**CELBIOLOGIE HOOFDSTUK 17: De celcyclus**

1. Introductie

* Celgroei zal afwisselen met celdeling waarbij 1 cel aanleiding geeft tot 2 dochtercellen
  + Genetische informatie vd moedercel moet gedupliceerd worden en gelijk verdeeld worden
* Ontwikkeling van een organisme is een evenwicht tussen celdeling of mitose en celvermindering of apoptose
  + Dit evenwicht tussen apoptose en mitose = weefselhomeostase

2. De celcyclus

* Cellen groeien, verdubbelen hun inhoud en delen in een cyclus
* Celcyclus
  + Begint bij deling van een moedercel in 2 dochtercellen
    - Eindigt als een van deze dochtercellen terug deelt
  + Bestaat uit 2 grote processen
    - S-fase
      * DNA replicatie
      * = synthese fase
    - M-fase
      * Mitose = kerndeling
      * Cytokinese = celdeling/ cytoplasmatische deling
  + Processen gescheiden door 2 groeifases (gap phases)
    - G1 fase
      * = tussen M-fase en S-fase
    - G2 fase
      * = tussen S-fase en M-fase

3. DNA replicatie

3.1 DNA replicatie is semi-conservatief

* Semi-conservatief
  + = in ieder dubbelstrengig DNA is 1 streng afkomstig van de oudermolecule en de 2de streng nieuw gesynthetiseerd
  + = de helft van de oudermolecule is bewaard in de dochtermolecule
* DNA-replicatie
  + Meerdere replicons
    - = replicatie-eenheden in een DNA molecule
  + Replicatieoorsprong of ORC
    - = centrum van een replicon
    - DNA streng wordt hier uit elkaar gehaald -> replicatievork -> DNA synthese
    - DNA synthese gebeurt op meerdere ORC
      * Voordeel: snelheid
  + Replicatievork
    - Aan ORC
    - Hier gebeurt de DNA synthese
      * Bubbelvorming
      * Bidirectionele synthese
        + 5’ -> 3’
        + Als replicatiebubbel ene streng komt bubbel andere streng tegen

Het nieuw gesynthetiseerde materiaal zal gekoppeld worden

Vorming van moederstreng en nieuwe streng

* + - Continue/Discontinu stuk
      * DNA polymerase
        + = enzym dat DNA synthetiseert door verlenging van de nucleotideketen
        + Synthetiseert DNA enkel in 5’-> 3’ richting
      * Probleem: 2 ketens DNA verlopen in tegenovergestelde richting
      * Oplossing:
        + Continue synthese

Leading strand: 5’ -> 3’

* + - * + Discontinue synthese

Vorming Okazaki fragmenten

= samen de lagging strand

Gebeurt apart in 5’-3’

Lagging strand: 3’-> 5’

DNA ligase verbindt de fragmenten -> keten

* Stappen DNA replicatie:
  + 1) Lokale ontwinding van de dubbele helix -> vorming replicatievorken
    - DNA helicasen
      * Door ATP hydrolyse verbreken ze de waterstofbruggen tussen de complementaire basen
    - Topoisomerasen/ Gyrase
      * Maken kleine enkel of dubbelstrengige breuken in dubbele helix die ze snel herstellen (om supercoiling/overontwinding te voorkomen)
    - Enkelstrengige DNA bindende eiwitten (ssDNA)
      * Hechten zich vast op enkele strengen -> ontwonden houden
      * Na replicatie vallen deze proteïnen er terug af
  + 2) Vorming van RNA primers
    - Primase synthetiseert RNA primers op enkelvoudige DNA sjabloon
    - Koppeling van deoxyribonucleotiden aan het 3’ uiteinde van de Primer door DNA polymerase III
      * Bij leading strand:
        + 1 primer op de replicatievork, waarna het DNA polymerase een continue keten kan vormen in 5’-> 3’
      * Bij Lagging strand:
        + ieder Okazaki fragment heeft een primer
        + aan elke primer zet DNA polymerase nucleotiden tot het het volgende Okazaki fragment ontmoet -> dan RNA primer verwijderen door 5’->3’ exonuclease
        + koppeling fragmenten door ligase
    - Opm: fout ingebouwde nucleotiden worden rechtgezet door proofreading
      * = 3’->5’ exonuclease activiteit
* Het eindreplicatieprobleem: Telomeren
  + Voor lineaire DNA moleculen
    - DNA polymerase voegt telkens aan 3’OH einde nieuwe nucleotiden toe
    - Probleem:
      * Lagging strand komt aan het einde van de DNA keten -> laatste RNA primer wordt verwijderd door 5’-> 3’ exonuclease
      * 3’ eindstandige primer kan niet aangevuld worden omdat er geen 3’ OH einde is waar nucleotiden kunnen worden toegevoegd
    - Gevolg:
      * Per replicatie treedt een verkorting op -> informatie verliezen
    - Oplossing:
      * Telomeren plaatsen op het einde van iedere lineaire DNA keten
  + Telomeren
    - = repetitieve DNA sequenties (TTAGGG) -> niet coderend
    - = moleculaire veters
    - Functie
      * Zorgen voor bescherming tegen erosie coderende sequenties
        + Voorkomen het verlies van informatie bij verkorting
    - Beschermd door telomere capping proteïns die binden aan DNA 3’einde
  + Telomerase
    - = DNA polymerase
    - = vormt telomeren na iedere verkorting -> terug verlenging
    - Aanwezigheid: stabiliseert de telomeren in stamcellen en kankercellen
      * Cellen delen oneindig zonder verkorting van telomeren
    - Afwezigheid: telomeren verkorten met iedere celdeling
      * Telomeren eroderen -> kans op verlies informatie
      * Oplossing: senescentie/celdoodpathway
        + Telomeren te kort om te binden aan capping proteïne -> herkand als DNA breuk -> celcyclus arrest en celdood (apoptose)
* 3 handicaps
  + Bidirectionel
  + Startpunt heeft een Primer nodig
  + Koppeling fragmenten dmv ligase

4. Mitose

4.1 Kerndeling of mitose

* Interfase
  + Chromosoomduplicatie
  + Centrosoomduplicatie
* Profase
  + Gedupliceerde chromosomen condenseren
    - Chromosoom: 2 chromatiden + centromeer
  + Vorming spoelfiguur
    - MT worden afgebroken en gereorganiseerd tot spoelfiguur
  + Gedupliceerd centrosoom splitst
    - Vormt 2 polen
* Prometafase
  + Kernwand/ NE verdwijnt
    - Valt uiteen in kleine vesikels
  + 3 MT associaties
    - KinetochoorMT hechten zich aan centromeren vd chromosomen
      * duwen chromosomen in evenaarsvlak
      * Kinetochoor = hechting spoeldraad aan chromatiden
    - Interpolaire MT
      * Associëren met MT van de tegenovergestelde polen
    - Astrale MT
      * Stralen vanuit de polen alle richtingen uit
* Metafase
  + Chromatiden schikken zich in evenaarsvlak halverwege de 2 polen
* Anafase
  + Scheiden vd chromatiden ter hoogte vd centromeren + beweging chromatiden naar tegenovergestelde polen
  + Anafase A
    - Chromosomen, met centromeer op kop, worden naar polen getrokken
    - De kinetochoorMT verkorten
  + Anafase B
    - Polen zelf uit elkaar door verlenging interpolaire MT
  + Beweging bepaald door motorproteïnen
    - Anafase A
      * **Kinesine 13**: catastrophe factor
        + Één aan + en één aan – einde vh **kinetochoorMT**
        + Beide induceren MT **verkorting** aan + uiteinde en aan – uiteinde
        + Hierdoor wordt chromatide naar de pool getrokken
    - Anafase B
      * **Kinesine 5**
        + Op de overlap regio vd **interpolaire MT**
        + **Schuiven (sliding)** de MT uiteen (naar het – uiteinde)

& de MT verlengen aan de + kant

* + - * + Hierdoor gaan de polen uiteen
      * **Dyneïne** 
        + Verankerd aan de celcortex op **astrale MT**
        + **Trekkracht** aan de astrale MT
        + Hierdoor gaan de polen naar het plasmamembraan
* Telofase
  + De gescheiden dochterchromatiden komen bij de polen
  + De kinetochoormicrotubili verdwijnen
  + Kernwand vormt zich opnieuw rond dochterchromosoom
  + Nucleoli verschijnen terug
  + Spoelfiguur verdwijnt

5. Cytokinese

* Cytokinese
  + = eigenlijke celdeling
* Dierlijke cellen
  + In late anafase
  + Contractie cytoplasma -> vorming van een groeve
    - Groeve bevat nog interpolaire MT
  + Klieving door contractie van een ring die bestaat uit actine en myosine
* Plantaardige cellen
  + Opbouw nieuwe celwand in de delende cel
  + Opbouw door stapeling van vesikels in evenaarsvlak -> versmelten -> vormen celplaat
    - Celplaat = fragmoplast

6. Celcyclus regulering

* Celcyclus
  + G1, S,G2, M-fase
    - In G1 fase: beslissing verder delen of niet -> G0
    - G0 is een tijdelijke of permanente rustfase
      * Tijdelijk: wachten op signaal om verder te gaan in celcyclus
      * Permanent: gaan nooit meer delen -> gaan uit celcyclus

6.1 Lengte van celcyclus

* Veel variatie naargelang de nutriënten, plaats,…
* Lengte meten aan de hand van:
  + Pulse chase labeling
    - Bepalen van de lengte van de S-fase
    - Radioactief: Cellen voor een korte tijde blootstellen aan radioactief gelabelde nucleotiden gevolgd door autoradiografisch onderzoek
      * Celfractie aan zilverkorrels ter hoogte vd kernen = fractie die in de S-fase zat wanneer radioactief label werd toegediend
      * Deze fractie x de generatietijd = gemiddelde duur vd s-fase
    - Fluorescent: nucleotide analogen gedetecteerd met immunocytochemie
      * Vroege S: stipjes = euchromatine
      * Midden S: midden
      * Late S: randen = heterochromatine
  + Flow cyclometrie
    - Geeft een direct beeld van de duur vd celcyclus fasen
    - Kleurt de cellen met een DNA bindende kleurstof
      * Cellen door microkanaal sturen dat belicht wordt door laser
        + Hoeveelheid fluorescent licht meten = concentratie aan DNA

Zo de samenhangende celcyclusfase bepalen

* + - * + Hoeveelheid ~ tijd

Zo de lengte vd cyclus bepalen

* + - Grafiek
      * G1: 2n DNA
      * G2: 4n DNA (dubbele hoeveelheid -> daarom G2, want na S-fase)
      * Tijd ~ de hoeveelheid
        + 70% bevindt zich in G1 -> G1 zal 70% vd tijd in beslag nemen
        + 30% bevindt zich in G2 -> G2 zal 30% vd tijd in beslag nemen
      * Kleiner bultje
        + = signaal dat cellen aan het sterven zijn = apoptose, DNA is verloren
      * Afwijkend bultje
        + = cellen die abnormaal zijn vb: kankercellen = extra DNA

6.2 Celcyclus en sleutel transitiepunten

* 3 belangrijke checkpoints/ transitiepunten in de celcyclus
* Late G1-fase = restrictiepunt
  + = voldoende materiaal?
  + Passeren is afhankelijk van groeifactoren,….
    - Als niet passeren -> G0 fase
* Grens G2-fase en M-fase
  + DNA verdubbeld en geen schade?
* Grens Metafase en anafase
  + Chromosomen gehecht?
    - Zoja dan chromatiden uit elkaar trekken

6.3 Celcyclus gereguleerd door cycline afhankelijke kinases

* Celcyclus voortgang aangedreven door cycline afhankelijke kinasen
* Cdk’s
  + = cycline afhankelijke kinase
  + = vertonen activiteit wanneer ze gebonden zijn aan cycline
    - Vormen een Cdk-cycline complex
    - Inactief zonder cycline
* Cycline
  + = proteïnen waarvan de concentratie gedurende de celcyclus op en neer gaat
  + G1/S cyclines
    - = nodig voor passeren vh restrictiepunt
  + S-cyclines
    - = nodig voor de DNA replicatie op gang te brengen
  + Mitotische M cycline
    - = nodig voor de G2-M transitie

6.3.1 M CDK-cycline activatie

* Grafiek
  + M Cdk cycline pas actief in late G2 fase
  + In M fase zal het M cycline abrupt afbreken zodat het 2de mitose voorkomt
* Activatie door:
  + Aanwezigheid van M cycline
  + Fosforylatie en defosforylatie van de Cdk molecule
    - 1) binding cycline aan M Cdk -> inactief complex
    - 2) inhiberende kinasen fosforyleren de Cdk moleculen op 2 plaatsen die de activerende site blokkeren
    - 3) activerend kinase voegt de activerende fosfaatgroep toe
      * Door wegnemen van inhiberende fosfaatgroepen door fosfatase
* Activiteit:
  + M Cdk cycline speekt een rol in de mitose
    - zal 4 targets fosforyleren
  + G2-M fase
    - Afbraak van de kernlamina/ NE
      * Door fosforylatie van **lamines**
      * Door fosforylatie van integrale proteïnen
    - Condensatie van de chromosomen
      * Door fosforylatie van **condensines**
    - Vorming spoelfiguur
      * Door fosforylatie van **MAPs (Mt associated proteins)**
  + Anafase/Metafase
    - Scheiden van zusterchromatiden
      * Door fosforylatie van het **APC** (Anafase promoting complex)

6.3.2 Anafase promoting complex/ APC

* **APC**
  + Wordt gefosforyleert door M Cdk-cycline complex
  + = complex dat verschillende **sleutelproteïnen** **afbreekt**
    - APC werkt als een ubiquitinte ligase
      * Zal de afbrekende proteïnen voorzien van een kiss of death onder de vorm van een polyubiquitine staart
      * Staart herkent door proteasoom -> Afgebroken door proteasoom (moleculaire versnipperaar in cytoplasma)
  + Voorbeeld
    - Securine
      * = proteïne dat de scheiding van de zusterchromatiden
    - Cohesine
      * = proteïne dat de zusterchromatiden bij elkaar houdt
    - Proces
      * Securine zal separase inhiberen waardoor die de adhesie tussen de zusterchromatine verzekert
      * Anafase: APC zal securine targeten -> ubiquitine tag -> afbreken
      * Hierdoor zal separase actief worden
        + Separase zal cohesine afbreken
      * de zusterchromatiden zullen scheiden van elkaar
  + = complex dat verantwoordelijk is voor de **afbraak van de M cyclines**
    - M Cdk inactief
    - Gevolg: Activatie van cytokinese, verschijnen kernmembraan, chromosoomdecondensatie

6.4 Overzicht celcyclus regulatie

* Interne regulatie
  + Algemeen
    - De 3 transitiepunten (G1/S, G2/M, anafase/metafase) worden getriggerd door Cdk-cycline complexen
      * Cdk cycline complexen fosforyleren targets -> voortgang celcyclus
  + G1/S
    - G1 Cdk-cycline
      * Brengt de cel over het 1 ste **restrictiepunt**
      * Fosforyleert Rb-proteïne -> E2F bevrijdt -> induceert replicatiefactoren en S cyclines
      * Rb = inhibitor die de transcriptiefactor E2F blokkeert
    - S Cdk cycline
      * Als genoeg S cyclines -> dan S Cdk cycline
      * Zetten de replicatie op gang door fosforylatie van de pre-replicatieve complexen (licensing)
  + G2/M
    - M Cdk cycline
      * Fosforyleren lamine, condensine, MAPS voor
        + afbraak vd kenmembraan
        + condensering chromosomen
        + spoelfiguur vorming
  + Anafase/Metafase
    - M Cdk cycline
      * Fosforylering ACP dat zorgt voor
        + de scheiding van de zusterchromosome
        + de afbraak van M cyclines
* Externe regulatie
  + Omgeving heeft ook een invloed op de celcyclus
  + Groeifactoren (+)
    - Als afwezig: celcyclus blokkeert
    - Als aanwezig
      * Stimuleert de celcyclus
      * 1) Groeifactoren binden op membraanreceptoren
      * 2) Signaaltransductie (RAS of MAP kinase pathway)
      * 3) induceert een fosforylatie van het Rb proteïne
      * 4) vrijkomen EF2 -> DNA replicatie kan starten
        + G1/S transitie wordt gestimuleerd
    - DNA schade (-)
      * Celcyclus blokkeert
      * 1) Checkpoints 1 en 2 (DNA schade gevoelig) geactiveerd
      * 2) Fosforylatie van p53
      * 3) p53 activeert p21 -> Rb fosforylatie geblokkeerd -> celcyclus stopt
      * 4) p53 activeert Puma -> activeert de apoptose pathway
        + Als DNA schade onherstelbaar is
        + P53

= moleculair stoplicht dat cellen tegenhoudt om met beschadigd DNA te delen = guardian of the genome

7. Apoptose

* Tijdens de groei -> zware beschadiging of mutatie
  + Dan zal de cel afsterven

7.1 Het apoptose proces

* Necrose
  + Ongecontroleerde celdood
  + =Cellen zwellen op en spatten uit elkaar
    - hierbij komen celcomponenten vrij intracelullaire
    - gevolg: ontstekingsreactie
  + =Ontstekingsreactie
* Apoptose
  + Gecontroleerde celdood/ Gereguleerd ontmantelinsgproces
    - Stapsgewijze ontmanteling zonder vrijstelling van componenten
  + Beschermt de naburige cellen
  + Mainstream bij ontwikkeling en immuunrespons
  + Proces
    - 1) Cellen krimpen
    - 2) Fosfatidylserine
      * Gezonde cellen: aan de binnenkant
      * Stervende cellen: door inactivatie vd fosfolipide translocator flippase -> flip flop -> buitenzijde
        + Functie: eat me signaal voor macrofagen
    - 3) DNA condenseert en fragmenteert door een DNAse
      * Kern degradeerd
    - 4) cel en celmembraan vallen uit elkaar -> vormen membraanblaasjes
      * Apoptotic bodies
    - 5) door fagocytose wordt alles opgeruimt

7.2 Apoptose regulatie

* Sleutelmoment in apoptose is de activatie van cysteïne aspartaat proteasen = caspasen
* Caspasen
  + = zorgen voor de proteïnedegradatie
  + Meestal aanwezig als inactieve precursors of procaspasen
    - Activeren elkaar in een kettingreactie van activatie = caspase cascade -
  + 3 types: Uitvoerende, initiatior en inflammatoire caspasen
* Extrinsieke apoptose pathway
  + Als celdoodsignaal ontvangen vb: tumor necrosis factor (TNF) of CD95/ FAS
    - CD95/FAS zet zich op membraanoppervlak cel met extracellulair death receptor en cytoplamatisch death domein
    - FAS ligand aanwezig
      * CD95 aggregeert en rekruteert procaspasen
      * Vorming van een death inducin signaling complex (DISC)
        + Dimerisatie van procaspasen in DISC zorgt activatie van de caspase cascade
* Intrinsieke apoptose pathway
  + = mitochondriale weg
  + Membraan vh mitochondriën bevat Bcl-2 eiwitten
    - = eiwitten die de integriteit vh buitenste mitochondriale membraan bewaren
    - wegvallen Bcl -> porievorming -> cytochroom c vrijgesteld
  + cytochroom c
    - Stelt calcium vrij uit ER -> mitochondrium bevorderen
    - Bindt op Apaf1 dat samen met procaspasen in multiproteïnecomplex assembleert = apoptosoom
      * Activiteit cascade caspase door proteolyse van de procaspasen

8. Kernpunten

* De celcyclus bestaat uit DNA replicatie en celdeling, gescheiden door twee groeifasen
* DNA replicatie initieert op verschillende replicons en is semiconservatief: continue synthese op de leading strand en Okazaki fragmenten op de lagging strand
* Telomeren zijn repetitieve sequenties die als buffer dienen voor de incomplete replicatie van lineaire chromosomen. In mortale cellen eroderen ze met elke deling, maar ze worden gestabiliseerd door telomerase in stam- en kankercellen
* Mitose wordt georchestreerd door een bipolaire spoelfiguur van microtubuli. Motor proteïnes sturen hierbij de beweging van chromosomen en microtubuli
* De lengte van de celcyclus fasen kan accuraat bepaald worden met behulp van pulse labeling of flow cytometrie.
* De celcyclus wordt nauwgezet gereguleerd door externe en interne factoren via cycline-afhankelijke kinasen en er bestaan verschillende transitiepunten
* Apoptose is een vorm van gereguleerde cellulaire zelfmoord. Een caspasecascade zorgt voor gerichte proteïnedegradatie. Er bestaat een intrinsieke (mitochondriale/apoptosoom) en een extrinsieke (receptor-gemedieerde/DISC) pathway.