

HOOFDSTUK 8: CELKERN

Introductie

De **kern** is het **centrum** van **nucleaire activiteit**

- DNA wordt afgeschreven om via **nucleaire boodschappers** (mRNA) afgeschreven te worden in **functionele instrumenten** (proteïnen)
- eukaryoten: *eukaryon* = echte kern, essentie: membraan-omsloten kern
 - ↔ prokaryoten: **nucleoïd** of kernzone: de regio met het genetisch materiaal. bestaat uit:
 - **circulair chromosoom**
 - **plasmide**: kleine circulaire stukjes DNA
 - **episoom**: wanneer plasmiden worden ingebouwd in het chromosoom
 - plasmiden en episomen zijn bijzonder voor **genetic engineering**: het manipuleren van genetisch materiaal door een vreemd gen in te bouwen
- kerngrootte- en vorm kan verschillen in verschillende celtypen
 - o **kankercellen**: variabelere vorm en groter: dit kan gebruikt worden voor diagnose
- 3 belangrijkste kenmerken: het kernmembraan, het chromatine en de nucleair bodies
 - ↳ bv. nucleolus

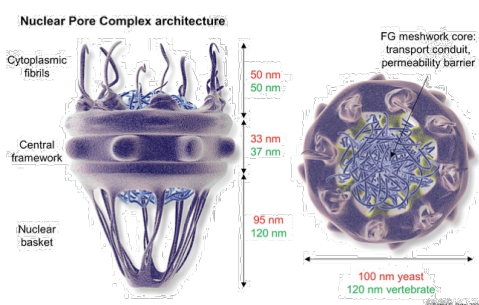
Nucleaire enveloppe

Celkern is omringd door een **dubbel membraan** gescheiden door een perinucleaire ruimte

- buitenste membraan is **continu met het ER**, alsook de perinucleaire ruimte
 - o = **nucleoplasmatisch reticulum**, buitenste membraan bezit ribosomen
 - o cytoplasmatische zijde bevat **membraanproteïnen**: verankering van de kern
- binnenste membraan bevat de **nucleaire lamina**
 - o filamenteus netwerk van intermediaire filamenteiwitten
- **nucleair porie complex NPC** verzorgt het contact nucleoplasma – cytoplasma

Nucleaire poriën controleren het nucleair transport

Structuur van het NPC



Nucleoporus

- nucleoporines: 30 soorten proteïnen in nucleoporus
- hoeveelheid hangt af van de kernactiviteit
- ring van 8 subunits met centraal kanaal (**transporter**)
- **transporter** faciliteert de beweging van macromoleculen
 - FG-proteïnen vormen selectieve barrière

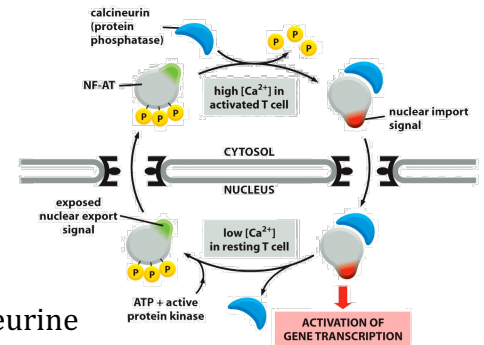
NPCs staan in voor passief en gereguleerd actief transport

- diffusie gebeurt aan een snelheid omgekeerd evenredig met de grootte
 - exclusielimiet ligt rond de 60 kDa, toch moeten veel grotere moleculen er nog door:
 - o import van histonen en enzymen voor replicatie en transcriptie
 - o export van mRNA (verpakt als **hetereogene nucleaire ribonucleoproteïnen hnRNP's**)
 - o export van ribosomale subunits nodig voor translatie
- **besluit**: - NPC heeft aanpasbare openingen die selectief kunnen worden aangesproken
- nood aan signaalsequenties (NLS en NES)

Nucleair transport vereist signaalsequenties

Basisprincipe: **associatie** van het substraat met carrier of **karyoferine** (importine of exportine)

- **substraat-carriercomplex** herkent en meert aan bij de nucleoporus en wordt erdoor getransporteerd
- **specificiteit**:
 - o basische aminozuren (Lys, Arg, ...) dienen als **nucleair lokalisatiesignaal NLS**
 - o leucine rijke regio dient als **nucleair export signaal NES**
 - o deze signaalsequenties zijn onafhankelijk van de plaats deze innemen in het eiwit en blijven altijd aanwezig in het eiwit.
- **verhinderend** voor import/export komt doordat het:
 - o signaal is **afgeschermd** door ander eiwit
 - o eiwit **verankerd** is aan andere eiwitten
 - o eiwit **specifiek gefosforyleerd** is
- deze transportsignalen zijn **cruciaal** voor genregulatie en differentiatie → mogelijke target voor **geneesmiddelen**
 - o bv. cyclosporine A verhindert de werking van calcineurine
 - een transcriptiefactor kan niet meer naar de kern
 - afstotingsverschijnselen bij transplantatie worden afgeremd

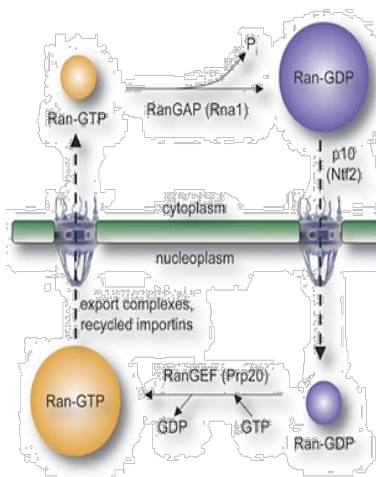


Nucleair transport hangt af van een Ran-gradiënt

Ran is een GTP-ase dat in een GTP en GDP vorm verschillend zal reageren

- meer Ran-GTP in de kern en meer Ran-GDP in het cytoplasma
- **Ran-GAP1**: GTP-ase activating proteïne ↔ **Ran-GEF**: guanine exchange factor
 - in de kern is er meer GTP-productie en in het cytoplasma meer GTP-hydrolyse

Wat is de functie nu bij nucleair transport?



Nucleair export

1. proteïne zal met een exportine, NES en geactiveerd Ran-GTP binden
2. het migreert door de nucleoporus
3. in cytoplasma voert Ran zijn activiteit uit: omzetting van GTP naar GDP door reactie met Ran-GAP1
4. complex valt uiteen: exportine en Ran-GDP keren terug naar de kern

Nucleair import

1. α -subunit van importine zal cargo herkennen als ze een NLS draagt
2. β -subunit herkent dan de aanmeerplaats in het NPC
3. het migreert door de nucleoporus
4. in de kern bindt Ran-GTP op importine: vrijstelling van de cargo
5. β -subunit bindt aan Ran-GTP en wordt teruggevoerd, α -subunit volgt
6. Ran-GDP wordt naar de kern gerecycleerd m.b.v. NTF2

Het genoom

Het **genoom** omvat de 2 complementaire strengen DNA verstrengeld in een dubbele helix

in vivo is dit gecomplexeerd met eiwitten om chromatine te vormen

→ dit is slechts partieel actief in de cel voor RNA-synthese

→ bij celdeling condenseert het chromatine om afzonderlijke chromosomen te vormen

genoom: de hele weerslag van het DNA ↔ het **gen**: DNA segment coderend voor een eiwit

Dubbele helix

Genetische transformatie (naar Griffith): virulentie van niet-pathogene pneumoniae stammen (Streptococcus) kan verhoogd worden door een injectie met dode virulente bacteriestammen.

→ DNA is hiervoor verantwoordelijk

Chargaff ontdekte de 4 purine/pyrimidine basen (A, T, G, C) in DNA

→ basecompositie tussen cellen van eenzelfde soort is gelijk

→ regel van Chargaff: gelijkheid in aantal adenines-thymines en guanines-cytosines

Watson-Crick ontdekten via biochemische en X-stralen diffractiestudies de DNA-structuur

- complementaire polynucleotideketens worden via H-bruggen samengehouden en vormen de rechtshandige dubbele helix
- suggereert **mechanisme** van **repliatie**: uiteengaan van strengen om als template te dienen

Bestuderen van het genoom

restrictie-enzymen bepalen de sequentie via restrictie-fragment mapping

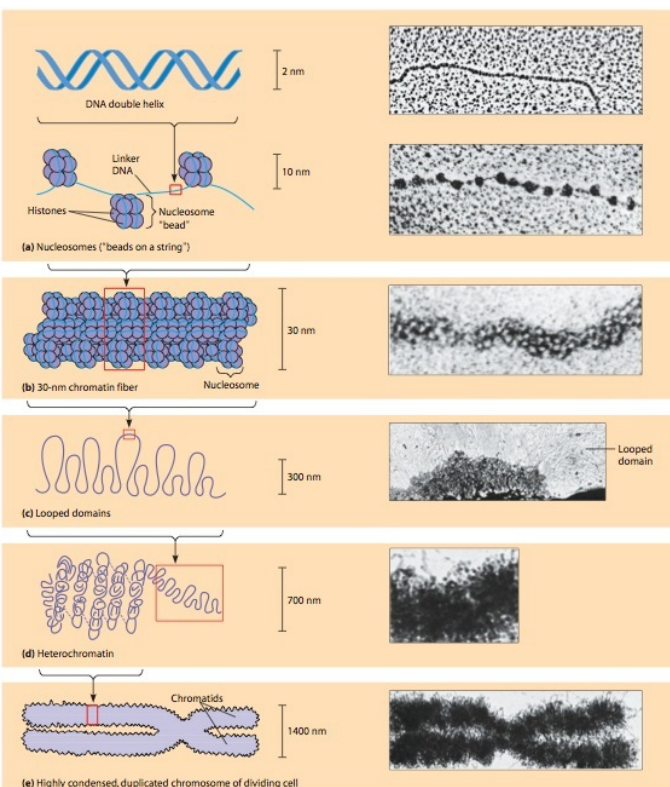
- restrictie-enzymen herkennen doelsequentie van 4-8 bp
- op basis van lengte kunnen deze met **agarose gel elektroforese** gescheiden worden
- combinatie van groot aantal restrictie-enzymen leidt tot het maken van een klievingsmap

Sanger sequencing of *chain termination method*

- aanwezigheid van nucleotiden maakt van aanwezig enkelstrengig DNA dubbelstrengig DNA
- ook zijn gekleurde dideoxynucleotiden aanwezig: hebben geen 3' hydroxyl groep meer
→ synthese stopt prematuur en kan worden uitgelezen met elektroforese

DNA wordt opgevouwen

Waarom? - kern is $\sim 10\text{nm}$ en $500\mu\text{m}^3$ en een ontwonden chromosoom is 4 cm lang
- ontold DNA kan tot 15.000 keer rond de cel gewikkeld worden



Hoe?

Histonen zetten het DNA om naar chromatine en vormen de **nucleosomen**

- balanceren door hun positieve lading het negatief geladen DNA
- **beads-on-a-string**: DNA vormt regelmatige complexen als parels aan een draad
- **nucleosoom**: bevat 8 histonen waarrond DNA gewikkeld is

Elementaire chromatinevezel

ontstaat als nucleosoomkernen dicht achter elkaar een nucleoproteïne filament vormen
→ deze filamenten verbonden door linker-DNA
→ opgebonden door histonen H1 en opgespiraliseerd vormt het de chromatinevezel

Chromatine wordt nog verder opgepakt in **lusedomeinen** van 50.000 tot 100.000 bp

- geregelde hechting van DNA aan niet-histon proteïnen
- dit kan ook nog verder opgevouwen worden tot
 - o **heterochromatine**: inactief DNA: het wordt niet gebruikt voor transcriptie
 - o **euchromatine**: actief DNA is vrij los opgestapeld voor de transcriptie

Chromosomen

Chromosomen worden gevormd bij celdeling

- het zijn 2 zusterchromatiden verbonden aan centromeer
- chromatinedraad is gevouwen in lussen die bij elkaar worden gehouden door proteïnen
- als deze lussen verder worden geclusterd: ontstaan van **typische banderingspatronen**
 - o bij clusteren ontstaan er gelijk geplooides sequenties
 - o geeft het **karyotype**: karakterisatie van het chromosoom voor een organisme
 - iedere soort heeft een welbepaald aantal chromosomen met bep. morfologie

diploïde (2n) chromosomen vormen de somatische cellen, **haploïde** (1n) vormen de gameten

- in een diploïde cel: 22 paar autosomale chromosomen, 1 paar heterosomale (XX of XY)
- hoeveelheid genetisch materiaal bepaalt niet altijd de **complexiteit** van het organisme
 - o het draait om de **hoeveelheid functionele genen** en **regulatorische sequenties**
 - o eukaryoten bevatten veel niet-coderend DNA, waaronder repetitieve sequenties

bepaalde syndromen zijn afgeleid uit een abnormaal aantal chromosomen: **aneuploidie**

Syndroom van Down of trisomie 21



analyse van het **karyotype**: op chromosoomnummer 21 zijn er drie chromosomen i.p.v. 2

→ deze mensen hebben mentale achterstand, zijn klein, hebben bijzondere handpalmen en congenitale misvormingen (zoals hartafwijkingen)

Beeld 1: Kenny, een tijger met het syndroom van Down

syndroom van Klinefelter: XXY: fenotypisch gezien zijn dit mannen waarbij de secundaire geslachtskenmerken niet tot uiting komen. Zij zijn steriel.

syndroom van Turner: X: deze 'vrouwen' ontwikkelen geen ovaria, hebben een onderontwikkeling van borsten, een kleine ovaria en zijn mentaal geretardeerd

Non-random kernorganisatie

Men zou denken dat de kern 1 grote spaghetti is van chromatine: dit klopt niet

- uiterst precieze organisatie: DNA en proteïnen zijn georganiseerd in micro-domeinen die ondersteund worden door een nucleoskelet

Nucleaire matrix?

Het meeste DNA werd verwijderd uit de kern: overblijvend netwerk → de **nucleaire matrix**

- belangrijkste functie: behouden van kernvorm en chromatineorganisatie
- biochemische analyse: men vond structurele proteïnen (bv. actine) terug maar ook DNA-regio's, de **matrix attachment regio's MAR's**
 - o deze MAR's komen voor in DNA dat tot expressie komt, maar ook in repetitieve regio's zoals telomeren
 - o ankerplaatsen voor chromatinevezels en nucleaire processen (replicatie, etc.)
 - o deze analyse is vatbaar voor artefacten: bestaan niet meer algemeen aanvaard

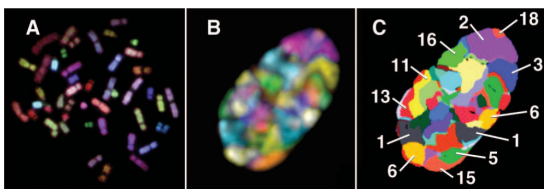
Nucleaire lamina

De **nucleaire lamina** is een netwerk van intermediaire filamenten en eiwitten gelegen onder het binnenste kernmembraan.

- biedt **mechanische ondersteuning** en is **ankerpunt** voor eiwitten/DNA aan eiwitten
- verbonden met **linker of nucleoskeleton and cytoskeleton LINC**, een complex van transmembraanproteïnen
- maakt veel verbindingen met eiwitten van binnenste membraan, NPC en chromatine
- vnl. opgebouwd uit lamines (A- en B-types)
 - o afwezigheid van A-type leidt tot afwijkende kernvorm en hoge plasticiteit
→ komt voor in granulocyten en kankercellen
 - o **laminopathiën**: mutaties in de lamines leiden tot:
 - weefselspecifieke aandoeningen: spierdystrofie, zenuwaandoeningen, ...
 - systemische aandoeningen zoals bv. **Hutchinson-Gilford Progeria**
 - sterk versnelde veroudering (typische verouderingskenmerken)
 - sterven op ± 12,6 jaar aan artherosclerose (hartaanvallen en beroertes)

Niet-willekeurige verspreiding chromatine

In de **interfase nucleus** blijkt een chromosoom een **chromosoom territorium** in te nemen



→ via FISH: fluorescentie *in situ* hybridisatie onderzocht
→ fluorescente 'probe' gebonden aan complementair stukje doelwit DNA

→ er is slechts een beperkte vermenging

- positie van **chromosoomterritoria** ligt niet vast: kan tussen cellen variëren en zelfs wijzigen in de levenscyclus van een cel
- nucleaire enveloppe en lamina ondersteunen deze organisatie door te binden dicht bij NPC's
 - o dit zijn weinig actieve regio's van **heterochromatine**, tegen kernwand en rond nucleolus
 - **constitutief heterochromatine** altijd sterk gecondenseerd (vnl. repetitief DNA)
 - **facultatief heterochromatine** kan afhankelijk van weefsel en fysiologische status geactiveerd worden

DNA-fabrieken

Alle **primaire nucleaire functies** (transcriptie, replicatie, ...) vinden plaats in specifieke sites

- **transcriptiefabrieken**: concentratie van transcriptiefactoren en RNA om DNA af te schrijven
- **replicatiefabrieken**: replicatie machinerie en factoren voor chromatine modificatie
- **DNA-herstel**: wordt ook gecompartmentaliseerd: herstelproteïnes worden gemobiliseerd uit een nucleoplasmatische pool om zich te concentreren rond DNA herstel foci

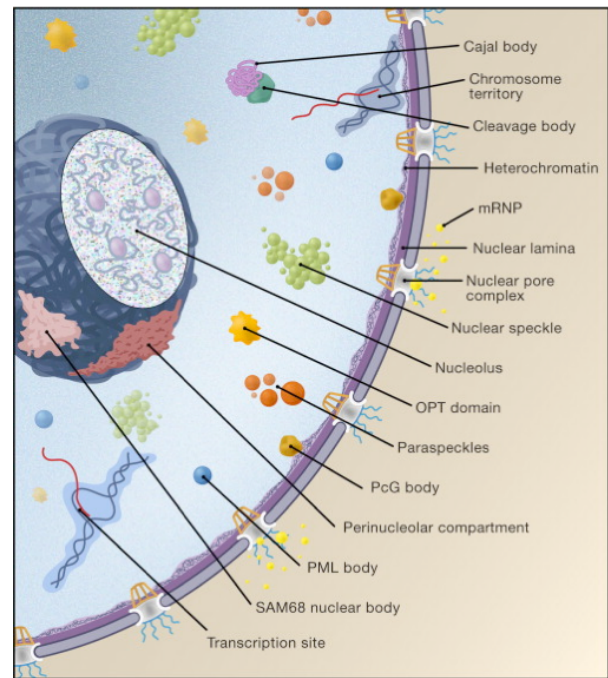
Nuclear bodies

Nuclear bodies zijn membraanloze subdomeinen met een specifieke set van proteïnen

- alle niet-histon eiwitten worden in deze structuren gecompartmentaliseerd
- **nucleolus** is de meest prominente NB en zorgt voor ribosomale RNA productie
- nog andere NB's, vooral in verband gebracht met RNA-synthese en modificatie

Cajal bodies: nabij histon en snRNA gen clusters

Nucleolus: nabij ribosomale genclusters



Nucleolus

De **nucleolus** staat in voor de synthese van rRNA en pre-ribosomale subeenheden

- grootte, vorm en aantal varieert naargelang het organisme, celtype en activiteit
- **fibrillaire regio:** bevatten het DNA dat wordt afgeschreven in rRNA
 - o bevatten **nucleolar organizing regions NOR's:** tot 100en kopijen van rRNA genen
- **granulaire regio:** rRNA en geïmporteerde proteïnes verpakt tot ribosomale subunits
- decondenseert tijdens de mitose
 - o verschijnt terug bij G1 fase als pre-nucleolaire lichaampjes
 - o deze lichaampjes komen bij elkaar thv NOR's om zo de interfase nucleolus te vormen

Interchromatine granulen IGs

IGs of **nuclear speckles** zijn onregelmatig verspreid in clusters tussen het chromatine

- bevatten RNPs en verschillende enzymen zoals ATPase en GTPase, NADP
- bevatten ook ribosomen die naar het cytoplasma getransporteerd worden
- bevatten componenten van pre-mRNA splicing apparaat

PML bodies

Promyelocytic leukaemia bodies PML hebben uiteenlopende functies

- in essentie: **tumorsuppressieve mechanismen**
 - o inductie van apoptose en senescentie (ouderdom)
 - o inhibitie van proliferatie
 - o onderhoud van genoomstabiliteit
 - o antivirale respons
- bij **cellulaire stress** (bv. bij virale infectie, DNA schade) wijzigen PML bodies in aantal, grootte en distributie = **stress responsieve elementen**