**CELBIOLOGIE Hoofdstuk 15: De celkern**

1. Introductie

* Kern = centrum vd cellulaire activiteit
  + Hier ligt de DNA (informatie) opgeslagen-> afgeschreven door mRNA/ transcriptie -> translatie/omgezet tot proteïnes
  + Typisch kenmerk
    - Eukaryote cellen
      * Eukaryon = met celmembraan omsloten kern
    - Prokaryote cellen
      * kernzone of nucleoïd = regio met genetisch materiaal
  + Bevat
    - Chromosoom
    - Plasmiden
      * = kleine losse stukjes circulair DNA
      * Kunnen ingebouwd zijn in chromosoom = episomen
      * Kunnen gebruikt worden om genetisch materiaal v/e organisme op kunstmatige wijze te veranderen
* Lesinhoud
  + De nucleaire enveloppe
  + Het genoom
  + Non random kernorganisatie

2. De nucleaire enveloppe

* Nucleaire enveloppe
  + = een dubbel membraan rond de celkern
    - Elke lipidenlaag wordt gescheiden door een perinucleaire ruimte
  + Buitenste membraan en lumen zijn continu met ER
  + Binnenkant wordt ondersteunt door nucleaire lamina
    - = filamenteus netwerk van intermediaire filamenteiwitten
  + Geperforeerd door nucleaire poriën complex (NPC)
    - Zorgt voor contact tussen cytoplasma en nuceloplasma
  + Ontstaat door endocytose = invaginaties
* Nucleoplastisch reticulum
  + = diepe invaginaties om het totale membraanoppervlak sterk te vergroten
  + Komt soms voor

2.1 Het nucleaire porie complex (NPC) is een selectieve moleculaire poort (controleert transport)

* Structuur van het NPC
  + Kern bevat 3000-4000 NPC per cel
  + Bevat > 30 verschillende proteïnen = nucleoporines
  + Octagonale symmetrie in het vlak vd membraan
  + Bouw
    - Transporter = centrale kanaal
      * Transporter faciliteert beweging macromoleculen
      * krijgt hulp van FG-proteïnen (= fenylalanine glycinerijke)
        + FG proteïnen houden grote moleculen tegen
    - Een ring van 8 subeenheden op transporter
    - Een mandstructuur
      * Verankering met de nucleaire lamina
      * Aan de perinucleaire zijde
* NPCs staan in voor passief en gereguleerd actief transport
  + Experiment:
    - Injectie van colloïdaal goud of radioactief labelen van verschillende groottes
    - Vaststelling:
      * grote partikels geraken de kern niet meer binnen
      * exclusie zit rond de 60kDA
        + onder deze limiet diffunderen moleculen aan een snelheid die omgekeerd evenredig is aan hun grootte
  + Passief transport
    - Kleine moleculen en ionen vrij diffunderen doorheen de poriën
  + Actief transport
    - Grote moleculen die in en uit de kern moeten
    - NPC heeft hiervoor een aanpasbare opening
      * Gaat open bij nucleair lokalisatie signaal
      * Selectief
    - Vb import: ribosomale proteïnen, histonen, replicatie en transcriptie factoren
    - Vb: export: ribosoom subunits, mRNA, tRNA
* BELANGRIJK
  + Signaalsequentie is niet voldoende voor transport
    - Want het signaal kan ook niet herkent worden door afscherming, fosforylatie, verankering,…

2.2 Basisprincipes van nucleair transport

* Transportreceptoren (karyoferines)
* Signaalsequenties (NLS/NES)
* Ran gradient (Ran-GTP/Ran-GDP

2.2.1 Transportreceptoren (karyoferines)

* Import en export gebeuren door de associatie vh substraat met een carrier of karyoferine
  + = een importine of exportine
  + Substraat-carrier complex herkent de nucleoporus via een aanmeerplaats -> wordt door opening getransporteerd

2.2.2 Signaalsequenties (NLS/NES)

* Iedere carrier/ karyoferine herkent specifieke sequenties in het substraat
  + NLS = nucleair localisatiesignaal
    - Bestaat uit een reeks basische aminozuren (vb: KKKK)
  + NES = nucleair export signaal
    - Bestaat uit leucine-rijke regio
  + Sequenties bepalen transport
* Soms eiwit verhindert om in of uit de kern te geraken = gereguleerde maskering:
  + Bij fosfolyratie: eiwit gefosforyleerd is in nabijheid van het signaal
  + Verankering: eiwit geïmmobiliseerd door binding aan cytoplasmatische structuren
  + Afscherming: signaal afgeschermd door ander eiwit
* Interactie ppt:
  + De immuunsuppresor cyclosporine A
    - = rechtstreekse inhibitor van calcineurine (Ca2+)
    - Normaal verwijdert Ca2+ de fosfaatgroep die NLS vh NF-AT maskeert -> dan kan transcriptiefactor naar de kern gaan -

2.2.3 Ran gradiënt

* Ran
  + = een klein GTP-ase dat in GTP en GDP gebonden vorm voorkomt
* GTP-asen
  + = moleculaire schakelaars (GTP = guanylaat-3-fosfaat)
  + Meer Ran-GTP in de kern, meer Ran GDP in het cytoplasma
    - Meer GTP synthese in kern (GEF)
    - Meer GTP hydrolyse in cytoplasma (GAP)
    - onevenwicht is de drijvende kracht van nucleair transport !!!
  + Asymmetrische distributie van GAP en GEF
  + Drijft directioneel transport: import en export
* Proces
  + Ran GAP1
    - = Ran GTP-ase activating proteïne
    - Exclusief in cytoplasma
    - Activeert GTP door hydrolyse -> naar GDP
  + Ran GEF
    - = Ran guanine nucleotide exchange factor
    - In de celkern
    - Zorgt voor de GTP synthese
    - Bindt GTP -> dan Ran-GDP omgezet in Ran-GTP
  + Export
    - Exportine zal het te exporteren proteïne voorzien van NES + binden met een geactiveerd ran GTP asen
    - Exportine + Ran GTP + NES migreren door porie -> cytoplasma
    - In cytoplasma: GTP -> GDP door reactie met Ran-GAP1
      * Complex valt uit elkaar
      * Ran-GDP en exportine keren terug naar de kern
  + Import
    - Alfa subeenheid vh impotine/carrier herkent cargo/proteïne als deze een NLS signaal draagt
    - Bèta subeenheid herkent de anmeerplaats ter hoogte vh NPC
    - Migratie door nucleoporus -> kern
    - In kern: Ran GTPase bindt op importine -> cargo vrijgesteld
    - Bèta en alfa subeenheid + Ran GTP teruggevoerd naar cytoplasma
      * Ran GDP naar kern gerecycleerd door NTF2 (nuclear transport factor 2)
      * Dit doen ze om stroom van Ran GTP nar cytoplasma tegen te gaan

3. Het genoom

* Genoom
  + = gevormd door 2 complementaire strengen DNA
    - DNA als dubbele helix
    - DNA dient voor synthese RNA

3.1 DNA is een dubbele helix

* Griffith
  + Ontdekking genetische transformatie -> geen idee waardoor
* Chargaff
  + Ondervond dat DNA zorgde voor de genetische transformatie
  + Ondervond een consistente base compositie
    - DNA bestaat uit 4 basen: adenine, guanine, cytosine, thymine
    - Basen compositie tussen de cellen van 1 soort zijn gelijk (Chargaff’s regel)
* Watson en Crick leggen puzzelstukken samen
  + DNA
    - vormt een dubbele antiparallele rechtshandige helix
      * antiparallel: 3’-5’ en 5’-3’
    - Gebaseerd op basecomplementariteit
      * Adenine A – Thymine T
      * Guanine G – Cytosine C
* Sequentiebepaling:
  + Achtergrondinfo:
    - DNA: transcriptie (synthese RNA) -> translatie -> proteïnen
      * De sequentie van basen in een segment = sequentie AZ in eiwit
    - gen = DNA segment dat codeert voor 1 bepaald RNA of proteïne
    - genoom = hele weerslag vh DNA
  + 2 methodes
    - Restrictie-fragment mapping (vroeger)
      * Sequentie bepalen door het klieven vh DNA in kleinere fragmenten
        + Klieven dmv restrictie-enzymen
      * Dan de fragmenten + enzymen op basis van hun lengte scheiden door een agarose gel elektroforese
      * Door een groot aantal versch. restrictie enzymen te gebruiken -> klievingsmap v/e bepaalde sequentie voorkomen
    - Sanger sequencing
      * = chain termination method
      * Enkelstrengige DNA fragmenten worden gebruikt om een complementaire streng te synthetiseren
      * Dit gebeurt in aanwezigheid van fluorecente dideoxynucleotiden
        + Stoppen volgende binding prematuur door gebrek aan 3’ hydroxygroep
      * Er vormt zich een mengsel van verschillende fragmenten
        + De lengte lezen ze af via camera tijdens de elektroforese

3.2 DNA compactie

* Efficiënte opvouwing van DNA
* 1) DNA streng
* 2) Histomen
  + = Binden met DNA
  + = kleine proteinen die DNA omzetten naar chromatine vezels
  + Bekleden de volledige DNA streng
  + Balanceren dmv hun + lading de – lading vh DNA
* 3) Nucleosomen
  + Histomen vormen in combinatie met DNA nucleosomen of regelmatige complexen
    - ~ parels aan een draad = beads on a string DNA
  + Histomen vormen de kern vh nucleosoom met daarrond DNA gewikkeld
* 4) Chromatinevezel
  + Nucleosoom-kernen -> verpakt in nucleoproteïnefilamenten -> opgespilariseerd in helix vorm -> vormen de ruggengraat vd chromatinevezel
  + = de structurele eenheid van chromatinenetwerk en vd chromosomen
* 5) Lusodomeinen
  + Lussen vormen door de geregelde hechting van DNA aan een onoplosbaar netwerk van niet-histon proteïnen
* 6) Heterochromatine & Euchromatine
  + Hetero: transcriptioneel inactief DNA is nog sterker opgevouwen
  + Euchro: actief DNA is vrij los opgestapeld
* 7) Mitotische chromosomen

3.3 Tijdens celdeling condenseren chromosomen volledig

* Tijdens celdeling condenseren chromosomen volledig
  + Het DNA zal volledig compact worden -> mitotische chromosomen
* Condensatie
  + 2 zusterchromatiden verbonden aan het centromeer
    - Chromatinedraad is daar opgevouwen in reeks van lussen
    - Iedere lus verder opgevouwen
  + Bandingspatronen: V-verclustering van gelijk geplooide sequenties
  + Karyotype
    - = iedere soort heeft een bepaald aantal chromosomen met een welbepaalde morfologie
    - = geeft indicatie van menselijke afwijkingen
      * Hebben abnormaal aantal chromosomen = aneuploïdie
      * Vb: syndroom van Down: 3 ipv 2 chromosomen (Trisomie 21)
      * Vb: syndroom van Klinefelter: 2X en 1Y -> mannelijke geslachtskenmerken komen niet tot uiting
      * Vb: syndroom van Turner: 1X, geen Y -> vrouwelijke ‘’

4. Non-random kernorganisatie

* Oud beeld
  + kern is een spaghetti van chromatine met weinig structuur
* Huidig beeld
  + Kern bevat DNA en proteïnen die in nucleaire micro-domeinen zijn georganiseerd

4.1 Een nucleaire matrix

* Nucleaire matrix
  + = hypothese van vroeger
  + Experiment:
    - Door grondige nuclease en detergent behandelingen zag men dat er een onoplosbaar vezelig netwerk was nadat het meeste DNA verwijderd was hierdoor
  + Functie: behouden van kernvorm en chromatineorganisatie
  + Bevat
    - structurele proteïnes
    - DNA regio’s
      * = matrix attachment regions/ MAR’s
      * = ankerplaatsen voor chromatinevezels en nucl. Processen als transcriptie,…
  + Gecontesteerd!!

4.2 De nucleaire lamina

* Nucleaire lamina
  + = een dun netwerk van intermediaire filamenten (lamines)
  + = verankerd aan het binnenste nucleaire membraan
  + = rechtstreeks verankerd met cytoskelet via LINC complex
    - LINC = linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex
  + Functie
    - mechanische ondersteuning aan celkern
    - ankerpunt voor interacties met chromatine en transcriptiefactoren membraan geassocieerde eiwitten onder binnenste kernmembraan
  + Opgebouwd uit lamines
    - Onderverdeeld in type A en B-lamines
      * afwezigheid van type A -> kernen met afwijkende vorm en verhoogde plasticiteit (vb: kankercellen)
    - Laminopathieën
      * Waaier van zeldzame ziektes geassocieerd met mutaties in lamines
      * Uiteenlopend ziektepatroon
      * Vb: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome
        + Premature veroudering

Sterk versnelde veroudering

* + - * + Aantasting nucleaire morfologie

4.3 Chromatine niet willekeurig verspreid in de interfase

* In de interfase is DNA sterk ontvouwen -> blijft wel georganiseerd
  + Ondervinding: Individuele chromosoom bezetten discrete posities of chromosoom territorium
  + Bevestigt door moderne experimenten:
    - 1) Laser UV micro-beam 2) Multicolour FISH techniek
* Laser UV micro-beam
  + laten toe onderscheid te maken willekeurige distributie en gelokaliseerde chromosoomschikking
  + exp: veter -> alles wit & 1 regio kleuren
    - als wir war door elkaar -> alle veters geraakt -> overal wat rood
    - als ze geroganiseerd zijn in compartimenten -> 2 vd 4 rood
* Vroeger via radioactiviteit (ipv laser)
  + Eerst audiography proef
  + Bestralen met supergefocuste straal van versnelde partikels -> door de cel geschoten -> breken zeer veel DNA -> schade wordt weggenomen en vervangen door radioactief nucleotide -> cel deelt tijdens de mitose -> chromosomen bekijken -> zwarte stip = vervangen nucleotide door radioactief nucleotide
    - Zo georganiseerde domeinen terugvinden
* Multicolour FISH techniek
  + = fluorescentie in situ hybridisatie
  + = techniek waarbij een fluorescent gemerkte probe wordt gehybridiseerd met een complementair stukje doelwit DNA
  + Beperkte vermenging
  + Oriëntatie wordt behouden in de dochterkernen

4.4 Veel kernproteïnen accumuleren in nuclear bodies

* Nucleair bodies (NB’s)
  + = morfologisch en functioneel verschillende substructuren waarin sterk gecompartimentaliseerde niet-histon proteïnen zitten
  + = Proteïne compartimenten **zonder** membraan
  + Vaak geassocieerd met bepaalde nucleaire activiteiten
* Heterochromatine = weinig actief

4.5 De nucleolus is de plaats van ribosoomsynthese

* Nucleolus
  + = deel van de kern
  + De grootte correleert met de metabolische activiteiten
  + Functie
    - Ribosomale RNA synthese en assemblage van risobomale subunits
  + Bouw:
    - Fibrillaire regio/ centrum
      * Bevatten het DNA dat wordt afgeschreven in rRNA
      * Bevatten de nucleolar organizing regions (NOR’s)
        + = stukjes DNA die tot honderden tandem kopijen van rRNA genen bevatten (varenbladstructuur)
    - Granulaire regio
      * Subunit assemblage
      * rRNA wordt samen met de geïmporteerde proteïnes verpakt tot ribosomale subunits
    - Proces:
      * In 1 nucleolus: verschillende NOR’s komen samen door lus uit te vouwen -> ieder rRNA gen codeert een 45S precursor
      * Precursor splitst in 28S, 18S en 5.8S
        + 4de subunit 5S geïmporteerd vanuit nucleoplasma
      * Subunits sedimenteren in de granulaire zone tot 80S partikels
      * 80S partikels worden in de nucleolus omgezet naar 2 aparte subunits: 40S en 60S ribosomale subunit
  + Enkel waargenomen in interfase kern
    - Want de nucleolus breekt af of decondenseert tijdens de mitose
    - Op einde mitose, wanneer de cel aan G1 fase vd celcyclus begint
      * Dan wordt de nucleolus terug zichtbaar

5. Kernpunten

* Celkern bevat genetisch materiaal op gereguleerde wijze wordt afgeschreven
* Nucleaire enveloppe bestaat uit dubbele lipide laag, nucleaire lamina en nucleaire poriecomplexen
* Bidirectioneel transport tussen kern en cytoplasma gebeurt via nucleaire poriën en berust op aanwezigheid signaalsequenties, karyoferines en een Ran gradiënt
* De nucleaire lamina geeft kern vorm en sterkte
* DNA met behulp van histonen opgevouwen tot elementaire chromatinevezels (30nm)
* Transcriptioneel inactief DNA is sterk opgevouwen in heterochromatine, terwijl actief DNA los gestapeld is in euchromatine
* Tijdens de mitose condenseren de chromosomen maximaal
* Karakteristieke set chromosomen van een organisme wordt het karyotype genoemd
* Interfase kern is sterk georganiseerd, met het DNA in specifieke chromosoomterritoria en de meeste nucleaire, niet-histon eiwitten in nucleaire lichaampjes, vaak rond genoomregio’s
* Ribosomale subunits worden gesynthetiseerd in de nucleolus
* PML bodies zijn versatiele stress sensoren