaal membraan.





Als voorbeeld: Lysosomale hydrolasen kunnen het cytosolische domein van geëndocyteerde transmembranaire eiwitten, zoals de EGF-receptor, niet verteren als het eiwit niet gelokaliseerd is in het multivesiculair lichaam.

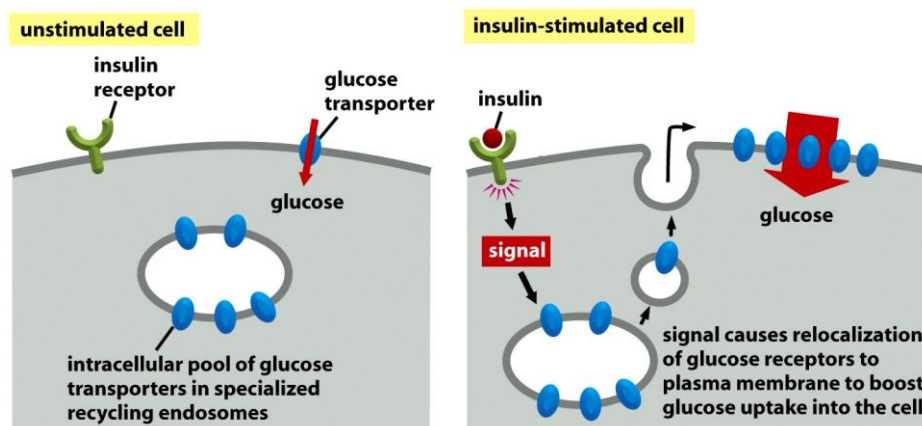


### Medische relevantie – voorbeeld

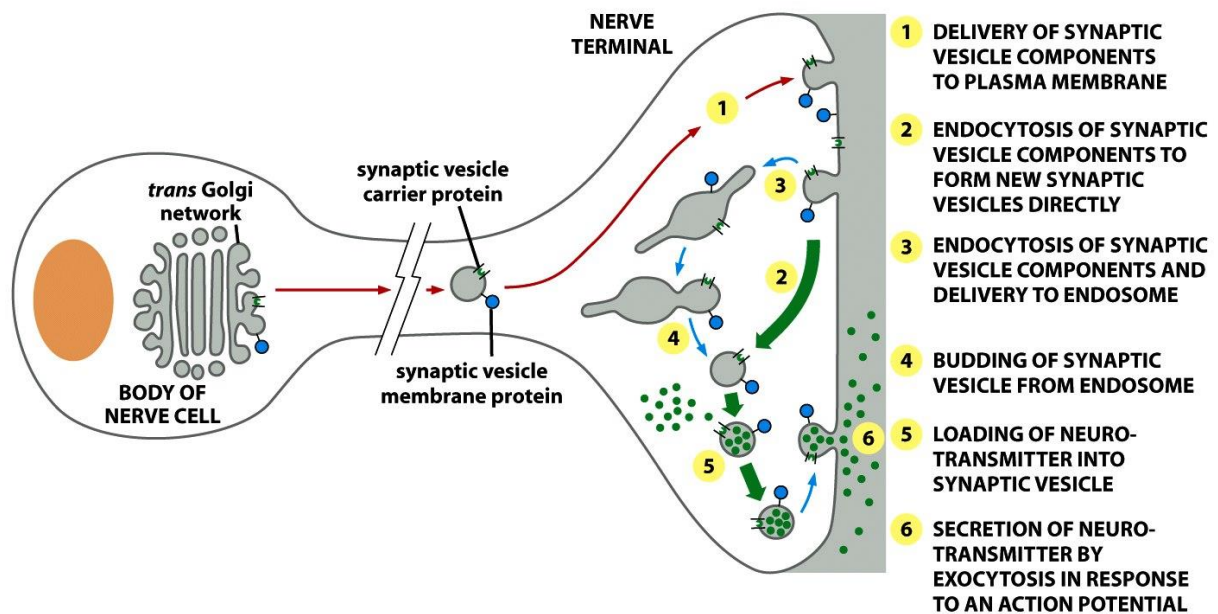
**Transcytose** is een endocytoseproces waarbij macromoleculen opgenomen worden en vervolgens doorheen epitheelcellen getransporteerd worden. Receptoren op gepolariseerde epitheelcellen worden geëndocyteerd en volgen een pathway van het endosoom naar het plasmamembraan. Dit maakt het mogelijk om antilichamen afkomstig uit moedermelk te transporteren doorheen het epitheel van de darm.

De antilichamen binden op specifieke receptoren aanwezig op het apicale oppervlak van de darmepitheelcellen, waar de pH-waarde laag is. Dit receptor-antilichaam complex zal zorgen voor de internalisatie, via een clathrine-coating, om vervolgens afgeleverd te worden aan de vroege endosomen. Het complex blijft intact tot het opgenomen wordt door transportvesikels, om vervolgens getransporteerd te worden naar het basolateraal domein van het plasmamembraan. Deze transitie is niet direct en wordt gemedieerd door het **recycling endosoom**. Alle receptoren van het vroege endosoom migreren naar het recycling endosoom. Eens bij het basolateraal domein van het plasma membraan is de pH-waarde neutraal waardoor de antilichamen dissociëren van de receptoren om uiteindelijk terecht te komen in de bloedbaan van het kind.

Het unieke aan het recycling endosoom is dat cellen de flux van eiwitten doorheen de transcytotische pathway kunnen reguleren. Hierdoor speelt het recycling endosoom een belangrijke rol bij het aanpassen van de concentratie van specifieke eiwitten in plasmamembranen. Vetsellen en spiercellen bevatten bijvoorbeeld grote intracellulaire pools van glucosetransporters die verantwoordelijk zijn voor de opname van glucose doorheen het plasmamembraan. Deze membraantransporteiwitten worden opgeslagen in gespecialiseerde recycling endosomen totdat **insuline**, via binding aan een insulinerceptor, de cel stimuleert om de glucose-opname te verhogen door meer glucosetransporters naar het plasmamembraan te transporteren.

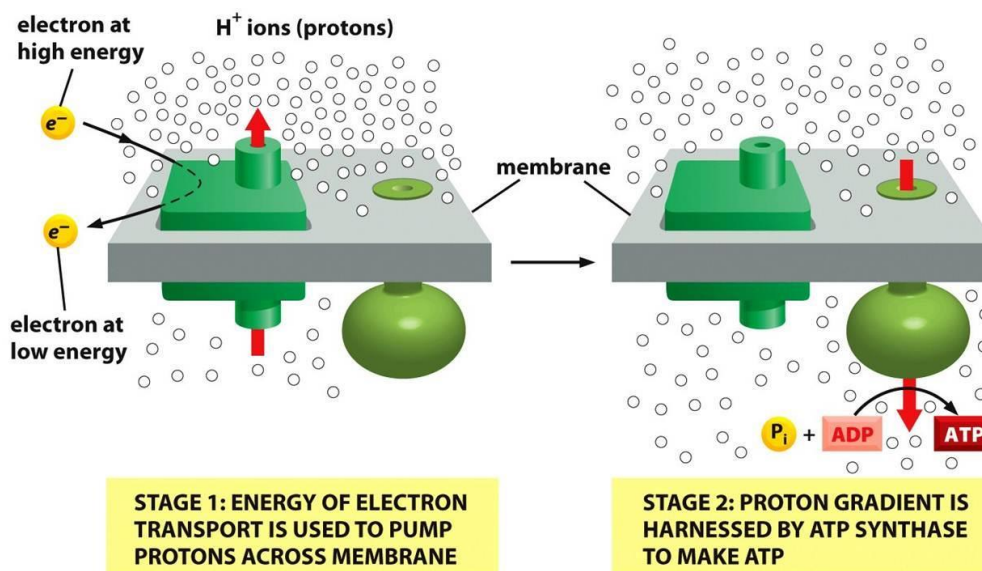


Een andere belangrijke vorm van intracellulair vesiculair transport gebeurt in zenuwcellen. Zenuwcellen (en endocriene cellen) gebruiken een speciale klasse van kleine secretorische vesikels die ook wel **synaptische vesikels** worden genoemd. Deze vesikels slaan kleine neurotransmittermoleculen op, zoals *acetylcholine*, *glutamaat*, *glycine* en *GABA*. Neurotransmitters zijn verantwoordelijk voor de snelle signalen van zenuwcel tot zenuwcel via een chemische synaps. Sommige neurotransmitters worden met een hoge snelheid afgevuurd omdat de vesikels meteen beschikbaar zijn. Na het afleveren van neurotransmitters door het synaptische vesikel via het plasmamembraan worden de componenten van het synaptische vesikel terug opgenomen. Via endocytose worden deze componenten afgeleverd aan het endosoom. Vanuit het endosoom worden er nieuwe synaptische vesikels afgesnoerd. Deze worden geladen met neurotransmitters. Vervolgens worden ze gesecreteerd via exocytose na een actiepotentiaal. Dit proces wordt aangedreven door een **anti-port H<sup>+</sup>-pomp**.



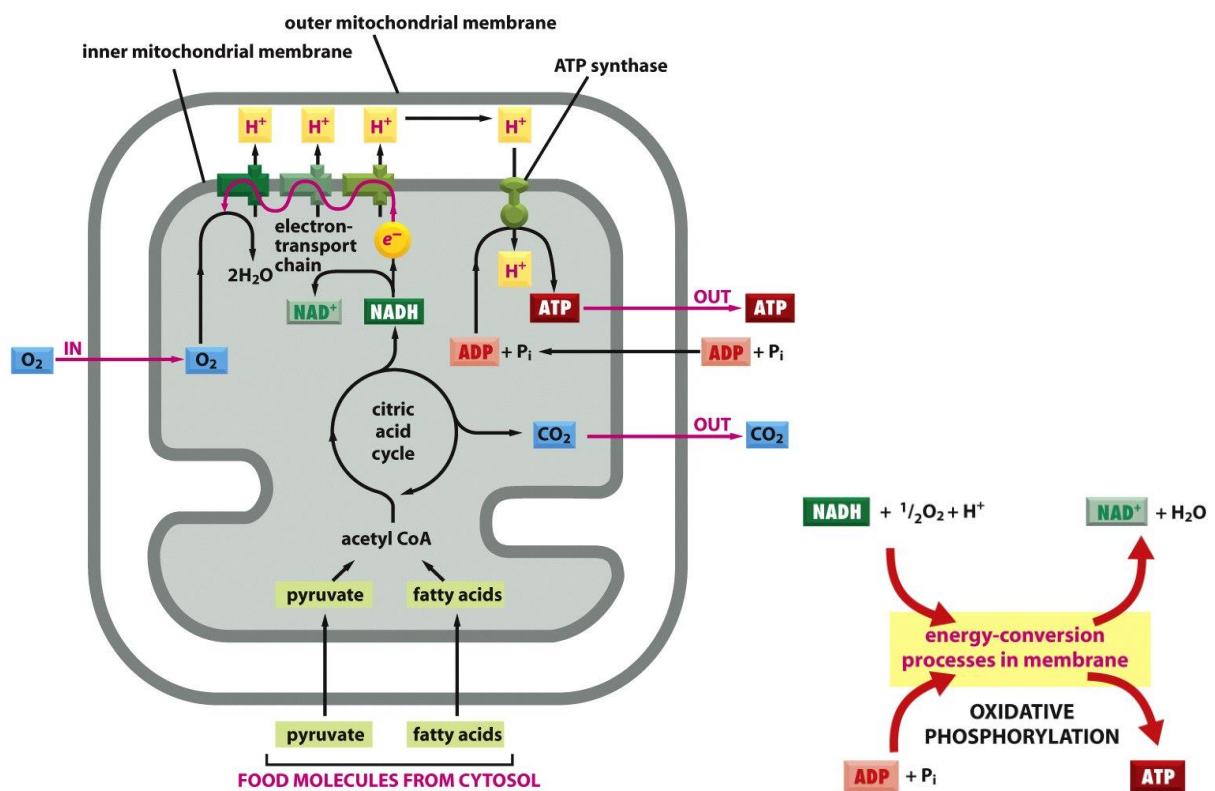
## Mitochondriën – energie conversie

Mitochondriën zorgen voor **energie-conversie** door **chemo-osmotische koppeling**. Er is dus een link tussen de vorming van chemische verbindingen om ATP te genereren ('chemi') en membraantransportprocessen ('osmo').



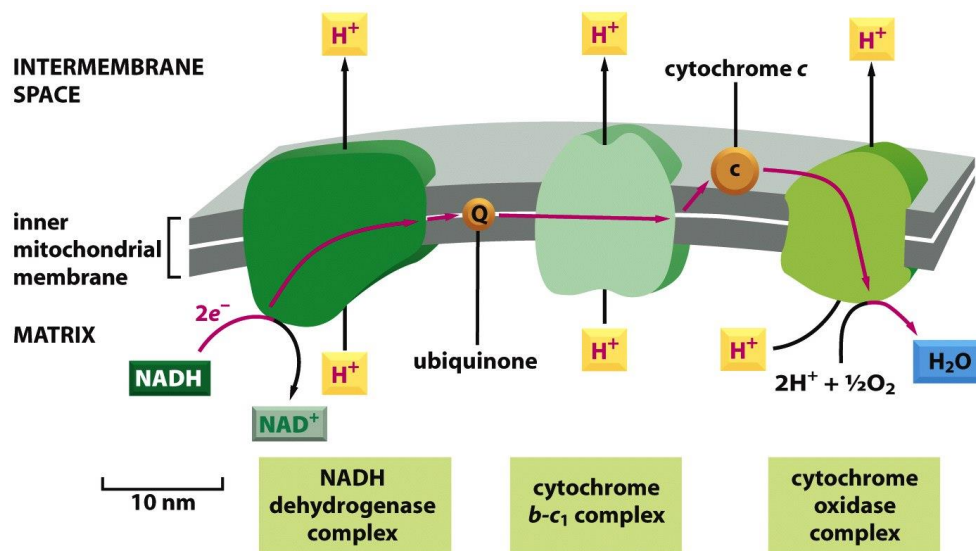
In de eerste fase wordt de energie van elektronentransport gebruikt om een proton ( $H^+$ )-gradiënt te creëren. In de tweede fase wordt deze protongradiënt gebruikt om ATP te synthetiseren.

In de mitochondriën worden pyruvaat (eindproduct van glycolyse) en vetzuren (eindproduct van beta-oxidatie) verwerkt via de citroenzuur (Krebs-) cyclus. Hierbij worden er elektronen met een hoge energie overgedragen op elektronendonoren, zoals NADH en FADH<sub>2</sub>. Deze kunnen vervolgens hun elektronen afdragen aan de **elektronentransportketen** in het binnenste mitochondriële membraan. Hier combineren deze elektronen met O<sub>2</sub>. De energie die hierbij vrijkomt (in de vorm van een protongradiënt) wordt door de binnenste membraan gebruikt om de omzetting van ADP + P<sub>i</sub> tot ATP te katalyseren. Dit totale proces van netto energie-overdracht wordt **oxidatieve fosforylatie** genoemd.

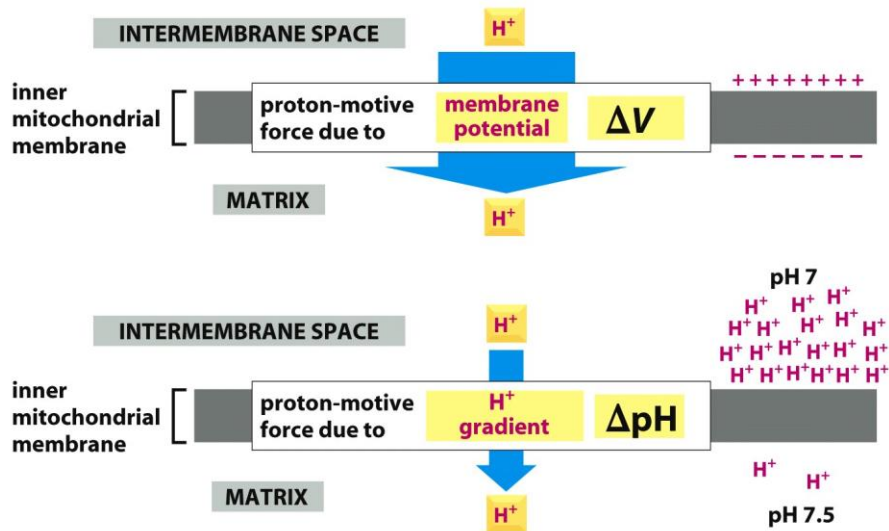


De **elektronentransportketen** bestaat uit 3 specifieke membraancomplexen in het binnenste mitochondrieel membraan en 2 mobiele carriers, waarbij elk complex een grotere elektronenaffiniteit heeft dan het vorige. Elk membraancomplex pompt protonen vanuit de matrix naar de intermembranaire ruimte tijdens het passeren van de elektronen.

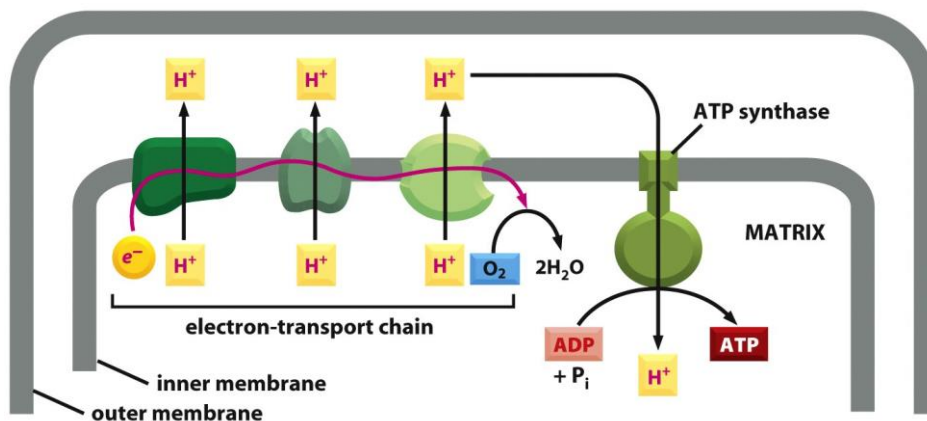
1. **NADH dehydrogenase complex**. Dit complex accepteert de elektronen van NADH en geeft deze door aan **ubiquinone**.
2. Door ubiquinone worden de elektronen afgegeven aan het **cytochrome *b-c*<sub>1</sub> complex**. Dit complex draagt de elektronen vervolgens over naar **cytochrome *c***.
3. cytochrome *c* passeert de elektronen naar het **cytochrome oxidase complex**, wat de elektronen doorgeeft aan **O<sub>2</sub>**.



De protongradiënt die wordt opgebouwd door de elektronenoverdracht in de elektronentransportketen wordt vervolgens gebruikt om de ATP-synthese aan te drijven. Deze protongradiënt is **elektrochemisch**. Dat wil zeggen dat er zowel een **pH-gradiënt** is als een **voltagegradiënt**.



Door deze gradiënt zullen protonen terug naar de matrix stromen en dit gebeurt door middel van het enzym **ATP-synthase** ( $F_0F_1$ -ATPase). Als de protonen terugstromen doorheen dit enzym, zullen ADP en  $P_i$  omgezet worden in ATP.

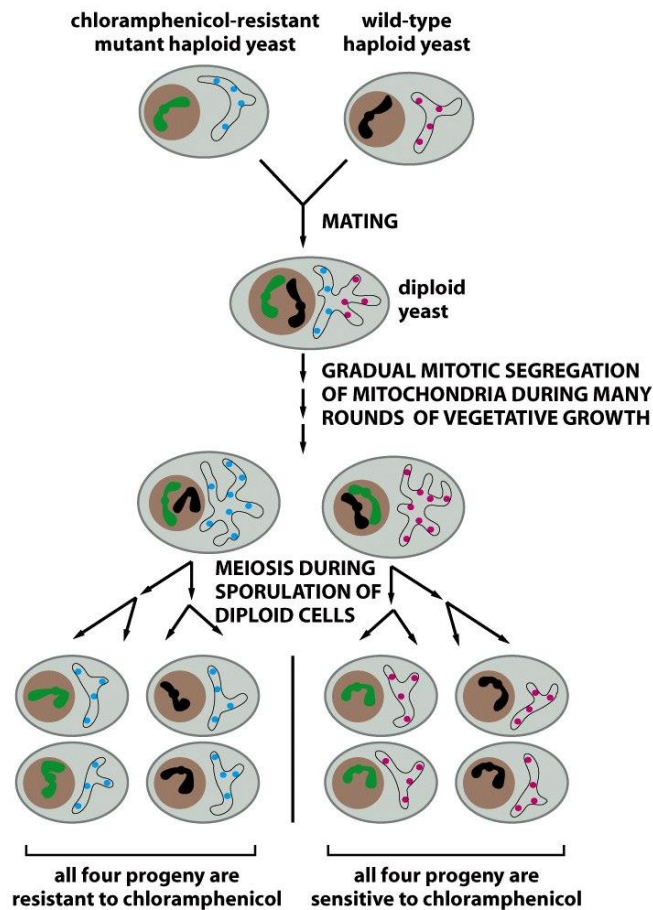


## Mitochondriële erfelijkheid

Het circulair mitochondriaal DNA (mtDNA) bevindt zich in de mitochondriën. Volgens de **Mendeliaanse erfelijkheid** wordt het DNA in de nucleus van het ouderpaar gedeeld naar de volgende generatie. Echter worden de mitochondriale genen op een niet-Mendeliaanse manier overgeërfd. Dit fenomeen wordt ook **cytoplasmatische erfelijkheid** genoemd. Dat betekent dat dit mtDNA slechts afkomstig is van één ouder (**uniparentaal**). Het fenomeen kan het best omschreven worden aan de hand van een voorbeeld. In het volgend experiment werden twee verschillende soorten haploïde gistcellen (*Saccharomyces*



*cerivisiae*) gebruikt, waarvan één groep gistcellen het chloramphenicol-resistente gen bevat. Bij het paren zorgt dit voor een diploïde gistcel die zowel mitochondriale genen bevat van het wildtype als van het gemuteerde type. Dit komt doordat de mitochondriale netwerken samengesmolten zijn. Wanneer de mitose gebeurt, worden er kopieën van zowel de gemuteerde als de wildtype mitochondriale genen gesegregeerd (**stochastische segregatie**) in diploïde dochtercellen. In het geval van nucleair DNA zal elke dochtercel exact twee kopieën van de chromosomen bevatten van elke ouder. Echter in het geval van mitochondriaal DNA zal de dochtercel enkel de gemuteerde of de wildtype mitochondriale genen bevatten. Na verder verloop van de mitotische deling, zullen er cellen voortkomen die resistent zijn tegen chloramphenicol en andere cellen die niet het resistente gen bevatten.



In contrast met gistcellen bevat het menselijke mtDNA maternale genen. De bevruchte eicel bevat 2000 kopieën van het mtDNA van de moeder en enkel 1-2 van de vader, die na verloop van tijd verwaarloosbaar zijn. De stochastische segregatie van mtDNA met een defectief gen wordt overgedragen door de moeder en kan leiden tot mitochondriale ziektes. Defecten in de mitochondriën treffen vooral celtypes die veel energie vergen, zoals bijvoorbeeld spiercellen en zenuwcellen.



### Medische relevantie – voorbeeld

**Myoclonische epilepsie** is een gevolg van een aantal defectieve mitochondriën. De oorzaak ligt aan een mutatie op de mt-tRNA synthese, welke nodig is voor elektronentransport en productie van ATP. Dit resulteert, naar gelang het celtype, in myasthenia (spierzwakte) en hartproblemen via de (hart-)spiercellen, en epilepsie en dementie via zenuwcellen.

## **Cytoskelet**

Het cytoskelet kent drie belangrijke filamenten :

- Actinefilamenten
- Microtubuli
- Intermediaire filamenten

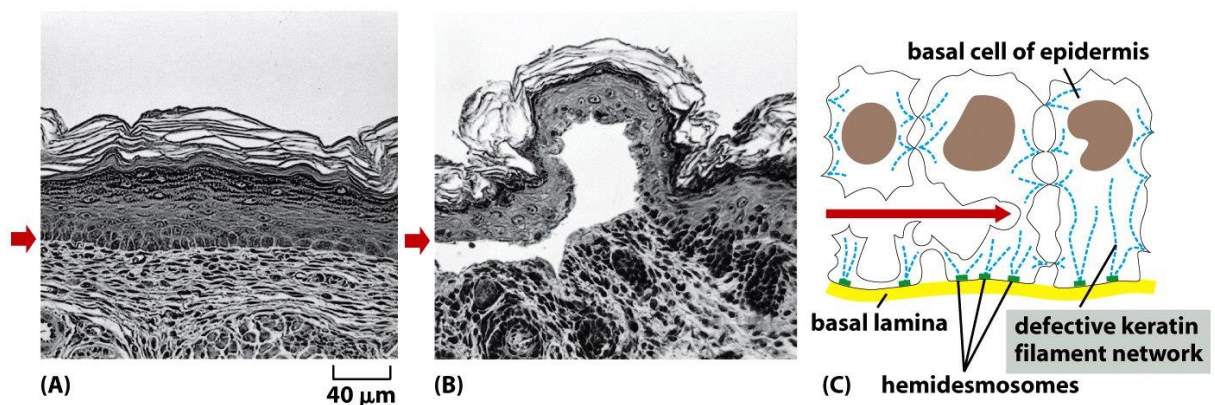
Het **actinefilament** bestaat uit een erg flexibele twee-strengige, spiraalvormige polymeerstructuur van het eiwit actine. Hoewel deze verspreid in de cel voorkomt, komt ze voornamelijk voor in de cortex van de cel, net onder het plasmamembraan.

**Microtubuli** bestaan uit bijna onbuigbare, langwerpige, holvormige cilinders van het eiwit tubuline. Vaak zijn ze verbonden aan het single microtubule-organizing center (MTOC), ook wel centrosoom genoemd.

Het **intermediaire filament** is een touwachtige vezelstructuur die bestaat uit een heterogene familie van intermediaire filamenteiwitten. Vaak komen ze voor als vlechtwerk in de nucleaire lamina net onder de binnenste nucleaire membraan. Een andere type intermediair filament strekt zich over het cytoplasma uit en zorgt voor de mechanische kracht van de cel. In epitheelcellen zorgt het intermediaire filament voor cel-cel junctions en zorgt hierbij voor de stevigheid en integriteit van het epitheelnetwerk.

### Medische relevantie – voorbeeld 1

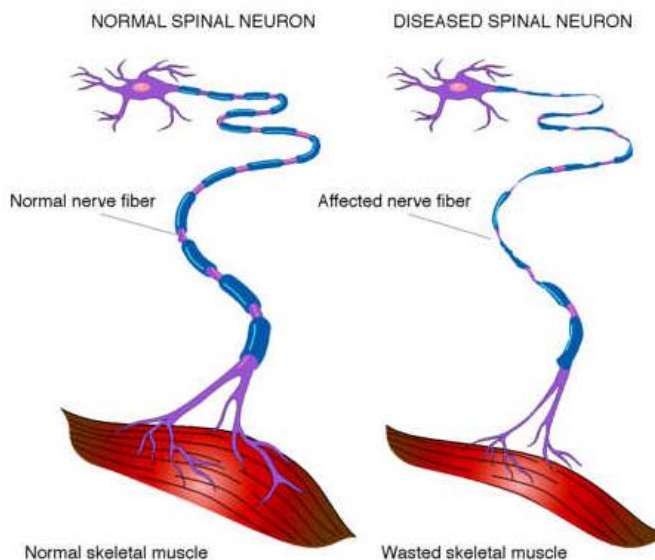
In de heterogene familie van intermediaire filamenten bestaan er verschillende onderlinge families van filamenten. De familie van **keratinefilamenten** is één hiervan. Keratinefilamenten komen in verschillende celtypes voor en zijn heel divers. Ze verlenen mechanische integriteit aan epitheelcellen dankzij de verankering aan andere intermediaire filamenten, die zich bevinden op desmosomen (cel-cel contact) en hemidesmosomen (cel-matrix contact). Een defect in het netwerk van keratinefilamenten leidt tot *epidermolysis bullosa*. Hierdoor scheuren cellen los en veroorzaken ze zeer pijnlijke blaren op de huid.



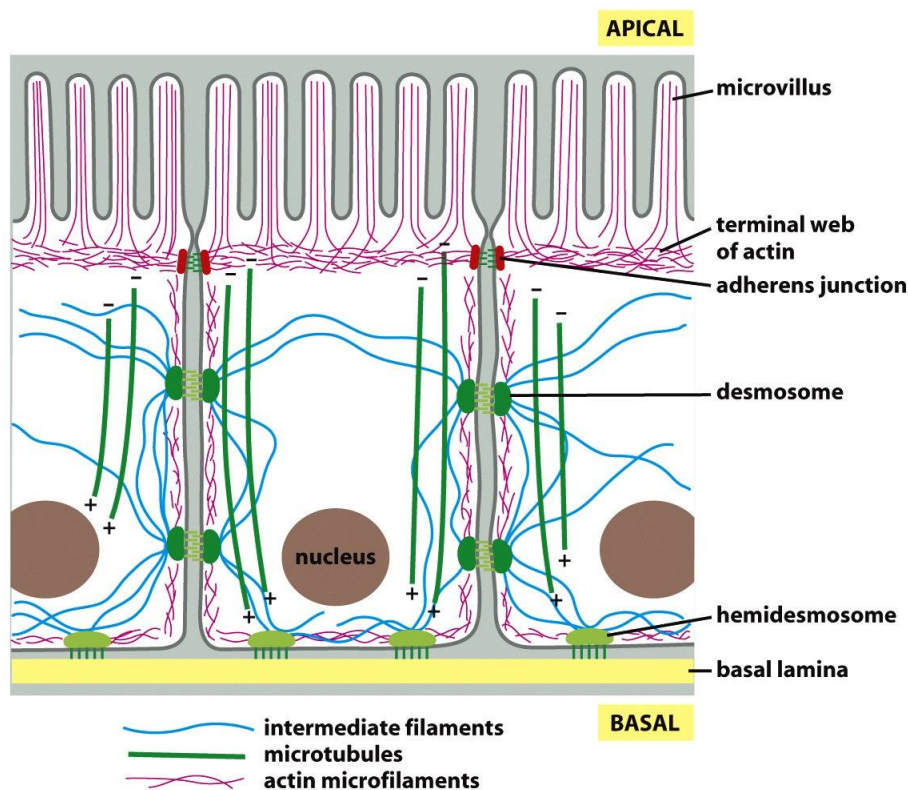
Een tweede familie van de intermediaire filamenten zijn de **neurofilamenten**. Ze bevinden zich met hoge concentratie in axonen van neuronen in vertebraten. Er bestaan 3 soorten neurofilamenteiwitten : **NF-L**, **NF-M** en **NF-H**. Elke gevormde heteropolymeer bevat NF-L met daaraan NF-M of NF-H. Tijdens de groei van axonen worden er nieuwe neurofilament-subeenheden gevormd in een dynamisch proces waarbij elk subeenheid wordt toegevoegd aan het uiteinde. Na de groei van het axon zal de diameter 5 keer vergroot zijn dankzij de vorming van het neurofilament. Het neurofilament is hierdoor een belangrijk onderdeel voor de stevigheid, integriteit en de snelheid van het elektrische signaal van het axon.

### Medische relevantie – voorbeeld 2

Een defect in één van de neurofilamenten leidt tot een neurodegeneratieve ziekte. **Amyotrophic lateral sclerosis**, of ALS, is een neurodegeneratieve ziekte die geassocieerd wordt met een accumulatie van abnormale neurofilamenten in axonen van motorische zenuwcellen of efferente zenuwcellen. Dit verhindert het normale transport van het axon. De degeneratie van deze axonen leidt vervolgens tot spierzwakte en atrofie, welke uiteindelijk fataal kan worden.



Zoals zojuist vermeld speelt het cytoskelet een belangrijke rol in de stabiliteit van de netwerktopologie van cellen. De apicale oppervlakte, of bovenste laag, van het darmepitheel is bedekt met verschillende microvilli die in contact staan met het darmlumen. De vorm van de microvilli zorgt ervoor dat het celoppervlak maximaal benut wordt voor voedselabsorptie. Net onder de **microvilli** bevindt zich een netwerk van **actinefilamenten** met als doel de cel te verstevigen, maar ook als verbinding tussen cellen via **adherens junctions**. Dit belet het voedsel zomaar binnen te sijpelen. Binnen de cel zorgen **intermediaire filamenten** voor de integriteit van de cel en voor de verbinding tussen adhesieve structuren, zoals desmosomen en hemidesmosomen. De verticale filamenten, of **microtubuli**, coördineren nieuwe gesynthetiseerde componenten naar hun juiste locatie. Desmosomen en hemidesmosomen spelen een belangrijke rol in de verankering van de cellen. **Desmosomen** zorgen samen met intermediaire filamenten voor de verankering aan naburige epitheelcellen. **Hemidesmosomen** daarentegen zorgen samen met intermediaire filamenten voor de verankering met de extracellulaire matrix (**basale lamina**). Op deze manier zorgen deze “**anchoring junctions**” voor de stevigheid en integriteit van het epitheelnetwerk.



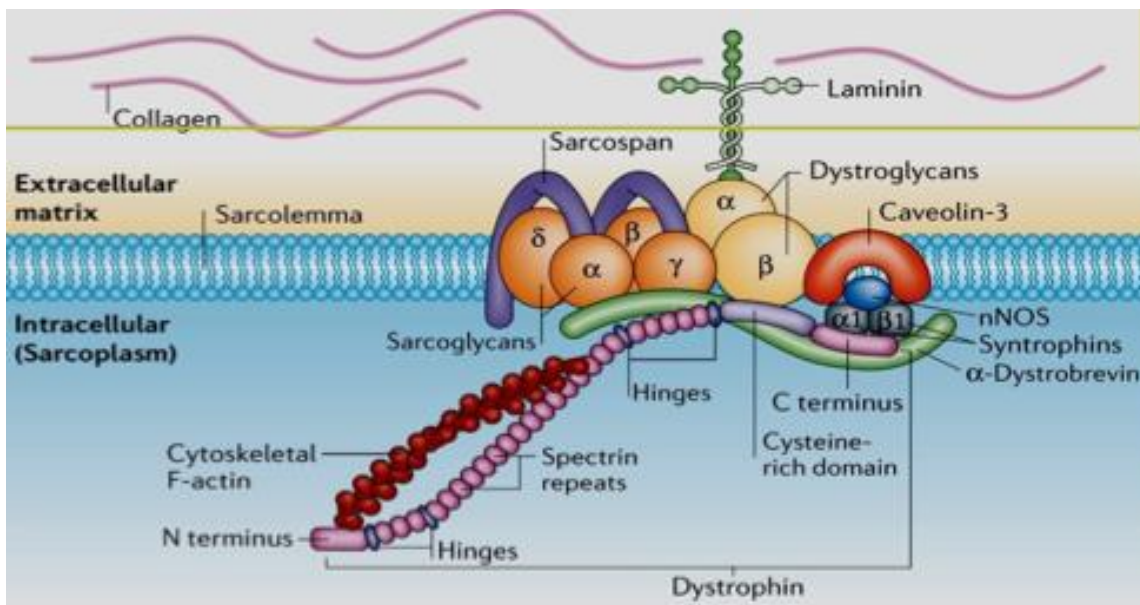


### Medische relevantie – voorbeeld

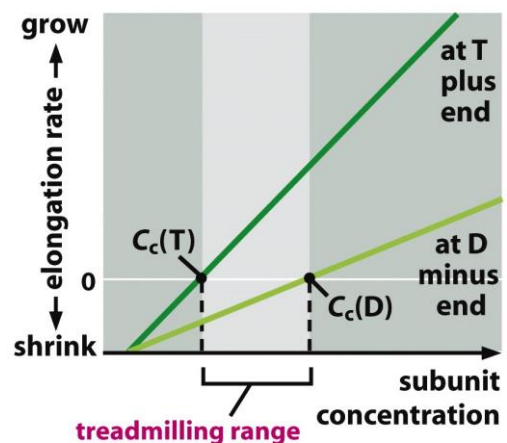
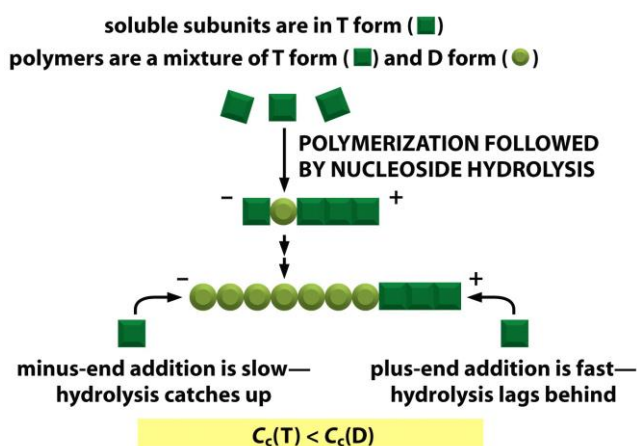
In spiercellen is het dystrofine-eiwit verantwoordelijk voor de verankering van het cytoskelet en de extracellulaire matrix. De **ziekte van Duchenne** is een erfelijke ziekte die musculaire dystrofie veroorzaakt door het gebrek aan dystrofine (een mutatie in het dystrofinegen) in het membraan van de spiervezels. Hierdoor verliezen de spiercellen hun integriteit en stevigheid. De skeletale spieren en hartspieren zullen op zeer korte tijd degenereren en zullen de aanleiding zijn tot een vroege dood door hartfalen. Deze patiënten leven niet langer dan 25 jaar. Tot op heden bestaat er geen middel om te genezen van deze vreselijke ziekte.



Het Departement *Gentherapie & Regeneratieve Geneeskunde* aan de VUB spitst zich onder meer toe op het ontwikkelen van gentherapie voor patiënten die lijden aan **Duchenne Muscular Dystrophy** (DMD). Hierbij wordt beoogd de integriteit van de spiervezels te herstellen door het afleveren van het ontbrekende dystrofinegen in de spieren via niet-pathogene adeno-geassocieerde virale transportvehikels of vectoren.



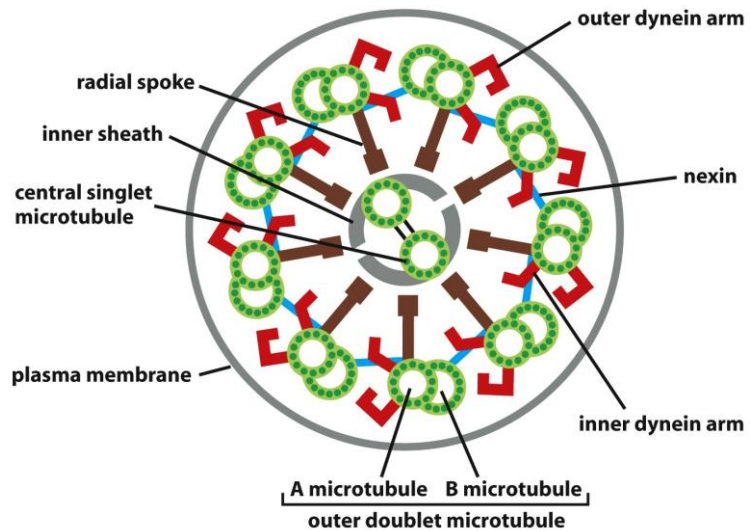
Zoals eerder beschreven bestaan actinefilamenten uit een polymeerstructuur van actine, en microtubuli uit tubuline. Deze subeenheden worden stapsgewijs aan elkaar gebonden en gedissocieerd. Hiervoor is er voor beide filamenten energie (ATP en GTP) nodig. Er bestaan twee verschillende types filamentstructuren: de T-vorm (ATP voor actine, GTP voor tubuline) en de D-vorm (ADP voor actine, GDP voor tubuline). Doordat de concentratie van ATP en GTP 10 keer hoger ligt dan deze van ADP en GDP, zijn meeste vrije subeenheden in levende cellen afkomstig van de T-vorm. Door een hydrolyse van een nucleotide (ATP → ADP) zal er veel energie vrijkomen en deze zal zorgen voor een dissociatie van een T-subeenheid en additie van een D-subeenheid. De uiteinden van het filament, hetzij T- of D-subeenheden, zijn afhankelijk van de snelheid van additie van de subeenheden. Wanneer de snelheid van additie hoog is, dan zal het filament snel groeien. Hierdoor is het mogelijk dat een nieuwe subeenheid zich bindt zonder dat een nucleotide gehydrolyseerd is, waardoor de uiteinden een T-vorm zullen krijgen. Wanneer de additiesnelheid laag is, zal er hydrolyse optreden en zullen de uiteinden een D-vorm krijgen. De additiesnelheid is het product van de vrije subeenheid-concentratie en de snelheidsconstante  $k_{on}$ . Wanneer de concentratie van de vrije subeenheden zich bevindt in de tussenliggende range ( $[C_c(T)] < C < [C_c(D)]$ ) dan zullen er T-subeenheden toegevoegd worden aan het plus-uiteinde van het filament, maar tegelijkertijd zullen er D-subeenheden gedissocieerd worden van het min-uiteinde van het filament. Dit laatste noemt men **treadmilling**. Treadmilling zorgt ervoor dat de cel de locatie van de filamenten kan verplaatsen om zo de structuur van de cel te veranderen. Het speelt een belangrijke rol bij het vormen van nieuwe synapsen in een zenuwcel.



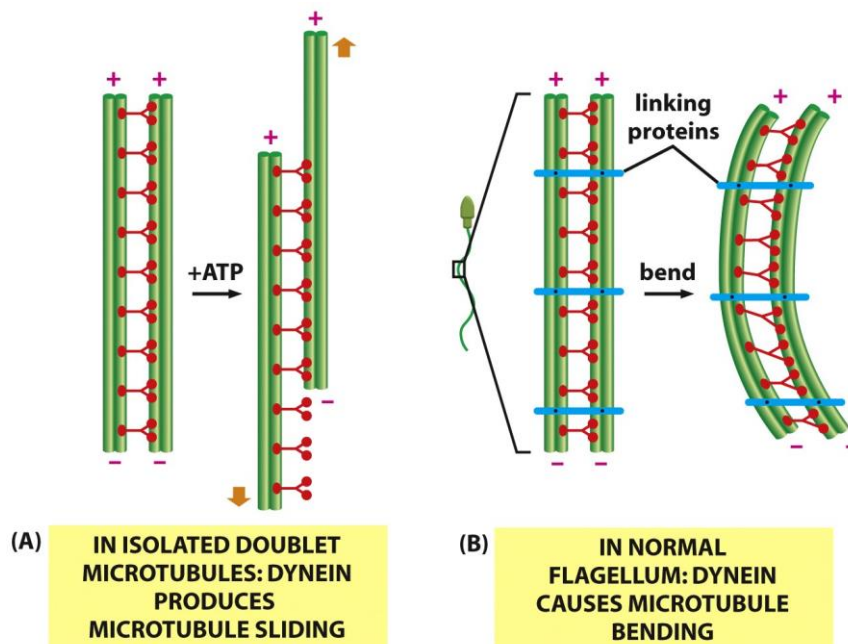
For  $C_c(T) < C < C_c(D)$   
 treadmilling occurs

## Ciliën en flagellen

**Ciliën** en **flagellen** zijn de mobiele structuren van de cel die bestaan uit microtubuli en dyneïne. Spermacellen gebruiken één flagel om een weg te banen naar de oöcyt. Ciliën zijn de celuitlopers die in het celmembraan zijn gebed. De beweging van een cilie of een flagel is mogelijk dankzij de



verbuiging van de kern, ook wel een **axoneem** genoemd. Het axoneem bestaat uit microtubuli, welke samen met geassocieerde eiwitten gestructureerd zijn in een kenmerkend en ordelijk patroon. Negen microtubuli-doubleten zijn gestructureerd in een ring, met in het centrum één paar enkele microtubuli. Het eiwit **dyneïne** vormt een brug tussen de microtubuli-doubletten. Wanneer het motordomein van het dyneïne-molecule geactiveerd wordt (gedreven door ATP), zal het dyneïnemolecule over het aangrenzende microtubuli-doublet bewegen. Dit zorgt voor een verbuiging van de cilie of flagel.



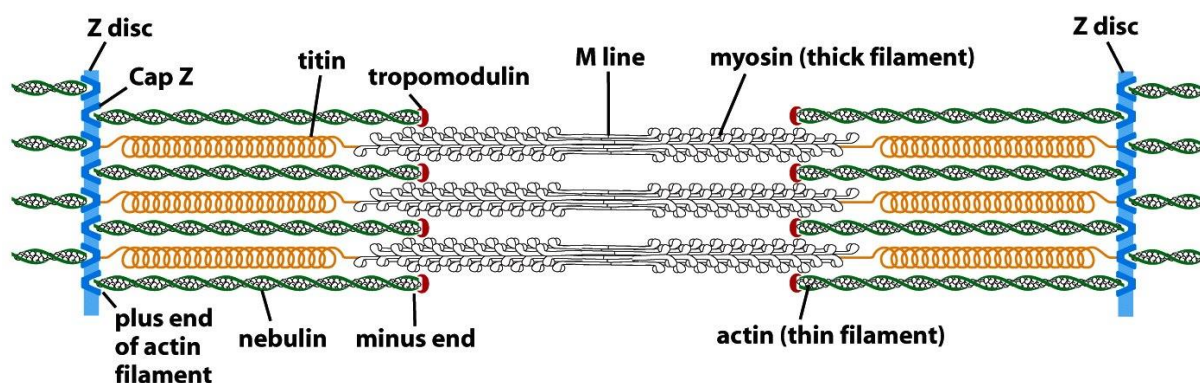


### Medische relevantie – voorbeeld

Dyneïne zorgt voor het bidirectioneel transport in de kern van de cilie en flagel. Een mutatie of het ontbreken van dyneïne in ciliën en flagellen leidt tot het **syndroom van Kartagener**. Het syndroom wordt gekarakteriseerd door een hogere vatbaarheid voor longinfecties (falen van het verwijderen van debris en bacteriën), mannelijke onvruchtbaarheid (immobiele spermatozoïden) en defecten in de vroege embryologische ontwikkeling, waardoor *situs inversus* (een spiegeling van de organen) ontstaat.

### Spiercontractie

De skeletale spier verbonden aan een pees bestaat uit verschillende spierbundels. Een spierbundel bestaat uit verschillende spiervezels, die weer bestaan uit bundels van myofibrillen. **Myofibrillen** bevatten lange contractiele eenheden die het **sarcomeer** worden genoemd. Elk sarcomeer vormt een reeks van parallelle en gedeeltelijk overlappende dunne en dikke filamenten. De dunne filamenten bestaan uit **actine**, nebuline, titine en tropomoduline, waarbij het plus-uiteinde van het actinefilament gehecht is aan de Z-schijf. De min-uiteinden van de actinefilamenten zijn uitgestrekt over het midden van het sarcomeer en overlappen de dikke filamenten. De dikke filamenten bestaan uit bundels van bipolaire **myosine II** (het motoreiwit).



Elk plusuiteinde van actinefilament dat vastgehecht is aan de Z-schijf bestaat uit **CapZ** en het  $\alpha$ -actine-eiwit. **Nebuline** is uitgestrekt over de Z-schijf tot het min-uiteinde van het actinefilament en werkt als een moleculaire liniaal voor het actinefilament. Tussen de Z-schijf en elk dik filament (myosine) bevindt zich het **titine**-eiwit. Dit werkt als moleculaire veer die één voor één kan ontvouwen bij mechanische stress (spiercontractie). Het **tropomoduline**-eiwit bestaat uit verschillende eiwitten (troponine en tropomyosine) en zorgt voor de controle van de spiercontractie onder invloed van  $\text{Ca}^{2+}$ . Een **spiercontractie** gebeurt wanneer het sarcomeer verkleint. Dit is een gevolg wanneer myosinefilamenten schuiven over de actinefilamenten, wat gebeurt onder invloed van ATP. Hierbij verandert de lengte van beide filamenten niet, maar schuiven ze over elkaar, zodat de sarcomeren verkorten.

