**CELBIOLOGIE HOOFDSTUK 10: Cellulaire informatie**

1. De informatiestroom

1.1 Centrale dogmatheorie

* Centrale dogmatheorie
  + Volgens deze theorie verloopt de algemene stroom van informatie in de cel in de richting van DNA naar RNA naar proteïne
  + De DNA sequentie = sjabloon voor de synthese van een RNA
  + DNA -> RNA -> Proteïne
  + Replicatie:
    - DNA -> DNA
    - Verdubbeling van DNA
  + Transcriptie:
    - DNA -> RNA
    - Het afschrijven van DNA naar RNA
    - Dezelfde moleculaire taal: nucleïnezuur wordt omgezet naar een andere
    - In nucleus/ kern
  + Translatie:
    - RNA -> Proteïne
    - Andere moleculaire taal -> vertalen/ translatie: nucleïnezuur omgezet naar een aminozuur
    - In cytoplasma

2. Transcriptie

2.1 Eukaryoten Vs. Prokaryoten

* In prokaryoten zijn transcriptie en translatie rechtstreeks gekoppeld
  + Prokaryoten: DNA en proteïnesynthese in dezelfde omgeving
  + Eukaryoten: genen in kern en eiwitsynthese in cytoplasma
* In eukaryote cellen is er een extensieve bewerking en mobilisatie van RNA en proteïne
  + Vb: editing,…
* Polycistronisch (prokaryoten) <-> monocistronisch (eukaryoten)
  + Polycistronisch = uit 1 transcript w meerdere genen afgeschreven
  + Monocistronisch = uit 1 transcript w 1 gen afgeschreven (1gen/transcript)

2.2 Transcriptie = RNA synthese

* **Transcriptie eenheid** = 1 ononderbroken afgeschreven stukje DNA
* Coding RNA (mRNA) vs. non-coding RNA (tRNA, rRNA, ….)
  + mRNA
    - = messenger RNA of boodschapper RNA
    - Dit RNA wordt via transcriptie vh DNA afgeschreven en vertaald in proteïnes via translatie
    - Brengt informatie vh DNA over naar het cytoplasma
    - Intermediaire functie
  + rRNA
    - = ribosomaal RNA
    - = maakt deel uit van de ribosomen
    - Stabiel
  + tRNA
    - transfer RNA
    - = staan in voor aanlevering van juiste AZ tijdens proteïne synthese
  + …..
* Waarom een RNA intermediair?
  + DNA blijft hierdoor in de kern
  + Intermediair laat toe dat je sneller produceert, dus meer
    - Dan dat het rechtstreeks uit DNA zou komen
  + Hoeveelheid RNA kan je wijzigen
    - Zo kan je de productie wijzigen

2.3 Het transcriptieproces in prokaryoten

* Transcriptie
  + = proces waarbij RNA molecule wordt gesynthetiseerd waarvan de base sequentie complementair is aan een stukje template DNA
    - stukje DNA = de transcriptie-eenheid
* Transcriptieproces
  + Binding van een RNA polymerase aan promotor regio
    - RNA polymerase = zorgt voor de lokale ontwinding van DNA
    - Promotor = DNA regio die bindings en startsignalen bevat voor het RNA polymerase
  + RNA polymerase start de RNA synthese
    - Gebruik hiervoor 1 vd 2 strengen als template
      * Template streng = 3’-5’
    - Polymerase beweegt over de template terwijl de DNA molecule zich ontwindt en de RNA molecule verlengt
      * Groeiende RNA streng = coderende streng = 5’-3’
  + Terminatie signaal
    - Synthese stopt aan terminator
    - RNA molecule komt los
  + 4 fasen: binding, initiatie, elongatie, terminatie
* Resultaat
  + 1 transcriptie-eenheid wordt door transcriptie afgeschreven
    - Prokaryoten: meerdere genen per transcript afgeschreven
    - Eukaryoten: 1 gen per transcript afgeschreven

2.4 Het transcriptieproces in eukaryoten

* 3 polymerasen:
  + RNA pol I = productie rRNA
  + RNA pol II = productie mRNA, snRNA, miRNA
  + RNA pol III = productie tRNA, 5S RNA

3. RNA processing

* RNA processing
  + = het geheel vd modificaties die nodig zijn om het finale RNA product te vormen
    - De nieuw geproduceerde RNA molecule (primair transcript) wordt meestal uitvoerig gemodificeerd
  + Modificatie door:
    - Additie nucleotiden (cap)
    - Verwijderen van nucleotiden (splicing, cleavage)
    - Modificatie nucleotiden (editing)
* Pre-RNA => modificatie => mRNA of tRNA of miRNA of ….

3.1 mRNA processing

* Pre-mRNA
  + Processing/modificatie van pre-mRNA nodig om kloof transcriptie – translatie te overbruggen bij eukaryoten
    - Prokayoten: koppeling transcriptie en translatie -> processing onnodig

3.1.1 Eindstandige modificaties

* 5’cap = een 7’ methylguanosine
  + Stabilisatie RNA:
    - Draagt bij tot de stabiliteit vd RNA molecule -> door bescherming tegen nucleasen
  + Ribosoom-herkenning:
    - Is een herkenningsplaats bij de juiste positionering in het ribosoom
* Poly-adenylatie
  + Aan de 3’ zijde w een poly-A staart toegevoegd
  + Stabilisatie
    - Poly-A staart stabiliseert de mRNA molecule & beschermt tegen nucelasen
    - Hoe langer de staart, hoe stabieler

3.1.2 Splicing

* Principe
  + = de precieze verwijdering van introns en hierdoor een verbinding vormen tussen exons
  + Pre-mRNa’s bevatten sequenties in primaire transcript die niet in mature RNA zitten
    - Deze introns (=interveniërende sequenties) onderbreken de exons (=coderende sequenties)
    - Oplossing: introns uitknippen via RNA splicing
  + 90% introns
* Proces
  + Introns worden verwijderd door spliceosomen
    - Bestaan uit snRP’s = kleine snRNA proteïnecomplexen
    - Herkennen splice-sequenties herkennen
      * Aan 5’ zijde vh intron: GU
      * Aan 3’ zijde vh intron: AG
  + Verwijdering via lassostructuur
    - Uiteinden vh intron worden samengebracht
    - De 5’ splice site wordt geknipt & vrije uiteinde wordt gebonden met residu -> lassostructuur
    - De 3’ site wordt geknipt -> vrijstelling vh intron
      * Intron wordt aangevallen door nucleasen en afgebroken
    - 2 exons worden verbonden (blijven over)
* Soms self-splicing introns (ribozymen)
  + Ribozymen
    - = RNA molecule met de eigenschappen v/e enzyme
    - Worden ofwel als lineaire fragmenten of als lasso)structuren uitgeknipt
* Nut van splicing?
  + Alternatieve splicing
    - Het laat toe om pre-mRNA moleculen op verschillende manieren te splitsen
      * Dit zorgt voor diversiteit aan functionele moleculen
        + uit 1 transcript verschillende proteïnen en verschillende soorten maken
      * Dit zorgt voor genregulatie
  + Exon shuffling
    - vorm van moleculaire evolutie
      * door nieuwe combinaties van exons tijdens recombinatie events
      * vb: recombinatie tussen introns van verschillende genen

3.1.3 RNA editing

* RNA editing
  + nucleotiden toevoegen, verwijderen of chemisch veranderen

3.1.3 RNA metabolisme

* RNA metabolisme
  + mRNA heeft korte levensduur
  + hoge turnover
    - mRNA moleculen worden snel gedegradeerd en vervangen door nieuwe moleculen
    - zorgt voor snelle genregulatie
  + amplificatie

3.2 rRNA processing

* 4 types rRNA
  + Kleine subunit 40S: 18S
  + Grote subunit 60S: 28S, 5.8S, 5S
  + S = snelheid waarmee ze sedimenteren
    - Hoe zwaarder, hoe sneller sedimenteren
* Proces:
  + De 3 zwaarste 28S, 18S, 5.8S
    - worden gecodeerd door 1 transcriptie eenheid en worden afgeschreven op 1 primair transcript = pre-rRNA = precursor
      * transcriptie door RNA pol1 in de nucleolus
    - worden gescheiden door afgeschreven spacers
      * hierdoor garantie dat de 3 rRNA’s in gelijke hoeveelheden aangemaakt worden
  + klieving spacers/ splitsing
    - de spacers worden na transcriptie uit het pre-rRNA geknipt & degraderen
    - de individuele rRNA’s komen vrij
      * bij terminator
    - cleavage ≠ splicing
    - Gecoördineerd door snoRNAs (small nucleolar RNA’s)
  + Methylatie
    - 2’-hydroxylgroepen worden gemethyleerd
    - Gecoördineerd door snoRNAs
* 5S transcriptie apart aangemaakt
  + Assemblage ribosomale sub-units
* Varenbladstructuur!!!
  + = transcriptieproces in wording
  + = tandem kopijen DNA
    - Promotor -> terminator -> 18S, 5.8S,.. loslaten etc.
  + Blaadjes die uitsteken = bijna klaar met transcriptie
  + Ketens worden langer want in gat stoempen

3.3 tRNA processing

* Primair transcript: pre-tRNA = precursor
* Zelf-opvouwing (klaverblad)
* Proces:
  + Korte 5’ leader sequentie wordt verwijderd
  + Aan 3’ uiteinde wordt 2 terminale nucleotiden vervangen door een 5’-CCA-3’ trinucleotide
  + Ook chemische modificatie mogelijk
    - ongewone basen zoals dihydrouridine, inosine, …
  + Ook splicing mogelijk

4. Translatie

4.1 Genetische code

* Crick en Brenner:
  + Bewijzen dat genetische code een triplet code is
  + Veronderstellingen:
    - Codon bestaat uit 3 basen
      * 20 AZ moeten gecodeerd worden met 4 basen: A, T, G, C
      * Met 2 basen per codon -> maar 16 mogelijkheden
    - Genen zijn collineair met de eiwitten waarvoor ze coderen
      * = de volgorde vd nucleotiden in het gen correleert met de volgorde van AZ vh overeenkomstige protëine
  + Bewijs: Frameshift mutaties in T4 bacteriofaag
    - = experimenten die het leesraam verstoren
    - Mbv mutagene kleurstof -> basepaarinserties of deleties inbrengen
      * Zulke individuele mutatie leidt tot verlies van informatie wegens verstoring vh leesraam
      * Maar als mutaties combineren -> leidt tot het teniet doen van originele mutatie (pseudo-wild type)
        + Vb: na 1ste mutatie nog een 2de doen
    - Mutanten verdelen in 2 klassen
      * + mutant
        + = insertie
      * - mutant
        + = deletie
    - Bij recombinatie van een + en een – mutant of bij combinatie van 3 gelijksoortige mutanten -> pseudo-wild type waargenomen
      * Voorwaarde: mutaties moeten dicht bij elkaar gebeuren
  + Resultaten
    - Genetische code is een triplet code
      * Want het leesraam herstelt bij een insertie van 3 nucleotiden
    - Colineairiteit
      * 1 veranderde nucleotide leidt tot wijziging van slechts 1 AZ
    - Niet overlappende code
      * 1 mutatie heeft impact
* Genetische code
  + = regels hoe de nucleïnezuursequentie van mRNA vertaald moet worden in een reeks aminozuren
  + Eigenschappen
    - Triplet code
    - Code bestaat uit combinatie van 3 letterwoorden, 3 basen = codons
      * 64 in totaal
    - Degeneratie: 61 codons voor 20 AZ
      * AZ worden door meer dan 1 codon gecodeerd
      * Verschillende codons voor 1 AZ zijn gelijkend
      * Gelijkaardige AZ worden door gelijkaardige codons
    - 1 startcodon: AUG
    - 3 stopcodons: UAA, UGA en UAG
    - Niet-overlappend en geen punctuatie
      * Elk nucleotide maakt slechts deel uit van 1 triplet
      * (wel overlappende leesramen)
    - Universeel
      * (wel preferentieel codon gebruik)

4.2 Het translatieproces

* Translatieproces
  + Per 3 aflezen vd genetische code op het mRNA vanaf het startcodon AUG tot men stopcodon tegenkomt in hetzelfde open leesraam -> eiwit produceren

4.3 Het translatie apparaat

* Translatie apparaat bestaat uit 5 componenten
  + Ribosomen
    - Instaan voor synthese proces
    - Hierop focussen
  + tRNA moleculen
    - AZ aanvoeren en in juist volgorde zetten
  + Aminoacyl tRNA
    - AZ aan juiste tRNA moleculen hechten
  + mRNA
    - juiste AZ sequentie coderen
  + proteïne factoren
    - verschillende stappen (initiatie, elongatie, terminatie) vh translatieproces faciliteren
* Ribosoom
  + Voert de synthese uit
  + Ligt vrij in cytoplasma of gebonden aan ruw ER
  + Eukaryoten
    - Ribosoom opgebouwd uit een 40S subunit, en 60S subunit
  + Beschikt over:
    - mRNA bindend domein
    - 3 tRNA bindingsdomeinen
      * Amino-acyl tRNA binding site (A site)
        + Domein dat nieuw inkomende tRNA bindt
      * Peptidyl tRNA binding site (P site)
        + Domein waar groeiende polypeptide zit
      * Exit site (E site)
        + Domein waar tRNA’s die AZ afgegeven hebben het ribosoom verlaten
* Amino-actyl tRNA
  + = wanneer tRNA veresterd is (geladen) met een AZ
  + Geladen door amino-actyl-tRNA synthetasen
  + Hoge energie binding -> onstabiel
  + Herkenning v/e codon via anti-codon
  + Iso-accepting
    - = verschillende tRNA kunnen eenzelfde AZ dragen
  + Redundant
    - = verschillende tRNA herkennen eenzelfde codon via eenzelfde anti-codon
  + Wobble
    - = 1 tRNA kan verschillende codons herkennen
    - zorgt voor flexibiliteit

4.4 Translatieproces in eukaryoten

* Monocistronisch
* Geen ribosoombindingsplaats, herkenning cap
* Initiatiecomplex vorming ATP
* Niet gefromyleerd initiator methionine
* 2 elongatie factoren, 1 release factor
  + Altijd van 5’ naar 3’

5. Samenvatting

* Algemeen:
  + Nucleus
    - Transcriptie -> RNA splicing -> mRNA -> export
  + Cytoplasma
    - mRNA -> translatie -> proteïnen

6. Proteïne modificaties en sortering

6.1 Post-translationele modificaties/ processing

* Na translatie:
  + Opvouwing
    - Proteïne is pas functioneel indien 3D opvouwing
    - opvouwing gebeurt door chaperones (vb: Hsp 70)
  + Chemische modificaties
    - Na synthese en opvouwing
    - methylatie, acetylatie, sumoylatie, …
    - Vb: 1ste ingebouwde AZ, methionine afsplitsen na translatie
    - Vb: stukken AZ verwijderen
  + Assemblage
    - Multimerisatie van verschillende polypeptideketens -> vormen multi-subunit proteïnes
  + Protein splicing
    - Interne sequenties (inteïnes) uit polypeptideketen verwijderen -> overblijvende segmenten (exteïnes) aaneen zetten -> vormen mature proteïne

6.2 Proteïne sortering

* Er zijn verschillende cellulaire eindbestemmingen voor proteïnes:
  + Cytosol
  + Endomembraansysteem
    - Golgi, lysosomen, ER, secretorische vesikels, nucleaire membraan, plasmamembraan)
  + Andere organellen
    - Mitochondriën, chloroplasten, peroxisomen, kern
* Signaalsequenties geven proteïne een adres
  + = localisatiesequenties
  + Vb: nucleair importsequentie: lysines naar kern
  + Vb: nucleair exportsequentie: lysines uit kern
  + Vb: KDL sequentie: terug naar ER
* 2 verkeersroutes
  + Cotranslationeel transport
    - Hechting van ribosoom op ruw ER
    - Proteïne zal naar endomembraansysteem gaan
  + Post-translationeel transport
    - Cytoplasmatische afwerking vh proteïne
    - Transport naar een doelcompartiment (andere organellen)
      * Mitochondrion, chloroplast, kern, peroxisomen

6.2.1 Cotranslationeel transport

* Cotranslationeel transport
  + Een intern signaalpeptide stuurt het ribosoom naar het RER
  + Signaalpeptide wordt herkend door een signal recognition particle (SRP)
    - SRP blokkeert translatie in het ribosoom
    - Herkent een SRP receptor, gelegen in buitenste membraan vh ER
  + SRP receptor
    - Onderdeel vh translocon = proteïne complex voor proteïne transport
    - Gaat SRP ribosoom complex binden aan het translocon
    - Zorgt dat porieproteïne (kanaal) in translocon opent
  + Translocon
    - Bevat kanaal dat opent -> groeiend proteïne gaat door het ER membraan
  + Signaalpeptidase
    - Knipt signaalpeptide eraf (klieving)
  + Finaal/ synthese klaar
    - Het finale product kom in ER lumen
      * Sommige gaan niet naar lumen -> blijven in membraan
      * Dit kan men voorspellen door de hydopathie index
    - Translocon kanaal sluit
    - Ribosoom subunits ontkoppelen vh ER membraan en van elkaar
* Proteïne opvouwing en kwaliteitscontrole in ER:
  + Na synthese
    - Opvouwen in finale vorm
    - Assemblage tot multi-subunit proteïnen met behulp van chaperones (BiP)
  + Chaperones
    - Herkennen onopgevouwde proteïnes
  + Slecht opgevouwde proteïnen
    - Activeren kwaliteitscontrole mechanismen
      * UPR (unfolded protein response)
        + Zorgt voor uitschakeling proteïnesynthese
      * ERAD (ER-associated degradation)
        + Herkent slecht opgevouwde proteïnen -> transport naar cytoplasma -> gestript (deglycolysatie) + getagged (ubiquitinylatie) -> degradatie door proteasomen -> dood
* Stop- of start-transfers
  + Mediëren insertie van integrale proteïnen/ transmembraanproteïnen
  + Transmembraaneiwitten:
    - Worden in membraan opgevouwen door interne start en stopzones
    - Transmembraanproteïnen met verschillende membraan-overspannende domeinen -> bestaan uit multipele start en stop transfersequenties

6.2.2 Posttranslationeel transport

* Posttranslationeel transport
  + Proteïnes bestemd voor organellen die geen deel uitmaken vh endomembraansysteem -> w gesynthetiseerd op vrije ribosomen
  + Vb: Chloroplasten en mitochondriën
* Mitochondriën:
  + Chaperones
    - Aan beide kanten
    - Ontwinden de polypeptide tijdens de synthese
    - Worden verwijderd in een ATP vereisend proces wanneer een transit sequentie wordt herkend
  + Transit sequentie
    - = signaal voor de opname door het mitochondrion
    - Zal verwijderd worden in mitochondrion door een transit peptidase
  + TOM (translocase of the outer membrane) / TIM (translocase of the inner membran)
    - Opname van proteïnen via gespecialiseerde tansportcomplexen
  + Polypeptide door een porie vh TOM getransporteerd
    - Indien bestemd voor het binnenste vh organel -> ook door TIM
  + Soorten signalen -> juiste compartiment vh mitochondrion
    - Hydrofobe sorteersignalen
    - Transitsequentie

7. Kernpunten

* DNA in kern selectief afgeschreven tot RNA via transcriptie
* mRNA wordt in cytoplasma door ribosomen vertaald in proteïnen
* Naast mRNA, ook niet coderende RNA molecule met een functionele of structurele rol zoals rRNA, tRNA en kleinere RNA’s: snRNA, miRNA
* RNA polymerase schrijft 1 transcriptie af in een proces dat bestaat uit bindingen ter hoogte van een promotorsequentie, initiatie en elongatie met lokale ontwikkeling, en terminatie ter hoogte van een terminatorsequentie
* Eukaryote transcriptie is monocistronisch en produceert een primair transcript dat extensief wordt bewerkt door additie (capping en polyadenylatie), verwijdering (splicing) en wijziging (editing) van nucleotiden
* Beperkte stabiliteit van mRNA laat snelle genregulatie toe
* Genetische code is ondubbelzinnig, niet overlappend, colineair, gedegenereerd en universeel
* Translatieapparaat bestaat uit ribosomen, die instaan voor het synthese proces, tRNA moleculen die AZ aanvoeren, aminoacyl tRNA synthetasen, die AZ aan de juiste tRNA moleculen hechten, mRNA moleculen die de juiste AZsequentie coderen binnen een open leesraam, en additionele proteïne factoren
* Proteïne na productie opgevouwen met behulp van chaperones, gemodificeerd door afsplitsing en chemische wijziging van AZ, en eventueel gekoppeld met andere polypeptideketens tot een multimeer
* Proteïnen in cel gesorteerd op basis van signaalsequentie
* Proteïnen bestemd voor endomembraansysteem of extracellulaire omgeving via co-translationele translocatie in het ER gebracht worden; andere worden door vrije ribosomen in het cytoplasma geproduceerd en eventueel via post-translationeel transport naar een doelwitorganel gebracht