

Notater fra celle- og molekylærbiologi

Cellemol er et hyggelig fag til tross for de litt skumle 15 studiepoengene. Det er veldig tydelig hva du skal kunne til eksamen, og «Biology: a global approach» av Campbell går gjennom pensum på en veldig strukturert og forståelig måte. I 2016 var forelesningene mer eller mindre «powerpointkaraoke», dvs. at de fleste foreleserne leste direkte av powerpoint, som igjen var hentet direkte fra boken. De er allikevel flinke forskere hele gjengen, så still spørsmål og bruk dem godt.

Ellers er cellemol et ganske figur-tungt fag, og hvis du vil ha en god karakter forventes det at du skal kunne tegne opp og navnsette steg i fotosyntese, glykolyse, krebs, replikasjon etc (i hvert fall i 2016). Dette kan virke litt skummelt/uoverkommelig, men det tar det helt seriøst bare én- til to timer å pugge hver prosess relativt godt. Bruk tegninger til å huske steg bedre (tegn for eksempel en sigg ved siden av røyksyre/fumarsyre), så vil du huske ting mye raskere enn du tror :)

Jeg var ikke sånn superfan av dette faget, men kanskje notatene kan komme til nytte allikevel! Jeg tar ikke ansvar for faglige feil eller mangler, du er stor gutt/jente nå og finner ut av dette selv :* Masse lykke til med semesteret og eksamen!

Xoxo Filip Sarfi

I do not claim ownership of any of the images used. Images are gathered from or modified from:

Campbell, N, Reece, J, Urry, L, Cain, M, Wasserman, S, Minorsky, P, et al. (2015) Biology: a global approach. 10th ed. Pearson; England.

Kapittel 6: Energi og liv

Metabolisme: Den totale mengden av en organismes kjemiske reaksjoner. Grunnleggende egenskap av liv!

- Metabolsk spor (pathway): En serie reaksjoner med et enzym i hver reaksjon som ender i et bestemt produkt med mellomprodukter i midten.
 - **Katabolske spor:** Frigjør energi ved å bryte ned komplekse molekyler til enkle (eks respirasjon)
 - **Anabolske spor:** Bruker energi til å bygge komplekse molekyler. Kalles også biosyntetisk spor. Eks: Konstruksjon av aminosyrer av sukker
- **Bioenergetics:** Studien av hvordan energi flyter gjennom levende organismer
- Energien fra katabolske brukes til å drive anabolske reaksjoner
- Organismer er åpne systemer

Bruk av energi til å senke entropien til et system fører til en økning i universets entropi allikevel! Dette er fordi det gjerne kreves varme for å gjøre det og det brytes generelt ned mer enn det produseres kompliserte molekyler.

En organisme både øker og senker entropi:

- Tar enkle molekyler og danner mye mer kompliserte strukturer av dem (vann og oksygen til aminosyrer etc)
- Men: Tar kompliserte strukturer fra naturen (for eksempel aminosyrer, stivelse) og bryter de ned til enkle molekyler i respirasjonen (CO₂)
- **Organismer er «øyer» av lav entropi i et mer og mer tilfeldig univers**
 - Totalt sett øker entropien i universet, derfor brytes ikke den andre termodynamikkloven
- **Første termodynamikklov:** Energi kan ikke skapes eller ødelegges, bare omdannes.
- **Andre termodynamikklov:** Overføring og omdanning av energi øker entropien i universet som en generell trend, til tross for lokal orden.
 - En prosess er bare spontan og kan utføre arbeid når den går mot likevekt!

Metabolisme i sammenheng med biologiske funksjoner

Fri energi kan anses som et mål på et system sin evne til å endre seg mot en mer stabil tilstand. Stor fri energi betyr ustabil system.

- **Exergon reaksjon** er spontan og mister «fri» energi, ΔG er negativ
- **Endergon reaksjon** er ikke spontan og binder «fri» energi, ΔG er positiv
 - STOR FORSKJELL: DISSE GÅR PÅ GIBBS FRI ENERGI, IKKE ENDRING I ENTALPI!
 - Her sier det litt seg selv at en reversibel prosess er exer- og endergon i hver sin retning med samme ΔG -verdi. Jo større ΔG , jo mer energi lagres/frigjøres

- Metabolisme når aldri likevekt, en celle i likevekt er død!
 - Dette er fordi det konstant føres materialer inn og ut av cellen – produkter av en celle er reaktanter for en annen eller avfallstoff!
 - En egenskap av liv er at metabolismen ikke er i likevekt
- Kombinasjonen sukker og oksygen har veldig mye høyere fri energi enn vann og karbondioksid – dette driver alle reaksjonene

En celle gjør tre hovedtyper arbeid:

- **Kjemisk:** Dytter endergone reaksjoner, som ikke vanligvis går spontant
- **Transport:** Pumper substanser gjennom membraner i «feil» retning
- **Mekanisk:** Sammentrekninger, kromosombevegelse i reproduksjon etc.

Energikobling: Bruken av energien fra en eksergon reaksjon til å drive en endergon. ATP brukes som «standard» energikilde og til å koble dem.

ATP: Ribose, adenin og tre fosfatgrupper (funksjonell gruppe).

- Båndene mellom fosfatgruppene kan brytes med **hydrolyse** til ADP og HOPO_3^{2-}
 - Ekstra effektivt energiutbytte i cellen enn i «standardtilstander».
- Energien i ATP er ikke fordi det er mye energi lagret i molekylet, men fordi forskjellen i energi mellom reaktantene og produktene er stor
- Fosfatgruppene er negativt ladet og søker bort fra hverandre (men er sammenpresset): Dette gjør at de er en «**sammenpresset fjær**»!

Hydrolysen av en fosfatgruppe brukes til å drive alle de tre hovedtypene arbeid:

- **Kjemisk:** Evis en endoterm/endergon reaksjon krever mindre energi enn det som slippes ut ved hydrolysen av ATP kan man «koble» reaksjonene slik at den totalt sett er eksergon!
 - Involverer fosforylering med kovalent binding. Dette skaper et **fosforylert intermedier**. Den er mer ustabil = mer **reaktiv**
 - Eksempel: Glutamin dannet av glutamisk syre og ammoniakk er vanligvis ikke-spontan. ATP fosforylerer glutamisk syre til et mellomstoff, som er svært ustabil. Ammoniakk tar plassen til den uorganiske fosforet. Energien fra ATP-hydrolysen er større enn det som kreves = spontan prosess.
- **Transport:** Et protein endrer form i for eksempel cellemembranen når en fosfatgruppe settes på. De kan også miste/få evnen til å binde andre stoffer.
- **Mekanisk:** Motorproteiner bindes med ATP, som hydrolyseres til ADP og P. Da endrer motorproteinet form, og en ny ATP kan settes på. Da «går» proteinet bortover. Fosforylering og defosforylering styrer også mange andre proteiner.
 - **Kinesin** på cytoskjelettet er et eksempel på dette. De transporterer **vesikler** mens de «går» på cytoskjelettet.

ATP-syklusen: ATP er gjenvinnbart fra ADP og en fosfatgruppe (fosforylering). Energien til å gjøre dette kommer fra katabolismen. Hvis dette ikke kunne ha blitt gjort ville vi mistet store mengder kroppsvekt på å danne nye ATP-molekyler. Svært rask prosess!

Enzymer er katalyserende proteiner som senker E_a , aktiveringsenergien. De påvirker ikke endring i fri energi, men gjør at reaksjonen krever mindre energi for å gå. **Sukrase** katalyserer nedbrytningen/hydrolyseringen av sukrose til glukose og fruktose.

- Aktiveringsenergi nås ofte i form av varme: Molekylene kolliderer oftere og atomene beveger mer på seg. Dette gir mer ustabile bindinger som kalles **overgangsfaser**.
- Det fleste komplekse molekyler som er relevante her har mye fri energi, men brytes ikke ned fordi de ikke kommer over aktiveringsenergien
 - Mer varme funker dårlig, det er tross alt en celle
 - Løsning: Senke aktiveringsenergien i stedet
- Reaktanten enzymet virker på er **substratet**
- Enzymet bindes til substratet og danner et **enzym-substrat kompleks**
- De fleste enzymer er **spesifikke**, de kan bare katalysere en eller noen få beslektede reaksjoner.
- **Aktivt sete**: Regionen på enzymet der substratet bindes. Spesifikt for beslektede substrater!
 - Setet består ofte bare av noen få aminosyrer – resten gir struktur til enzymet

Enzymer er ikke «faste», men myke. Forskning viser at de fluktuerer mellom litt forskjellige former som alle har noen forskjeller i fri energi. Formen substratet passer i har ikke nødvendigvis lavest energi.

- **Induced fit**: Ved plassering foregår det reaksjoner som endrer enzymets form slik at den «kroker» seg rundt substratet og får det til å passe **enda** bedre.
- Substratene holdes på plass av **svake** bindinger.
- Kan ofte katalysere i begge retninger, alt etter hvilken vei som går mot likevekt.

Enzymreaksjoner binder substratet til det aktive setet. Setet senker E_a ved å

- Orienterer substratene korrekt
- Putte spenning på noen bindinger (strekke dem strukturelt) slik at binding går enklere – dette senker E_a
- Skape et mikromiljø i den lukkede «lommen» (for eksempel lavere pH) slik at reaksjonen går enklere
- Substratet binde seg kovalent til enzymet for å «bruke» en del av enzymet – denne delen regenereres.

Enzymaktivitet kan bli påvirket av miljøfaktorer som temperatur og pH. De vil allikevel nå et punkt der de ikke kan jobbe fortere – da er de **«mettet»**.

- Optimale forhold favoriserer den mest aktive formen av enzymmolekylet.

Kofaktorer er ikke-protein enzymhjelpere som kan være både uorganiske (sink, jern, kopper etc) eller organiske (vitaminer).

- Noen henger på permanent, mens andre er midlertidige.
- En organisk kofaktor kalles for et **koenzym**.

Inhibitorer hemmer enzymaktivitet. Noen binder seg kovalent til enzymet, som gjør det irreversibelt. Andre binder seg derimot med svake bindinger:

- **Kompetitive inhibitorer** likner på substratet og binder seg til det aktive setet til et enzym og blokkerer det. Ved å **øke** mengden enzym kan man omgå dette.
- **Ikke-kompetitive inhibitorer** binder seg til en annen del av enzymet, som fører enzymet til å endre form slik at det aktive setet er mindre effektivt.

Evolusjonen av enzymer er et resultat av mutasjoner, som alt annet. En mutasjon i genet som produserer en av aminosyrene i et bestemt protein kan ha ført til at proteinet ble mer effektivt som resultat av den nye aminosyren. Dette er spesielt hvis aminosyren sitter i det aktive setet, eller hvis proteinet fikk en favoriserbar struktur. Forsøk med E.coli har vist at ved å endre miljøforholdene og introdusere mutasjoner ble det endringer i produksjon av hele 6 aminosyrer i et enzym.

Celler kan justere enzymaktiviteten på gennivå gjennom å skru av forskjellige gener eller de kan gjøre det på proteinnivå - **Allosterisk regulering**.

- De fleste enzymene som reguleres på denne måten har gjerne to eller fire subenheter, de er **tetrameriske**
- Komplekset oscillerer mellom en katalytisk aktiv og inaktiv form – tilstedeværelsen av et molekyl i det **allosteriske setet** (ofte på grensen mellom to subenheter) stabiliserer enten den aktive delen (**aktivator**) eller den inaktive (**inhibitor**).
 - Komplekset er konstruert slik en endring «forplanter» seg og alle setene lukkes.
 - ATP og ADP betyr mye for inhiberingen og aktiveringen av enzymer som styrer metabolismen. For mye av den ene/andre styrer reaksjonen i motsatt retning!

Kooperativ regulering: Et substrat som binder seg til et av de **aktive setene** i et flerenhetsenzym skaper formendring i alle subenhetene på enzymet. Dette øker responsen til enzymet når substrater introduseres!

- Hemoglobin (ikke et enzym) er et eksempel. Det kan binde to oksygenmolekyler, og ved tilstedeværelse av ett vil det lettere binde det andre.
- I vev med lite oksygen vil hvert slipp av oksygen gjøre at det andre slippes enklere.

Tilbakemeldingsinhibisjon er en vanlig metabolsk kontrollmekanisme. Jo mer som dannes av et sluttprodukt, jo flere enzymer vil inhiberes. ADP som hindrer produksjon av ATP er et eksempel på dette.

Enzymenes plassering er ikke tilfeldig spredt rundt i cellen. Noen finner du i egne strukturer med et eget kjemisk miljø som bidrar at reaksjonene separeres. Her kan noen reaksjoner skje før de føres ut av strukturen. **Mitokondriene** er hjemmet til alle enzymene som har med respirasjon å gjøre, og de har igjen egne plasser inni mitokondrien.

Kapittel 5: Struktur og funksjon av store biologiske molekyler

Alt levende er bygd opp av fire ekstremt viktige klasser store biologiske molekyler:

Karbohydrater, lipider, proteiner og nukleinsyrer - **makromolekyler**

- **Makromolekyler** er store molekyler sammensatt av tusenvis av atomer forbundet med kovalente bindinger
- Molekylær struktur og funksjon er ikke mulig å skille

Karbohydrater, proteiner og nukleinsyrer er **polymerer** – kjedeformede molekyler bygget av like eller liknende **monomerer** som perler på en snor. Hver klasse polymer er bygget opp av forskjellige typer monomerer.

Syntese og nedbrytning av polymerer:

- **Dehydreringsreaksjon** setter sammen monomerer ved hjelp av **enzymer**:
 - Vann går ut (en monomer bidrar med -H og den andre med -OH) og en kovalent binding dannes
- **Hydrolyse** er den motsatte reaksjonen.

Diversitet av polymerer:

- Enhver celle har tusenvis av forskjellige molekyler som består av forskjellige monomerer avhengig av stoffklasse
- Det er variasjon i både mellom søsken, mellom ubeslektede og mellom arter.
- Monomerer kan arrangeres på enormt mange forskjellige måter – grunnlag for latterlig mange makromolekyler.

Karbohydrater

Karbohydrater er både enkelt sukker (monosakkarider) og komplekse polysakkarider. De er «drivstoff» og byggemateriale. De trenger ikke smake søtt!

Monosakkarider har formler som er multiplikater av **CH₂O**.

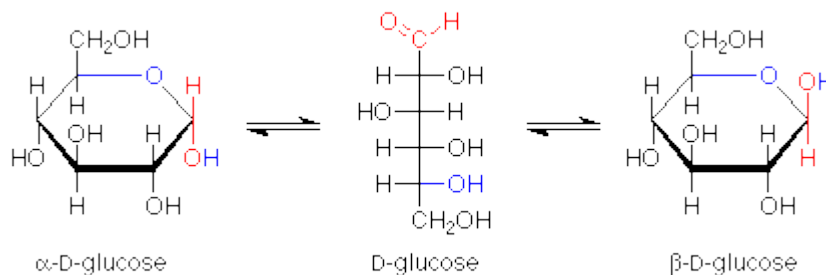
- Kjennetegnes av **karbonylgruppen** (CO dobbeltbinding) og mange **hydroksylgrupper**
- Karbonylgruppens plassering bestemmer om det er en:
 - **Aldose** (aldehydsukker): Dobbeltbindingen sitter ytterst slik at det blir et aldehyd
 - **Ketose** (ketonsukker): Dobbeltbindingen sitter lenger inn så det blir et keton
- **Karbonskjelettet** er 3-7 atomer langt.
 - 6 atomer = Hexose, 5 = pentose, 3 = triose
- Asymmetriske karboner gir forskjellige sukker fordi de gjerne antar **ringform**
 - Glukose og galaktose differensierer bare i OH-plasseringen: Opp eller ned.

De fleste fem- og sekskarbon monosakkaridene danner **ringer** i vann. Da er det vanlig at det ikke blir fullstendig, men får en «hank» i form av CH₂OH. Monosakkarider er viktige energikilder for celler og råvarer til andre molekyler. Disse brytes ned i metabolismen.

Disakkarider dannes i dehydreringsreaksjoner og består av to monosakkarider bundet av en kovalent **glykosidisk binding**. Et eksempel er hvordan en glykosidisk binding mellom glukose og fruktose danner **sukrose**, bordsukker.

Polysakkarider er makromolekyler med hundre til noen tusen monosakkarider i lenke. De brukes til både **lagring** (må brytes ned) og **strukturer** i celle/organisme. Struktur og funksjon bestemmes av hvilke monomerer som brukes og hvor de glykosidiske bindingene sitter.

- **Lagringspolysakkarider** brukes av både av planter og dyr til å lagre sukker til senere bruk.
 - **Stivelse** består utelukkende av glukosemonomerer som planter bruker til å lagre energi. De lagres i **granula** cellens plastider
 - Mennesket kan også omdanne stivelse til glukose.
 - De fleste glukoseenhetene i stivelse sitter 1-4.
 - **Amylose** er den enkleste formen for stivelse og er uforgreinet
 - **Amylopectin** er en litt mer kompleks stivelse og er litt forgreinet med 1-6 i forgreiningspunktene
 - **Glykogen** er dyrenes måte å lagre sukker på. Den er meget forgreinet og lagres i lever- og muskelceller. Glykogenlagrene er ikke veldig store.
- **Strukturelle polysakkarider** brukes av planter for å bygge cellevegger
 - Cellulose er også en polymer av glukose, men tar nytte av at det finnes to glukosemolekyler: **Alfa- og betaglukose**
 - Resultat av at ved ringdannelse vil glukose «avsnøre» OH-gruppen som vil peke enten opp eller ned



- Cellulose består av **bare betaglukose**: Dette gjør at monomerene sitter annenhver opp-ned bortover
 - Som resultat blir det rette tråder som ikke forgreiner seg (mye stivelse er helixformet).
 - Det vil i tillegg bli hydrogenbindinger mellom parallelle molekyler
- Enzymer som takler stivelse takler ikke cellulose, de fleste som spiser det behøver hjelp fra prokaryoter og protister i magen. Et eksempel er **kuer** og **termitter**, som begge har en diett på mye cellulose.
- **Kitin** er et annet viktig karbohydrat: Eksoskjelett hos leddyr. Det finnes også i sopp. Det likner på cellulose (beta-bindinger), men har en nitrogenstruktur som påheng.

Lipider

- Regnes ikke som sanne polymerer, og er ofte for små til å kalles makromolekyler.
- De grupperes fordi de alle er hydrofobe (=lipofil)
 - Dette er grunnet mye hydrogen og karbon og lite oksygen
- **Fett, fosfolipider og steroider er de viktigste**

Fett er sammensatt av **glyserol** og **fettsyrer**. Fett lagrer først og fremst energi, og isolerer viktige organer.

- Glyserol er en trekarbon-alkohol med tre hydroksylgrupper
 - 3 Fettsyrer (karboksylgruppe med lang kjede hydrokarboner) bindes til glyserolen (dehydrering) med en esterbinding – danner et **triglyserid**
 - Disse kan være tre like eller forskjellige fettsyrer
- Mettet: Ingen dobbeltbindinger, Umettet: Flere dobbeltbindinger
 - Både fem og seks dobbeltbindinger og 20 karbonatomer i flerumettede animale fettsyrer.
 - Naturlige umettede fettsyrer har cis-dobbeltbindinger. Dette skaper en **knekk** i kjeden som **hindrer tett pakking**.
 - Som resultat er plante- og fiskefett kalles derfor **olje** og er flytende i RT
 - Dyrefett er som regel mettet og er derfor stivt
- Plantefett har færre karbonatomer, men gjerne 3/4 dobbeltbindinger
- Fett er forløpere av hormoner. Det er forskjell på hormoner laget av omega 3 og omega 6! Omega 3-hormoner er anti-inflammatoriske.
- Hydrogenering omvandler umettet til mettet fett
 - Hydrogenering av vegetabilsk fett gir umettet fett med trans-dobbeltbindinger (delvis hydrogenisert).

Ny forståelse på hjerte-karsykdommer: Før trodde man det var avleiringer av fett, men nå har man lært at det er en fortykkelse av innerste delen av blodåren – den hovner opp, en inflammatorisk reaksjon. Synderen er mettet fett og karbohydrater (stivelse, glukose).

Essensielle fettsyrer er umettet fett vi ikke kan syntetisere i kroppen. Omega-3 er et vanlig eksempel. Gir også beskyttelse mot kardiovaskulær sykdom.

Fosfolipider er to fettsyrer og en fosfatgruppe festet til glyserol. Den ene delen av molekylet er hydrofilt, slik at du får en hydrofil hode og et hydrofob hale. I tillegg er et annet valgfritt molekyl ofte festet til fosfatgruppen

- Viktig komponent i alle cellemembraner - legger seg med fosforhodet utover mot vannet og halene mellom seg.
- Lager dobbeltlag i kontakt med vann – basal membranstruktur
- IKKE kovalent bundet med hverandre.

Steroider: Er lipider hvor karbonskjelettet består av fire sammenkoblede ringer

- Forskjellige grupper er igjen koblet til disse ringene
- **Kolesterol** er viktig for cellemembranen og som forløper til andre hormoner, blant annet kjønnshormoner

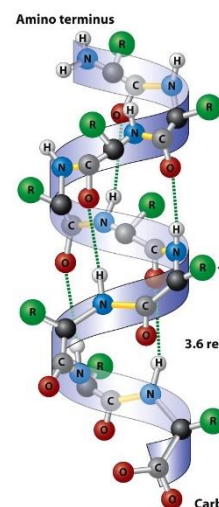
Proteiner

- 50% av tørrmassen i de fleste celler. Dominerende i de fleste celledfunksjoner.
- Strukturell styrke, lagring, transport, katalyster, kommunikasjon, bevegelse og forsvar (antistoffer)
- Flere titusener forskjellige, enormt sofistikerte molekyler med unik 3D-struktur
- Laget av **Polypeptider**: Aminosyrepolymerer linket av peptidbindinger og foldet til en helt bestemt 3D-struktur.
- **Aminosyrer** er organiske molekyler med både en amino- og en karboksylgruppe.
 - I midten: **alfakarbonet** - Et asymmetrisk karbon med en aminogruppe, en karboksylgruppe, et hydrogen og en **R-gruppe**.
 - Bindingen skjer mellom karboksylgruppen og aminogruppen. Dehydreringsreaksjon!
 - Aminosyrene deles inn etter om R-gruppen gjør molekylet ionisk, polart eller upolart.
- **Polypeptider** er polymerer av aminosyrer med en «rygg» av peptidbindingene og de forskjellige R-gruppene hengene over.
 - Den ene enden har dermed alltid en amino-ende (N-terminus) og en karboksyl-ende (C-terminus).
 - Enorm variasjon på disse. Av de 20 aminosyrene lages lenger på flere hundre. Det gir mange muligheter.
- **Proteiners** struktur og funksjon bestemmer av hvordan de er bundet, brettet og tøyd. Man kan ikke se på et polypeptid og si «åja, det blir det proteinet lol».
- Struktur bestemmer igjen et proteins funksjon:
 - **Enzymatiske proteiner**: Katalyserer kjemiske reaksjoner. Eks: Fordøyelse.
 - **Lagringsproteiner**: Lagrer aminosyrer. Eks: Kasein i morsmelk.
 - **Hormonelle proteiner**: Koordinerer celleaktivitet. Eks: Insulin.
 - **Kontraktile- og motorproteiner**: Actin og myosin trekker muskler sammen.
 - **Defensive proteiner**: Antistoffer i kroppen beskytter deg!
 - **Transportproteiner**: Hemoglobin transporterer oksygen rundt i kroppen
 - **Reseptorproteiner**: Proteiner i nervecellers membran kjenner igjen signaler.
 - **Strukturelle proteiner**: Keratin gir struktur til hår, horn, negler etc.

Når en celle lager et protein vil ulike reaksjoner mellom aminosyrene i kjeden forme molekylet. Mange proteiner er ganske runde (**globulære**), mens andre er rette (**fiber**). Det er allikevel stooooo variasjon. Strukturen bestemmer hvordan det virker. Eksempler er hvordan antistoffer perfekt matcher molekyler på overflaten til viruset de skal ødelegge.

Man har fire «nivåer» av proteinstruktur som man deler inn i

- **Primærstruktur** er den unike aminosyresekvensen i hvert polypeptid.
 - Bestemmes av genene våre
- **Sekundærstruktur** består av sylindre og folder i polypeptidkjeden.
 - Resultat av hydrogenbindinger mellom polypeptid-ryggene. (IKKE R-gruppene!)
 - Sylindre (**alfaheliks**) dannes av hydrogenbinding på hver fjerde aminosyre (se illustrasjon). Eksempel: Hår er alfakreatin: alfaheliks over store deler av proteinet.
 - Folder (**betaflak**) skapes av at segmenter av kjedene ligger inntil hverandre og har hydrogenbindinger mellom seg. Eksempel: Edderkoppnett er bare proteiner med betaflak.
- **Tertiærstrukturen** er den generelle strukturen til proteinet og er bestemt av interaksjoner mellom forskjellige R-grupper
 - Hydrofobiske interaksjoner, ioniske, hydrogenbindinger og van der Waals krefter
 - Hydrofobiske aminosyrer klumper seg mot midten, vekk fra vannet.
 - Sterke kovalente bindinger kalt **disulfidbroer** stabiliserer et proteins struktur
 - Gjelder for aminosyren cystein
 - Ikke så mye i cellen, men mye i sirkulatoriske proteiner
- **Kvartærstrukturen** er for de proteinene som består av mer enn ett polypeptid
 - Kollagen består av tre polypeptidkjeder spolert tvunnet som et tau
 - Dette gir styrke og elastisitet. Kollagen brukes i **bindevev**.
 - Hemoglobin: To alfa og to betakjeder med forskjellig struktur



Andre ting som bestemmer proteinstruktur:

- Fysiske og kjemiske betingelser som pH, salt, temperatur kan «knytte opp» et protein: **denaturering**
 - Biologisk inaktivt – men kan i noen tilfeller **renatureres**. Kan gå frem og tilbake, med andre ord.

Proteinfolding i cellen: Vanskelig å forutsi endelig struktur u ifra primærstrukturen (rekkefølgen på aminosyrer)

- **Chaperoner** er proteinmolekyler som assisterer med korrekt folding av andre proteiner.
 - Tønnestruktur (visualisert) der et løkk tas av og en polypeptidkjede føres inn og kommer ut som ferdig protein
 - Chaperoner bretter ikke proteinet selv, men tilbyr et **miljø** der det skjer enklere

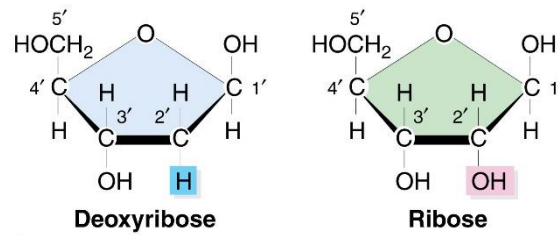
- **Røntgen-kristallografi** brukes til å bestemme et proteins struktur – krystalliserer proteinet og tar «bilder»
- **Nuclear magnetic resonance spektroskopi- NMR** er en metode som ikke behøver krystallisering av proteinet (ikke alle proteiner lar seg krystallisere heller)
- Bioinformatikk bruker pc-programmer til å forutsi og beregne slikt

Nukleinsyrer

- Lagrer, overfører og hjelper til med å uttrykke arvelig informasjon
- Aminosyresekvensen i et polypeptid er programmert av et gen
- To typer nukleinsyrer: DNA og RNA
 - DNA regulerer sin egen replikasjon
 - Dirigerer syntese av mRNA og kontrollerer proteinsyntese via mRNA
 - Proteinsyntesen skjer på ribosomene

Nukleinsyrer er polynukleotider: polymerer av **nukleotider**:

- Nitrogenbase, pentosesukker og en eller flere fosfatgrupper
 - I polynukleotider har hver monomer bare én fosfatgruppe
- Delen av et nukleotid uten fosfat kalles nukleosid.
- Sukkerenheten skiller: DNA har deoksyribose, RNA har ribose



- **Pyrimidiner** (C og T/U: enkeltring med 6 kanter)
- **Puriner** (A og G, dobbeltring med en 6- og en 5-kant)
 - Kalles baser fordi de pleier å ta opp H⁺ fra omgivelsene

Nukleotidpolymerer

- Nukleotider er koblet sammen kovalent til å danne et polynukleotid med en dehydreringsreaksjon - nukleotidpolymerer
- Dette danner en «rygg» av fosfat og sukker med to ender:
 - Fosfat koblet til 5' karbonet
 - Hydroksylgruppe på 3' karbonet
- «Veien» går fra 5' til 3'

DNA er en **dobbel helix** av **antiparallelle** nukleotidpolymerer med hydrogenbindinger som binder baseparene sammen **komplementært** (A og T, C og G)

RNA er enkle nukleotidpolymerer som også har komplementære basepar **på samme tråd**. Dette gir RNA-tråden struktur som igjen bestemmer funksjon.

Kapittel 7: Cellestruktur og funksjon

Celler er den enkleste formen for biologisk liv- enkleste samling materie som kan leve. Den mest grunnleggende enheten i struktur og funksjon av forskjellige organer etc.

Mikroskopi – relevant?

Eukaryoter og prokaryoter

Alle celler deler noen grunnleggende egenskaper og er i «slekt» gjennom opphav fra tidligere celler:

- Plasmamembran rundt dem
- Cytosol inni – geleaktig substans der organellene flyter rundt
- Kromosomer med arvestoff
- Ribosomer som konstruerer proteiner

En forskjell på prokaryoter og eukaryoter er cellekjernen. Eukaryoter har sitt DNA i **nukleus**, en dobbeltmembran. Prokaryoter har sitt DNA i et **område** uten membran som kalles **nukleoid**.

Innsiden av begge kalles **cytoplasma**. Hos eukaryotene flyter forskjellige **organeller** med membran og **unike funksjoner** i **ulike kjemiske miljø**, mens prokaryotene ikke har slike. Derimot ser det allikevel ut til at en prokaryot er organisert i visse områder der forskjellige prosesser foregår.

Eukaryoter er generelt **større** enn prokaryoter.

- Bakterier kalt mykoplasma er det minste vi vet om, mellom 0,1 – 1,0 μm .
 - «Vanlige» bakterier er 1,0 – 5,0 μm ,
- Eukaryoter er 10 – 100 μm

Det finnes en teoretisk «grense» på hvor stor en celle kan bli. Dette er fordi volum og overflate ikke henger sammen. Når en celle blir større vil volumet øke geometrisk i forhold til overflaten, som betyr mer volum per overflate enn når den er liten. Dette er kritisk for plasmamembranen, som styrer overføring av molekyler ut og inn av cellen.

- Store organismer har bare **flere**, ikke større celler
- Viktig med mye overflate per volum hos celler med mye utveksling av molekyler
- Mange celler har **mikrovilier** – små «utposninger» fra overflaten som gir mer overflate uten så mye økning i volum. Trenger altså **innbuktninger** for å opprettholde overflate per volum

Prokaryoter mangler intracellulære strukturer og er uten kjernemembran. Plasmamembran som igjen er omsluttet av en cellevegg med **flimbria** – struktur som den kan brukes til å feste seg til ting med. De kan også ha flageller.

Nukleus – Cellekjernen

- Mesteparten av all DNA – fremtredende struktur i cellen
- **Kjernemembranen** innkapsler den i et **dobbelt** membranlag av lipider separert med ca 20-40nm
 - Perforert av porestrukturer, ca 100nm i diameter som linker indre- og ytre membran. **Porekomplekser** er spesialiserte proteinstrukturer som ligger rundt poren og regulerer inn- og utfart av molekyler og RNA.
 - **Nuclear lamina** er en nettstruktur av proteiner på «innsiden» av veggen som opprettholder membranens form
 - **Nuclear matrix** er noe man tror eksisterer – et rammeverk av proteinfiber i cellekjernen
 - Man tror at lamina og matrix hjelper til i organiseringen av genetisk materiale
- DNA ligger organisert i **kromosomer**, en tråd per kromosom rullet rundt proteiner.
 - **Kromatin** er dette DNA-protein-komplekset.
- **Kjernelegeme/nukleolus** sees som en tett masse granuler og fibre i kromatinet.
 - Uten cellevegg
 - Syntese av rRNA (ribosomal RNA) – store ansamlinger av RNA
 - Proteiner fra cytoplasma settes sammen med rRNA til ribosom-deler som sendes ut og settes sammen i cytoplasma.
 - Kan være flere kjernelegemer, dette kommer an på art og stadium cellen er i
- mRNA lages i kjernen og sendes ut til cytoplasma via porene. Her syntetiserer ribosomer polypeptidkjeden

Ribosomer – proteinsyntese

- Laget av ribosomal RNA (rRNA) og proteiner – en stor og en liten subenhet
- Telles ikke som organeller grunnet mangel på membran
- Høyt antall av ribosom og tydelige kjernelegemer i celler med høy proteinproduksjon
- To «typer» ribosomer som er strukturelt identiske og kan bytte roller:
 - **Frie ribosomer** flyter rundt i cytosolen. Proteinene brukes i cytosol, som for eksempel sukkernedbrytende enzymer. De er produsert i nucleolus!
 - **Bunnede ribosomer** er festet til ru ER eller utsiden av kjernemembranen. Brukes til proteiner som skal gjennom membraner eller ut av cellen (**sekresjon**)
 - Celler med mye sekresjon (pancreasceller, fordøyelse) har mye bunnede ribosomer.

Endomembransystemet består av alle membranene i en eukaryot celle. De bedriver mye rart, som syntese av protein, transport av proteiner inn i organeller eller ut av cellen, metabolisme og bevegelse av lipider, avgiftning etc. De er relatert gjennom kontinuerlig kobling, eller ved **vesikler**, små baller av membran som føres rundt om kring. Membranene er svært forskjellige, men kan endre funksjon gjennom membranens livsløp.

- Kjernemembranen
- Cellemembranen
- Endoplasmatisk retikulum
- Golgiapparatet
- Lysosomer
- Vesikler og vakuoler

Endoplasmatisk retikulum – biosyntetisk fabrikk

- Nettverk av membraner som står for mer enn halvparten av en celledens membraner
- Består av flatklemte sekker og rør kalt **sisterner**
- Separerer **lumen**, innsiden, fra cytosolen
 - Kontinuerlig med kjernemembranen slik at lumen og mellomrommet i kjernemembranen er koblet sammen
- **Glatt ER** mangler ribosomer på overflaten
 - Enzymer til syntese av lipider som oljer, steroider og fosfolipider til nye membraner
 - Kjønnshormoner – celler i livmor og testikkel har mye glatt ER
 - Glatt ER i leverceller som «avgifter» gift og dop ved å legge til OH-grupper som gjør det mer vannløselig.
 - Alkohol og andre stoffer trigger vekst i glatt ER – økning i effektivitet = du får toleranse!
 - Et stoff trigger vekst = kan øke toleranse mot andre stoffer
 - Lager kalsiumioner til bruk i muskelceller: Membranen pumper kalsiumioner inn i ER lumen som strømmer tilbake til cytosol ved nerveimpuls: Dette får cellen til å trekke seg sammen
- **Ru ER** har ribosomer på utsiden av membranen. Det er også ribosomer på utsiden av kjernemembranen, som den er kontinuerlig med.
 - Proteiner som sekreses ut av cellen
 - Ru ER fra celler i bukspyttkjertelen lager insulin
 - Protein syntetiseres av bundne ribosomer og føres inn i ER lumen gjennom et proteinkompleks. Her antar det sin endelige form i prosessen.
 - Glykoproteiner (protein med karbohydrat kovalent bundet) er de vanligste som sekreses ut av cellen – karbohydratet festet til proteinet inni ER lumen av spesielle enzymer bygget inn i membranen.
 - Pakkes i **transportvesikler**, i **overgangs-ER** (den «smelter» vekk vesikler)
 - Lager også **membraner** ved å vokse og «brekke av» i vesikler til andre organeller.

Golgiapparatet – Transportsenter

Mange transportvesikler går innom golgiapparatet. Produkter fra ER modifiseres, lagres og sendes videre. Golgiapparatet er derfor stort i celler som sekreterer mye.

- Flate membransekker med avsnørt innside (sisterner?) som en stabel pitabrød. Mange av slike i en celle
- Struktur: Cis-siden og trans-siden på måten de er stablet.
 - Cis-siden er nær ER og er «ankomst»
 - Trans-veien er «avgang»
- Transportvesikler fra ER «smelter» inn i cis-siden og tømmer innholdet
- Trans-siden avsnører vesikler og sender dem av sted
- Mange stoffer endres på veien gjennom – glykoproteiner får karbohydratdelen modifisert (har også allerede blitt endret på av ER)
 - Stor variasjon av karbohydrater
- Lager noen makromolekyler som visse polysakkarider
- Produktene som føres inn i cis vil «raffineres» i hver enkel membransekk av ulike enzymer og sendes videre til neste sekk i retning trans.
 - Ny forskning tyder på en mer dynamisk golgi – at hver membransekk flytter seg nedover mot trans også og endrer på innholdet mens de beveger seg
- Før avgang sorteres og merkes noen produkter med en fosfatgruppe, samt at noen transportvesikler får en molekylstruktur som gjenkjenner «dockingplasser» på andre organeller etc. Kan også gå tilbake til ER.

Lysosomer – fordøyelse

- Membrankledde sekker (vesikkelstruktur) med enzymer brukt i fordøyelsen
 - Hydrolytiske enzymer som mange eukaryote celler bruker til å hydrolysere makromolekyler
 - Fungerer best i surt miljø slik som det er inni lysosomene – hvis de sprekker vil ikke enzymene fungere så godt i den nøytrale cellen (genialt)
- Membran og hydrolytiske enzymer produseres i ER og prosesseres i Golgi.
 - 3D-strukturen til proteinene i membranen og enzymene hindrer at de selv blir ødelagt
- Encellede eukaryoter spiser ved **fagocytose** – matvakuolen som formes smelter sammen med lysosomer og den brytes ned – stoffene går så ut i kroppen
- **Autofagi:** Ødelagte organeller omsluttet av membran og «angripes» av lysosomer.
 - Resirkulering av eget cellemateriale
 - Leverceller gjør dette meget ofte
- Avfallsstoffer fjernes ved at lysosomene smelter sammen med noe annet

Vakuoler – Mange forskjellige vedlikehold-greier

- Store vesikler fra ER og Golgi
- Selektiv i transport inn og ut – ofte helt ulikt miljø inni vakuolen enn resten av cellen
- Matvakuoler skapt av fagocytose

- Kontraktive vakuoler: Pumper vann ut av encellede eukaryoter i vann
- I planter og sopp driver noen vakuoler hydrolyse med hydrolytiske enzymer på samme måte som lysosomene i dyreceller
 - Fungerer også som oppbevaring av organiske molekyler eller giftstoffer til beskyttelse
 - Fargestoffer
- Voksne planter har ofte en stor **sentralvakuole** fra sammensmelting av flere mindre vakuoler.
 - Inni ligger sevje, plantens lager av uorganiske ioner som fosfor og klor.
 - Stor betydning for vekst – absorberer vann og vokser uten av nye celler må genereres
 - I slike celler er det bare litt cytosol, men nok til at det kan foregå en overføring.
 - Det er «billigere» å ha en vakuole med vann en cytosol

Mitokondrier og kloroplaster konverterer uorganisk energi til energi cellen kan bruke gjennom fotosyntese eller celleånding. Man regner med at de har en liknende evolusjonær bakgrunn – **endosymbiontteorien**: En tidlig forfader av eukaryote celler slo seg sammen med en encellet, oksygenbrukende prokaryot og dro nytte av det. På samme måte kan en fotosyntetiserende prokaryot ha vært forfaderen til kloroplastene. Støtte til teorien:

- Begge har dobbelt cellelag. Det finnes bevis for at oldtidsprokaryoter også hadde det
- Begge har ribosomer samt sirkelformede DNA-molekyler assosiert med indre membran som styrer produksjon av noen organelleproteiner de behøver.
- Vokser og reproducerer inni cellen

Mitokondrier – kjemisk energi

- Finnes i nesten alle celler: 1-10µm lange
- Kan ha få eller flere hundre – dette kommer an på hvor mye aktivitet cellen er i
- To cellelag av fosfolipider med unike proteinpåheng
 - Ytterste er glatt
 - Innerste er svært foldet – **cristae**. Gir stor overflate å drive celleånding på!
- Innsiden – **mitokondrisk matrix**
 - Mitokondrisk DNA (koder for noen, ikke alle proteiner den bruker) og ribosomer
 - Enzymer til celleåndingen og enzymer bygget inn i den indre celleveggen
- Flytter rundt på seg, deler seg og danner et rørformet fluktuerende nettverk i cellen. Dette tok det tid å forstå!

Kloroplaster – fanger lysenergi

- Linseformet organ i blader og andre grønne plantedeler. 3-6µm lange.
- Inneholder grønt pigment klorofyll og enzymer og molekyler til bruk i fotosyntesen
- Dobbeltmembran men ørlite mellomrom,
- **Stroma** på innsiden, inneholder kloroplast-DNA, ribosomer og enzymer.

- **Tylakoider:** Membraner som er flate sammenkoblede sekker
 - Stabled som pokerchips noen steder: **Granum** (grana)
- Tre hulrom i kloroplasten med andre ord:
 - Intermembranen
 - Stroma
 - Innsiden av grana/tylakoidene
- Kloroplastene gror og splitter seg, vandrer rundt cytoskjelettet slik som mitokondriene
- Spesialisert celle i **plastidfamilien**, amyloplaster (lagring av amylose, stivelse) og kromoplaster (pigmenter) er også i denne.

Peroksisomer – oksidering

- Spesialisert metabolsk område omsluttet av en enkelt membran
- Inneholder enzymer som overfører H til O₂ og danner H₂O₂ som avfallsprodukt.
- Eget enzym som omdanner peroksidet til vann
 - Har sine egne områder så andre deler av organellen ikke skades
- Mange forskjellige funksjoner dette brukes til:
 - Bryte ned fett til mindre molekyler, mates igjen til mitokondriene som drivstoff
 - I lever bryter de ned gift, alkoholer og liknende ved å fjerne hydrogenet
 - **Glyoxysomer** er egne organeller i fettlagringsvev hos planter som omdanner fett til sukker så lenge frøet ikke kan ha egen fotosyntese
- Fremdeles diskusjon om peroksisomenes opprinnelse!
 - Vokser ved å «spise» proteiner fra cytosol og ER, samt lipider fra ER og fra peroksisomet selv
 - Splitter seg i to når de når en viss størrelse

Cytoskjelettet er et nettverk av fiber i cytoplasma som organiserer strukturer og aktiviteter i cellen. Før avansert mikroskopi ble oppfunnet trodde man organeller beveget seg fritt rundt i cellen. Bakterier har også liknende strukturer. Man deler inn i tre former molekyllære skjelettstrukturer: Mikrotubulus, mikrofilamenter og intermediært filament. Samspill med vev rundt og «underlag» er også med på å formgi en celle

Rollen til cytoskjelettet er struktur og mobilitet. Det gir mekanisk støtte til cellen, og styrken som kommer av den kuppelformede strukturen er spesielt viktig i dyreceller (som ikke har sterke vegger av cellulose). Cytoskjelettet kan raskt demonteres og settes sammen andre steder, som endrer cellens form.

- Det brukes også i noen cellers **motilitet** – endringer av en celleds plassering og bevegelse av individuelle deler av cellen.
 - Eksempler: Motorproteiner og deler av cytoskjelettet jobber med molekyler i plasmamembranen til å flytte celler rundt på fibertråder
 - Motorproteiner transporterer vesikler langs cytoskjelettet
 - Assisterer i fagocytose

Komponenter: Mikrotubulus er den tykkeste, mikrofilamenter er de tynneste og mellomfilamenter er midt i.

Egenskap	Mikrotubulus	Mikrofilamenter	Intermediært filament
Struktur	Hule rør	To tvinnede tråder actin	Fiberaktige proteiner kveilet til kabler
Diameter	25nm med 15nm lumen	7nm	8-12nm
Protein-delenheter	Tubulin, en dimer av alfa- og betatubulin	Actin	Forskjellige proteiner i slekt med keratin
Hoved-funksjon	<ul style="list-style-type: none"> - Hindrer sammenpressing - Motilitet (flageller, cilier) - Kromosombevegelse i celledeling - Organelleforflytning 	<ul style="list-style-type: none"> - Spenningstruktur - Endringer i celleform <ul style="list-style-type: none"> ● Muskelkontraksjon ● Cytoplasmatisk strømning i planteceller - Deling av dyreceller - Amøbebevegelse 	<ul style="list-style-type: none"> - Spenningstruktur) - Forankring av cellekjerne og visse organeller - Nuclear lamina
Tegning			

Mikrotubulus

- Hule staver av et globulært proteinet kalt **tubulin**
 - Dimer av alfa- og betatubulin surret som et rør
 - Vokser ved å legge til flere dimerer, kan også tas fra hverandre
- Alle eukaryote celler
- På grunn av romlig orientering er det en ende av tubula som enklere kan både legge til og fjerne dimerer: **pluss-enden**
- Støtter opp cellen og fungerer som «skinner» til motorproteiner
 - Bruker ATP til å endre konfigurasjon «annenhver gang»
- Vesikler fra ER og golgiapparatet beveger seg langs disse
- Separasjon av kromosomer i celledelingen

Alla mikrotubula vokser ut av **sentrosomer**, en region ofte nær cellekernen. Disse støtter cellen strukturmessig. Inni sentrosom ligger det et par **sentrioler**, som hver igjen består av ni sett av en trippel mikrotubulus-rekke arrangert som en ring/stjerne (TEGNE). Ligger langs-tvers.

I eukaryoter står også mikrotubula for bevegelse av flageller og cilier, spesielle bevegelsesorganer som inneholder disse.

- Bevegelse hos sperma og av mange encellede eukaryoter.
- I luftrøret sitter celler med cilier som dytter møkk og støv vekk fra lungene
- Beveger egget mot livmoren
- Flageller og cilier beveger seg forskjellig:
 - Flageller er som en «slange» eller en propell
 - Cilier fungerer mer som årer, med et kraftig dytt i en retning og en «innhenting».
 - Tenk froskespark
- Cilier kan også fungere som «antenner» - mottar signaler
 - Er gjerne ikke bevegelige, og da bare en per celle
 - I virveldyr virker det som de fleste celler har en!
 - Membranproteiner på antennen som videresender signaler om miljø
 - Antas viktig i embryoutvikling og hjerneaktivitet

Cilier og flageller er ganske like i struktur, selv om de er forskjellige på mye annet

- Mikrotubula innhyllet i cellemembran ut av selve cellemembranen
 - Ni «par» mikrotubula i en ring/stjerne med ett par som går i midten
 - Festepoteiner som binder naborør og har motorproteiner (dyneiner) påsatt
 - «9+2» -mønsteret går igjen i både cilier og flageller på de fleste eukaryoter
 - Ikke-bevegelige cilier har et «9+0» -mønster.
- Forankret i cellen av en «basal body», som likner **svært** mye på centrioler med triplerter av mikrotubula i et 9+0 –mønster
 - «Basal body» i sperma blir til centriolen i en befruktet egg
- HVORDAN BEVEGELER FLAGELLEN SEG SJEKK YOUTUBE ELNS

Mikrofilamenter

- Tynne, solide staver av to tvinnede tråder med enheter **actin** – et globulært protein
- Kan også forme nettverk hvis andre proteiner fester seg til på sidene av tråden og tillater videre bygging av actin-tråder.
- Til stede i alle eukaryote celler
- Gir støtte til cellen ved **spenning**: Et nettverk av mikrofilamenter rett innenfor cellemembranen støtter del opp og gjør den «geleaktig».
- Kjernestruktur i **mikrovilier** hos celler som tar opp og gir fra seg mye stoff
- Stor rolle i motilitet: Actinfilamenter og tykke filamenter av **myosin** jobber sammen for å utgjøre sammentrekningene i muskelcellene!
 - I noen hvite blodceller og hos amøber får disse bevegelse ved å «slenge ut» **pseudopodia** (falsk fot), og trekke seg selv mot denne
 - Hos planter jobber actin og myosin sammen for å skape **cytoplasmatisk strømning** i cellen, en slags virvel som bidrar til å spre materialer raskere.

Intermediære filamenter

- Navngitt fordi de har diameter mellom mikrotubulus og mikrofilamenter
- Finnes bare i noen eukaryote celler, deriblant virveldyr
- Stikkord: **Støtte** og et mer permanent skjelett der ting festes og holdes på plass
- En rekke forskjellige utgaver som bygger på proteiner i familie med keratin
 - Ikke konsistent i diameter og struktur slik som de to andre
- Støtter opp cellen via spenning på mange måter og finnes i flere «klasser».
- Flyttes ikke på slik som de to andre – henger igjen etter celledød. Huden vår er full av kreatinskjelett fra mellomfilamenter
 - Tyder på at de er meget sterke og er viktige for cellens struktur og organellenes plassering
- Kjernen sitter ofte i et bur av mellomfilamenter som også strekker seg ut i cytosol
- Danner **kjernelamina**, innsiden av kjernemembrane: Forankring for kromosomene
- Forankrer mikrofilamentene som utgjør mikroviliene (utstikkerne for mer overflate)

Ekstracellulære komponenter og forbindelser mellom cellene hjelper til med å koordinere celleaktiviteter

Det er flere ting som foregår utenfor eller mellom cellene som er svært viktig for cellenes funksjon. Det er snakk om kommunikasjon, og transport.

Celleveggen til planter er en ekstracellulær struktur som gir svært mye støtte til planten (spesialiserte celler), hindrer for høyt vannopptak og gir beskyttelse og struktur.

- Mye tykkere enn cellemembranen
- Varierer i tykkelse og komposisjon, men grunnleggende struktur er den samme:
 - Mikrofibertråder av cellulose (polysakkarid) syntetisert av enzymet **cellulose syntase** sekreseres ut av cellen ut i en «matrix» av andre proteiner og polysakkarider.
 - En slik «tråd-i-seig-masse» -blanding brukes i sement og fiberglass for økt styrke.
- Ofte hullete av kanaler etc kalt **plamodesmata**
- Unge planteceller skaper først en fleksibel cellevegg kalt «primærcellevegg»
- Mellom disse: «midtre lamella» - et tynt lag av seige polysakkarider som binder cellene sammen
- Når cellen ikke gror lenger forsterker den celleveggen ved å pumpe forsteiningsubstanser inn i den, eller danner en **sekundær** cellevegg mellom cellemembranen og primærcelleveggen.
 - Ofte flere lag av sekundær cellevegg
 - Sterk og holdbar «matrix»

Ekstracellulær Matrix til dyreceller: Selv om dyreceller ikke har vegger på samme måte som planter har de en intrikat «extracellular matrix», eller **ECM**. Den består av glykoproteiner og andre karbohydrat-holdige molekyler som sekreseres av cellen. Utgjør **organet** cellen er i.

- **Kollagen** er vanligste glykoprotein – legger seg som fiber på utsiden av cellen og står for 40% av proteinet i menneskekroppen
- Kollagen er vevet inn i et kompleks av **proteoglykaner**:
 - Kjernetråd av protein med mange karbohydrater kovalent hengene på seg som tråder – kan være 90% karbohydrat
 - Proteintråder kan igjen feste seg u-kovalent på en lang polysakkaridtråd og dermed danne komplekser
 - **Geleaktig** – gir støtte i forhold til vandig miljø
- Noen celler er festet til ECM via ECM-glykoproteiner som **fibronectin**
 - Binder seg til proteiner kalt **integriner** som går «gjennom» cellemembranen
 - Integriner er igjen festet til proteiner assosiert med mikrofilamenter i cytoskjelettet
 - Fungerer som kommunikasjon mellom ECM og cytoskjelettet
- Forskning på ECM viser at den trolig er mye viktigere enn vi tror, og har viktige roller i embryoutvikling og aktiviteten til gener i cellekjernen. Endringer i ECM kan trigge både kjemiske og mekaniske signaler som når inn til cellen, og ECM i et bestemt vev kan dermed påvirke alle cellene i vevet.

Celleknutepunkter er kommunikasjon gjennom direkte kontakt med cellene. Mange naboliggende celler har forbindelse på denne måten.

- **Plantecellevegger** er perforert av **plasmodesmata** – ganger som kobler cellene sammen
 - Gjør planten til en kontinuerlig organisme med overføring av cytosol, vann, salter og næringsstoffer
 - Eksperimenter viser at også RNA og proteiner lar seg overføre på denne måten
 - Det later til at større molekyler transporteres til plasmodesmata langs skjelettet

Dyreceller har tre typer «ganger» mellom hver celle. De er mest vanlig i epitelceller, celler på utsiden eller innsiden av et organ (overflatevev).

- **«Tette knutepunkter»** er områder der cellene er presset hardt sammen og bundet av proteiner som fungerer som en forsegling rundt hele slik at væske ikke trekke gjennom. Dette gjør huden for eksempel vanntett! De kan også variere hvor tette de er, i områder med mye utveksling (tynntarm) er det ikke like tett, mens i tykktarm er den ganske tett!
- **Desmosomer** (ankerknutepunkt) fungerer som nagler mellom hver celleds intermediære filament og holder de hardt på plass. De er igjen festet til cellen med intermediært filament. Av robust keratin. De holder for eksempel muskelen sammen!
- **«Åpne knutepunkter»** likner plasmodesmata i planteceller, med unntaket at de ikke har membran rundt seg. Det er membranproteiner som er omringet to porer og

overfører ioner, skkerer, aminosyrer og andre små molekyler. Viktig for hjertemuskler og i embryoutvikling!

Man sier at «cellen er en større enhet enn delene» fordi de til sammen gjør store ting.

Kapittel 8: Cellemembraner

Cellemembranen skiller det levende fra det «døde». Alle biologiske membraner er **selektive**, de kan styre hva som går inn og ut av dem. Denne egenskapen er helt grunnleggende for livet som vi kjenner det – evnen til å spesialisere celler til ulike oppgaver, vev og organer.

Mosaikker av lipider og proteiner

Cellemembranens viktigste strukturer er lipider og proteiner, selv om karbohydrater også er viktig. **Fosfolipidene** er det flest av, og er orientert i en dobbel membran slik at de hydrofobe delene er orientert mot hverandre. De er **amfipatiske** molekyler med en hydrofob og hydrofil del. Ved en høy konsentrasjon (over en viss mol) aggregerer fosfolipider seg naturlig i en amfipatisk struktur! Mange proteiner grupperer seg sammen og er spesialiserte rundt et område, der kan tettheten av proteiner være svært høy – **fluid mosaic model**. Opp til 700 kilodalton kan fritt diffundere inn i cellen.

- 1935: «Sandwich-modellen»: Fosfolipid-dobbeltlag ligger mellom to lag globulære proteiner. Hugh Davson og James Danielli
- 1972: Fluid Mosaic Model

Fluiditeten til membraner

Membraner er ikke statiske siden de bare holdes sammen av hydrofobiske krefter. Membranene kan flytte seg rundt i planet som i en folkemengde, men kan også i tilfeller «flip-flop» rundt til det andre fosfolipid-laget (svært sjeldent). De flytter seg **lateralt** 10^7 ganger per sekund, som er jævnlig mye. Proteiner beveger seg også i blant, men da mye saktere. Noen proteiner ser ut til å bevege seg retningsbestemt via motorproteiner langs cytoskjelettet i cytosol-siden, mens andre ser ut til å være statiske og forankret i skjelettet.

Membraner holder seg «flytende» helt ned til temperaturer der de blir så tettpakket at de «stivner». Hvis hydrokarbon-halene til lipidene ikke er mettet vil dobbeltbindingene gi «knekken» i halen, som hindrer denne tettpakkingen i større grad. **Kolesterol** fungerer som en slags «buffer» for dette. Ved høye temperaturer (37) gjør den membranen **mindre** fluid ved å forhindre fosfolipid-bevegelse, men det forhindrer også tettpakking ved lave temperaturer!

Membraner er helt avhengig av å ha riktig konsistens for at de forskjellige proteinene både skal fungere, komme seg dit de vil og for permeabilitet. Dette gjør at celler i ekstreme miljøer har helt forskjellig sammensetning i cellemembranen.

Evolusjon: Membraner hos fisker i kalde omgivelser har store mengder umettede hydrokarboner for økt fluiditet. Samtidig har bakterier/arkebakterier unike lipider som tåler de høye temperaturene. Noen organismer, som planter, endrer komposisjonen av lipider til flere umettede utover høsten/vinteren.

Membranproteiner og deres funksjon

- Fosfolipider er «stoffet», men proteinene bestemmer funksjon
- Forskjellige celler har forskjellige proteiner – forskjellige organeller har forskjellige proteiner i sine membraner
- **Integral proteins:** Penetrerer membranen helt gjennom (transmembrane) eller bare delvis
 - Har hydrofobe aminosyrer i midten (gjerne av alfahelixer) i kontakt med lipid-delene og hydrofile i ECM/cytoplasma-delen.
 - Kan ha hydrofile «kanaler» som tillater gjennomstrømning av hydrofile stoffer gjennom membranen
- **Peripheral proteins:** Sitter løst på overflaten eller festet til integral proteins.
- Noen proteiner er festet til cytoskjelettet på den ene siden, mens noen er festet til fibrene i den ekstracellulære matriksen.
- **Funksjonell mosaikk:** Ett protein kan ha flere funksjoner, og det finnes proteiner til enhver oppgave

6 hovedoppgaver proteiner har:

- **Transport:** Hydrofil kanal som er selektiv for et visst stoff, eller proteiner som endrer form for å «pumpe» stoffer inn og ut av cellen. Kan koste ATP.
- **Enzymaktivitet:** Protein bygget inn i membran har aktivt sete i den retningen aktiviteten skal foregå. Mitokondriene for eksempel.
- **Signaltransduksjon:** Å overføre fysisk/kjemisk til annen type signal. En reseptor på utsiden kan møte riktig kjemisk signal og endre form slik at det binder seg med et cytoplasmisk protein.
- **Cellegjenkjennelse:** Glykoproteiner og andre molekyler fungerer som identifikasjon for proteiner på andre celler
- **Linking/knutepunkter:** Brukes i forbindelse med overføring av stoffer og vann, er beskrevet over tidligere.
- **Forankring til matriksen eller cytoplasma:** Mikrofilamenter kan være ikke-kovalent bundet til proteiner. Proteiner linket til ECM kan koordinere endringer og funksjoner.

Proteiner i overflaten er viktig innen medisin. HIV-viruset bruker både CD4-overflateproteinet, men behøver også CCR5 som et «ko-protein» for å gjenkjenne. Noen er født med et gen som gjør at de ikke har CCR5-proteinet i sine celler, og er derfor immune mot HIV. Slik kunnskap er svært nyttig innen forskning.

Rollen til karbohydrater i membranen innen celle-celle gjenkjennelse

Cellegjenkjennelse er svært viktig i en rekke funksjoner, som for eksempel å gruppere celler under utvikling og i immunforsvaret.

- Foregår ved å binde seg til karbohydrater på overflaten til hverandre
 - Korte karbohydrater på ikke mer enn 15 sukker-enheter.
 - Enten kovalent bundet til **lipider** (glykolipider), men mest vanlig til **proteiner** (glykoproteiner)

- Stor variasjon innen en art, mellom individer og mellom celletyper! ABO-systemet eksempel
- Som regel på utsiden av cellen

Membraner har forskjellig sammensetning av fosfolipider på hvert lag, samt at proteinene også ligger i en bestemt vinkel. Dette foregår gjennom produksjonen av lipider og proteiner i ER, deretter fiksing i golgiapparatet, som videre avsnører dette til en vesikkel. Vesikkelen smelter sammen med cellemembranen og det som er var innsiden av vesikkelen blir nå utsiden av cellemembranen. Genialt? Det følger også med proteiner som brukes til

Membranstruktur og selektiv permeabilitet

Cellemembranen er et klassisk eksempel på en supramolekylær struktur – de samlede funksjonene overgår hver enkelt funksjon satt sammen. Den kan regulere hva slags molekyler som slipper gjennom celleveggen – svært viktig for eksistens.

Permeabiliteten til lipid-bilaget: Upolare molekyler som CO₂ og O₂ kan lett komme seg gjennom, mens ioner og polare molekyler har større vansker. Selv vann, et bitte lite molekyl, har stor problemer med å komme seg gjennom. Ioner har ofte et «skall» av vann rundt seg, som gjør det enda vanskeligere.

Transportproteiner: Noen polare molekyler kan bruke transportproteiner for å slippe den upolare membranen. De er som regel spesifikke for ett eller en liten liknende gruppe stoffer. Røde blodceller har transportproteiner i membranen som bare tar glukose, intet annet.

- **Kanal-proteiner** er polare kanaler som noen atomioner eller molekyler kan bruke.
 - **Akvaporiner** er spesielle kanalproteiner som kan knuse 3 milliarder vannmolekyler på en gang, plass til 10 av gangen!
- **Bæreprøteiner** holder fast til stoffet og endrer form for å «vrenge» det gjennom

Passiv transport er diffusjon gjennom membran uten noe energibruk

Alle stoffer vil diffundere nedover sin konsentrasjonsgradient så lenge den kommer seg gjennom membranen. De fleste stoffer går inn og ut av cellen på denne måten. Lite O₂ fra respirasjon → O₂ går rett inn i cellen. **Hastigheten** bestemmes av hvor permeabel membranen er. Vann går raskt på grunn av akvaporiner.

Effekten av osmose på vannbalanse: Vann vil diffundere til området som har færrest «frie» vannmolekyler, siden bare de kan passere gjennom. Dette betyr at vann vil strømme til området der det er høyest konsentrasjon av et løst stoff helt til konsentrasjonen av det løste stoffet er lik på begge sider.

Vannbalanse i celler uten cellevegg

- **Tonisitet:** Evnen et miljø har til å få en celle til å ta opp eller miste vann
 - Bestemmes delvis av konsentrasjonen til ikke-penetrerede løste stoffer relativ til innsiden av cellen
 - Høye konsentrasjoner på utsiden betyr gjerne at vann vil gå ut av cellen

- **Isoton:** Volum i dyrecellen er stabilt, like mye vann inn som ut
- **Hypertonisk:** Volum senkes, vann går rett ut av cellen
- **Hypotonisk:** Vann går rett inn i cellen, cellen sprekker

Osmoregulering er regulering av konsentrasjonen til vann og løste stoffer. Dette er enda en kritisk funksjon for overlevelse.

Vannbalanse i celler med cellevegg

- Celleveggen til planter, prokaryoter, sopp og noen protister vil utvide seg og **holde** på trykket fra vannet i hypotone miljøer
 - Da er cellen fast og fin og kan ikke ta opp mer vann på grunn av trykket = sunt!
 - Dette gjør planter uten bark faste! Ellers blir de slappe
- Hvis cellen møter et hypertonisk miljø blir den **plasmolysert** – cellemembranen skrumper inn og celleveggen mister litt form: Planten dør gjerne av dette.

Fasilitert diffusjon: Passiv transport via proteiner

- Fremdeles litt usikker tema (i følge boken): Hvordan skjer det?
- De fleste proteiner er veldig spesifikke til ett eller noen stoffer – øker hastigheten
- **Kanalproteiner** er hydrofile ganger som vann og små ioner kan passere gjennom
 - Celler i nyrene har mange **akvaporiner**, ellers hadde vi tisset 180L urin!
 - **Ionekanaler:** Kanalproteiner som transporter ioner
 - **Portkanaler:** Reagerer på stimuli, kjemisk eller elektrisk
- **Bærerproteiner** forandrer struktur som tvinger den «bindende» siden gjennom membranen
 - I fasilitert diffusjon tar dette ikke energi siden det skjer fra høy til lav konsentrasjon

Aktiv transport: Krever energi

- Bare bærerproteiner siden de må endre form
- ATP gir energien for å få dette til å fungere – setter en fosfatgruppe på proteinet som endrer dets form.
- Et eksempel er K^+ og Na^+ . **Kalium-natriumpumpen**. Disse har lave og høye konsentrasjoner utenfor cellen, men motsatt inni.

Hvordan ionepumper opprettholder membranpotensial

- = En liten ladning som resultat av at det er flere anioner på innsiden av cellen
- Dette skaper TO krefter som driver transport: Elektrisk (kationer vil ut, anioner vil inn) og kjemisk (konsentrasjonsforskjeller): **Elektrokjemisk gradient**
 - Eksempel er Na^+ i nerveceller: Cellen har lav konsentrasjon av Na^+ inni seg, men når den stimuleres åpner portkanaler seg slik at Na^+ raser inn i cellen.
- **Elektrogenisk pumpe:** Natrium-kaliumpumpen er et eksempel på dette. Det pumper 2 K^+ inn og slipper 3 Na^+ ut. Dette skaper «negativt» miljø.
 - Viktigste elektrogeniske pumpen i dyreceller

- **Protonpumpen** er den viktigste elektrogeniske pumpen til sopp, planter og bakterier
 - Transporterer hydrogenioner ut av cellen via ATP

Cotransport: Samtransport gjennom et membranprotein

- Energien som brukes av et stoff som går **med** konsentrasjonsgraden brukes også til å dytte et annet stoff **mot** sin konsentrasjonsgrad! = Kotransport!
- Eksempel: Planter bruker gradienten som genereres av protonpumpen til å drive aktiv transport av aminosyrer, sukker og liknende.
 - H⁺ ønsker å komme tilbake igjen langs sin elektrokjemiske gradient, men bare via et protein som **også** dytter inn litt sukker etc samtidig!
 - Sukkeret transporteres til planteårer og videre til ikke-fotosyntetiske deler.

Store molekyler kan ikke diffundere eller gå via proteiner. I stedet bruker de:

Eksocytose: Vesikler ut av plasmamembranen. Vesikkelen fra Golgi går via mikrotubulus til plasmamembranen → spesifikke proteiner «snører» opp begge membranene, og vesikkelen blir så en del av membranen. Celler i bukspyttkjertelen produserer insulin og dytter det ut ECM via exocytose. Planteceller som lager cellevegger eksiterer også proteiner og karbohydrater fra Golgi på denne måten.

Endocytose:

- **Fagocytose:** En celle sluker en partikkel ved å «strekke» seg rundt den via pseudopodia. En matvakuole dannes, som slår seg sammen med et lysosom.
- **Pinocytose:** En celle «drikker» dråper en væske fra ECM i små vesikler fra plasmamembranen. Den delen som avsnøres er ofte dekket av et fuzzy protein. (coated pits)
- **Receptor-mediated endocytose:** Deler av utsiden på cellen er dekket av reseptorproteiner som bestemte stoffer fester seg på. Disse samler seg sammen og danner såkalte «coated pits» og avsnøres på vanlig måte. Ikke 100% spesifikt, annet blir også med.

Endo- og eksocytose brukes også for å balansere mengden cellemembran!

Eksempel: Menneskeceller bruker receptor-mediated endocytose for å innta kolesterol til membransyntese. De farer rundt i blodet i et lite lipid-proteinkompleks kalt LDL som celler har en reseptor for (LDL = **ligand**, et molekyl som binder seg til en spesifikk reseptor). Sykdommer med høye kolesterolnivåer har ikke LDL-reseptorer.

Kapittel 9: Cellesignalisering

Evolusjonen av cellesignalisering startet trolig tidligere enn multicellulære organismer. Det er utrolig mange fellestrekk ved kommunikasjonsmekanismene til de fleste organismer som lever i dag. Forskere tror cellesignalisering startet hos encellede pro- og eukaryote organismer og ble brukt til kommunikasjon om tilgang på næring etc. Dette finnes fremdeles i bakterieceller den dag i dag, de kan samle seg til en tykkvegget ball som tåler mer hvis det er lite næring i området (**quorum sensing**). Dette gjør at bakterier også kan koordinere prosesser som trenger flere av dem, slik som dannelse av biofilm.

Gjær (den vi bruker i øl, brød etc) har to kjønn, a og α . De sekreterer en paringsfaktor som kun binder seg til den andres reseptor. Når de møtes vil de gro sammen til en ny celle med $2n$.

Lokal- og langdistansesignalering

- «Gap junctions» og plasmodesmata – direkte forbindelser mellom dyre- og planteceller muliggjør fri strømning av signalmolekyler lokalt. Dyreceller har også Interaksjoner mellom overflatemolekyler i to celler.
- **Parakrin signalisering:** Sekrerende signalcelle påvirker andre nærliggende celler
- **Synaptisk signalisering:** Elektrisk signal i en nervecelle trigger neurotransmittere til å diffundere gjennom synapsen, mellomrommet mellom nervecellen og målcellen. Nerveceller er også langdistanse
- Lokal plantesignalisering er lite forstått, cellevegger gjør ting vanskeligere (andre mekanismer)
- **Hormoner** er langdistansesignalmolekyler. Hormonsignalisering, eller **endokrin** signalisering går via sirkulasjonssystemet til målcellene.
- **Plantehormoner**, eller plantevekstfaktorer, er ofte i gassform eller diffunderer gjennom planten.
- Hormoner og lokale regulatorer kan variere enormt i størrelse (insulin har nesten 1000 atomer).

Cellesignaliseringens 3 «faser»

- Earl W. Sunderland (nobelpris 71) og forskningsteamet jobbet med adrenalin sin påvirkning til nedbrytningen av glykogen i lever- og muskelceller
- Adrenalin + glykogen fosforylase + glykogen ga ingen resultater, bare når adrenalin ble tilsatt **intakte** celler skjedde nedbrytningen
 - Dermed: Adrenalin interagerer ikke direkte med enzymet, mellomsteg må skje
 - Og: plasmamembranen kreves for at signalet skal gå, tre faser:
 1. **Mottak:** Signalmolekyl binder seg til reseptorprotein på overflaten (eller inni) til mottakercellen
 2. **Intracellulær transduksjon:** Reseptorproteinet endrer seg og påvirker et transduksjonspor av flere molekyler som endrer seg og til slutt fører til en:
 3. **Respons:** Dette kan være alt fra å aktivere et enzym til å aktivere gener, eller flytte på cytoskjelettet.

Mottak

- Signalmolekyler er **ligander**, molekyler som spesifikt binder seg til andre, ofte større, molekyler.
- Dette endrer reseptorproteinets form og aktiverer andre cellulære molekyler eller samler reseptormolekyler som igjen fører til en respons

Reseptorer i plasmamembranen

- Spiller svært viktige roller hos dyr – mange sykdommer er forbundet med at disse ikke fungerer ordentlig.
- De fleste vannløselige signalmolekyler binder seg til spesifikke seter på transmembrane reseptorproteiner og gir informasjon fra ut- til innside.
- Tre hovedtyper: G-koblede, tyrosin-kinaser og ionkanal-reseptorer

G-proteinkoblet reseptor (GPCR)

- Overflate, transmembrant protein som virker med et **G-protein** – Protein som binder det energirike molekylet GTP
- Brukes av mange signalmolekyler (deriblant adrenalin)
- Aktivt sete og interaksjon med G-proteiner varierer, men strukturen er overraskende lik med en sekundærstruktur der ett enkelt polypeptid har 7 transmembrane alfahelikser.
- Utrolig stor variasjon i funksjon og bruksområde, både i embryoutvikling og i sans oppfatning = tidlig utviklet reseptorsystem
- G-proteinene har mye å si for sykdom, 60% av medisiner påvirker reaksjonsporene til G-proteiner.
- Fungerer slik:
 1. G-protein sitter løst til membranen på innsiden og har en «bryter». GDP = inaktivt, GTP = aktivt.
 2. Signalmolekyl på reseptor endrer formen på reseptormolekylet. Da binder den et G-protein og spalter av GDP og putter på en GTP.
 3. G-proteinet diffunderer langs membranen og aktiverer et enzym som fører til respons i cellen
 4. Proteinet spalter selv av en P av GTP og inaktiverer proteinet: Det fungerer også som et **GTPase-enzym**
- Signalmolekyler brukes ikke opp og kan feste seg igjen og igjen. Hvor ofte dette skjer kommer an på konsentrasjonen utenfor

Tyrosinkinase-reseptor (RTK)

- Festet i membranen - har enzymaktivitet som resultat av ligand-binding
- Den intracellulære delen fungerer som en tyrosinkinase – binder en fosfatgruppe fra ATP til aminosyren tyrosin
- En RTK kan aktivere ti eller flere reaksjonsspor – skiller dem fra GPCR.
- Består av en transmembran alfahelik med et ekstracellulært ligand-sete og en intracellulær hale med flere tyrosiner.

- Fungerer slik:
 1. Sitter i utgangspunktet fra hverandre, kalles da monomerer
 2. Binding av signalmolekyl fører til at de søker til hverandre to-og-to i dimerer eller noen ganger klumper
 3. Dimerisering aktiverer reseptortyrosinkinase-delen av reseptorproteinet – alle tyrosinene får P fra ATP koblet på seg av hverandre
 4. Releproteiner binder seg til tyrosin og endrer form i ulike reaksjonsspor – disse kan være forskjellige.

Ionkanalreseptorer: Membranreseptor med en «kanal» som åpnes eller lukkes ved aktivering. Også her er det et spesifikt område der liganden binder seg.

Overflatereseptorer er 30% av alle menneskelige proteiner, men er vanskelige å kartlegge strukturelt (1% med krystallografi). De er fleksible og ustabile, men noen, slik som GPCR, har lyktes. RTK som ikke fungerer ordentlig er relatert til kreft, et eksempel er overdrevent mange HER2-reseptorer i brystkreft. Ved å introdusere ligander (Herceptin) har veksten av slik kreft blitt bremsset opp eller stanset helt.

Intracellulære reseptorer

- Finnes i cytoplasma eller i nukleus – signalmolekyler må være små eller hydrofobiske nok til å passere celle- og kjernemembranen.
 - Steroider og thyroider (tyroksider?) kan dette. I tillegg kan NO, nitrogenoksid, passere.
- Binding av ligand til disse skaper et hormonreseptorkompleks som kan påvirke for eksempel genuttrykk
- Eksempel:
 1. Aldosteron (steroid) går gjennom plasmamembranen
 2. Binder seg til reseptorprotein og skaper et aktivert kompleks
 3. Komplekset går inn i kjernen og binder seg til spesifikke gener
 4. Fungerer som en transkripsjonsfaktor og stimulerer transkripsjonen av genet til mRNA og dermed proteiner.
- Noen reseptorer er allerede i kjernen før signalmolekylet når dem.
- Mange intracellulære reseptorer er like i struktur

Transduksjon: Kaskader av molekylære interaksjoner viderefører signaler fra reseptorer til målmolekyler i cellen

- Som regel et reaksjonsspor med flere steg, gjerne i form av fosfatgrupper av og på eller andre molekyler og ioner som fungerer som beskjed
- Flere trinn gir større muligheter for **kaskadeeffekter** gjennom geometrisk økning
- Gir også flere muligheter til å koordinere og kontrollere mekanismer

Transduksjonsspor: Signalmolekyler endrer nytt molekyl som endrer nytt molekyl etc. Det er ofte proteiner som er relemolekyl – proteininteraksjon er et tema for all celleaktivitet

Protein fosfo- og defosforylering - Formendring er ofte fra fosforylering

- Gjøres av **proteinkinaser** som fosforylerer andre molekyler
 - Som regel aminosyrene serin eller treonin
 - Serin/treoninkinaser er involvert i signalspor i dyr, planter og sopp
- Relemolekyler er ofte proteinkinaser som fungerer på andre proteinkinaser – en **fosforyleringskaskade**
- Fosfatgruppen interagerer med den ladede eller polare delen av aminosyrene i proteinet som fosforyleres
- Proteinfosfataser er viktige enzymer som fjerner fosfatgrupper fra proteiner
 - Defosforylering – inaktiverer enzymet
 - Mekanisme for å skru av signalet og gjøre fosfatgrupper klart til neste signal
 - Aktiviteten av et protein regulert av fosforylering bestemmes av mengde fosfataser og kinaser.
- Proteinkinaser- og fosfataser er ekstremt viktige
 - 2% av genene koder for proteinkinaser
 - Hundrevis av forskjellige per celle som alle har et spesifikt substrat
 - Sammen regulerer de trolig en stor andel av proteinene i en celle (mange, mange hundre).

Små molekyler og ioner som sekundærbudbringere

- Det er ikke alltid bare proteiner som overfører et signal, små, vannløselige molekyler kan også gjøre dette
- Reaksjonsspor initiert av både GPCR og RTK.
- Syklisk AMP og Ca^{2+} er de vanligste

Syklisk AMP (cAMP)

- **Adenylyl cyclase** i plasmamembranen konverterer ATP til cAMP i respons på signal
- Adrenalin binder seg til reseptorprotein som igjen aktiverer dette enzymet = mye hurtigere produksjon av cAMP.
- cAMP omdannes ganske raskt til ATP igjen, så flere «runder» adrenalin kreves ofte
- Det fulle reaksjonssporet inneholder blant annet GPCR
- Andre G-proteinsystemer regulerer ved å inhibere adenylyl cyclase gjennom et **inhiberende** G-protein som binder seg til det i stedet for den «vanlige».
- Kolera modifierer et G-protein som brukes i salt- og vannsekresjon
- G-proteinet klarer ikke å hydrolysere fosfatgruppen (GTP til GDP), og aktiverer derfor adenylyl cyclase hele tiden til å lage cAMP.
- Som resultat sekreseres store mengder salt, og dermed vann etterpå ut i tarmene og du bæsjer som en gud
- Viagra inhiberer hydrolyse av cGMP til GMP slik at blodårene utvider seg

Kalsiumioner og inositol trifosfat (IP₃)

- Kalsium er mer brukt enn cAMP og har ofte høyere konsentrasjon som respons på hormoner, neurotransmittere og vekstfaktorer
 - Muskelcellekontraksjon, sekresjon av visse substanser og celledeling
- I planter: Hormonell og miljøstimuli fører til midlertidig økt kalsiumkonsentrasjon som igjen gir flere signalspor slik som å bli grønn.
- Ca²⁺ brukes både som sekundærbudbringer i både GPCR og RTK
- Kalsiumkonsentrasjoner er veldig lav i cytosol fordi det aktivt pumpes ut av cellen eller inn i ER (og noen ganger mitokondrier/kloroplaster)
- Dette betyr at en liten endring i antall Ca²⁺ utgjør en stor forskjell
- Reaksjonsporet som fører til utslipp av kalsium (gjerne fra ER) skjer gjerne følgende:
 1. Et GPCR-protein får aktiveres av et signalmolekyl fra utsiden av celler og aktiverer et G-protein, som igjen aktiverer plasmamembranenzymet **fosfolipase C**
 2. Dette enzymet kløyver et membranfosfolipid (**PIP₂**) som stikker ut på innsiden til sekundærbudbringerne **IP₃** (inositol trifosfat) og **DAG** (diacylglycerol)
 3. DAG virker et annet sted, mens IP₃ virker på ionekanaler i ER som slipper ut kalsium.

Respons: Nukleær og cytoplasmisk

- Mange signalspor regulerer proteinsyntese gjennom å aktivere transkripsjonsfaktorer, som regulerer ett eller flere gener ved å skru de av eller på
- Signalmolekyl treffer transmembran GPCR (eller RTK) → Setter i gang en fosforyleringskaskade → Siste kinase går inn i kjernen og aktiverer en transkripsjonsfaktor.
- Ikke alltid signalspor fører til transkripsjon, det kan også aktivere/deaktivere allerede eksisterende proteiner og enzymer. Eksempler er ionekanaler og andre enzymer.

Regulering av respons

- Ikke av på, heller hvor spesifikt og gjennomgående responsen er
- Fire aspekter:
 - Amplifiserende reaksjon til ett molekyl gjennom signalsporet
 - Kontrollpunkter langs signalsporet kan regulere hvor sporet går
 - Stilasproteiner bidrar til den totale effektiviteten
 - Stansingen av selve signalet

Amplifisering skjer gjennom at et signalmolekyl kan virke flere ganger på reseptormolekylet og dermed «produsere» flere molekyler før de brytes ned.

Spesifisiteten til celledesignaler og koordinasjon av respons

- Celler utsettes hele tiden for signalmolekyler, men reagerer bare på de de «skal», samtidig som to celler reagerer ulikt på samme signal

- Dette er fordi ulike celler har ulike sett med proteiner siden ulike gener er uttrykt
 - Reseptorproteiner, releproteiner, og proteiner involvert i responsen
- Trenger bare at noen av stegene er annerledes for å skape annen respons
- Ett signalmolekyl kan virke på flere reseptorer
- Ett signalmolekyl kan gi flere reaksjonsspor gjennom en RTK-reseptor eller ved en sekundær budbringer som virker på flere prosesser i cellen
- Bruken av samme protein i flere reaksjonsspor er økonomisk for cellen
- To reaksjonsspor kan konvergere gjennom at det ene sporet påvirker det andre

Effektivitet: Stilasproteiner og signalkomplekser

- De ulike komponentene i et signalspor flyter ikke fritt rundt, dette hadde vært meget lite effektivt
- **Stilasproteiner** gjør dette mer effektivt ved å ofte være permanent koblet til andre releproteiner og på den måten samle dem.
 - Kan binde seg til reseptorproteiner og igangsette signaloverføring
- Viktigheten av mer eller mindre permanente proteinkomplekser i signalisering kommer frem av at flere proteiner brukes i flere signalspor til ulike tidspunkter i cellen
- WAS-syndrom kommer av kun ett manglende releprotein som fungerer som et viktig forgreiningspunkt i signalspor og også interagerer med mikrofilamenter.

Stans (terminering) av signalet

- Essensiell del
- Hver molekylær endring må være kortvarig frem til respons
- Alle endringene er reversible gjennom at konsentrasjonen faller
- Konsentrasjonen av signalmolekyler må gjerne være over en viss terskelverdi

Apoptose integrerer flere signalspor i cellen

- Programmert død
- Stoffer i cellen kutter opp DNA og andre cellulære komponenter
- Cellen former «blebs» og vesikler med restmateriale som spises av andre celler
- Beskytter nærliggende celler som ellers ville bli påvirket av innvollene til den døde
- Signal kan komme fra utsiden (andre celler sender signal) eller fra innsiden (hvis DNA replikeres feil for eksempel)

Apoptose i en rundorm

- Voksent individ har bare ca 1000 celler
- ced-3 og ced-4 viktige gener i dette, koder apoptoseproteiner
 - Proteinene heter også Ced-3 og Ced-4 og eksisterer i inaktivert form i cellen
 - Signalet aktiverer proteinene, ikke produserer nye
- Proteinene ced-9 sitter i overflaten av mitokondriemembranen
 - Master-regulator, bremser/stanser apoptose når det ikke er aktivt
 - Ved signal: Slipper bremsen og signaliserer enzymene og proteinene (**caspaser**)

Apoptosespor og signalene som trigger dem

- Det er flere signalspor som ender i apoptose, det eksisterer 15 forskjellige caspaser
- En av dem: Mitokondrieproteiner former porer i mitokondrien, proteinene som lekker promoterer apoptose
- Signaler fra innsiden kan komme fra ER (ved dårlig proteinfolding) eller fra kjernen (ved DNA som ikke kan repareres)
- Store likheter i apoptose i ulike eukaryote organismer
- Apoptose er også viktig i embryoutvikling, det gir for eksempel fingre og hindre svømmehud
- Flere sykdommer som kreft og Alzheimer er linket til for mye eller for lite apoptose.

Kapittel 10: Cellerespirasjon

Katabolske reaksjonsspor bryter ned organisk materiale og skaper energi

Organiske stoffer har lagret energi og kan avgi det i exergone reaksjoner. Enzymer bryter ned disse stoffene til enklere og enklere molekyler. Energien brukes til arbeid, eller forsvinner som varme. **Fermentering/gjæring** er en måte å utvinne litt energi fra ved å **delvis** bryte ned sukker og organiske molekyler uten å bruke oksygen, men **aerob respirasjon** er den mest effektive. De fleste eukaryote og prokaryote celler kan gjøre dette. Noen prokaryoter bruker andre stoffer enn oksygen, da kalles da **anaerobt**.

Organisk stoff + oksygen → CO₂ + H₂O + Energi

- De fleste katabolske pathways bruker redoksreaksjoner for å skaffe energien.
- Ved å relokere elektroner brukes den lagrede energien til å danne ATP
- Mye av energien brukes på å opprettholde miljøet inni cellen.

Oksidasjon av organiske molekyler under celleånding

- Druesukker oksideres, O₂ reduseres. Elektroner mister potensiellenergi når de overføres til et mer elektronegativt atom.
- Stoffet med mange H-atomer er gode brennstoffer fordi hydrogen har mange «baketopp»- elektroner som kan overføres til en tilstand med lavere energi, og dermed frigjøre energi til danning av ATP.
- Fett og karbohydrater er store reservoarer av elektroner assosiert med hydrogen – E_a hindrer dem i å reagere med luft. Enzymer i magen senker den barrieren.

Stegvis energiuthenting via Nad⁺ og elektrontransportkjeden

Glukose brytes ned stegvis siden man ikke kan utnytte alt på en gang (tenk bensintank som eksploderer). Elektroner rives gradvis av produktene, ofte i par med et proton (Aka H⁺). **NAD⁺** (nicotinamid adenin dinucleotid) bærer elektronet veldig lett fordi den kan lett reduseres til **NADH**. Dette skjer ved at enzymer som kalles **dehydrogenaser** fjerner **to** hydrogenatomer fra substratet og danner de to elektronene og ett proton til NAD⁺. Da

nøytraliseres ladningen. Ett H^+ går ut av reaksjonen. Elektronene mister veldig lite energi av å bli overført til $NAD^+/NADH$ = lagret energi til bruk i ATP-syntese.

Overføring av elektroner fra hydrogen til oksygen representerer veldig mye energi. Denne energien høstes gradvis i en **elektrontransportkjede**: En serie proteiner i mitokondriene (eller indre membran til prokaryoter) dytter elektronene nedover i en serie energigivende reaksjoner. Hver protein er mer elektronegativt enn det forrige, og helt nederst ligger O_2 som til slutt tar imot elektronet sammen med ett proton. Totalt sett gir reaksjonen $NADH \rightarrow O_2$ en endring i fri energi på -222 kJ/mol.

Celleåndingen, cellulær respirasjon går i tre steg, der de to første er katabolske reaksjonsspor

- **Glykolysen:** I cytosol, bryter ned glukose til 2x pyruvat
- **Pyruvat oksidering og sitronsyresyklusen:** Pyruvat oksideres til acetyl CoA og brytes ned til CO_2 i sitronsyresyklusen.
- **Oksidativ fosforylering:** Elektroner fra $NADH$ går nedover kjeden og til O_2

Man skiller mellom **oksidativ** fosforylering og **substrat-nivå** fosforylering. Oksidativ danner 90% av ATP, mens de resterende 10% kommer fra fosfatgrupper som slenges av og på substrater av glukose under glykolysen og sitronsyresyklusen.

Glykolyse høster kjemisk energi ved å oksidere glukose til pyruvat

Foregår i cytosolen. Glukose spaltes til to tre-karbon sukker, oksideres og re-arrangeres til to molekyler **pyruvat**. Prosessen deles inn i to **faser** der den innledende investeringsfasen **braker** to ATP, men det følger en **payoff-fase** der det dannes 4 ATP og 2 $NADH$. Dette kan foregå **uten** oksygen. Hvis oksygen er til stede går pyruvat inn i mitokondriene:

Glykolysen steg for steg

Glukosemolekylet navngis på plassene 1-6.

1. Enzymet **hexokinase** bruker 1 ATP til å fosforylere glukose på 6-karbonet. Det nye stoffet heter da **glukose 6-fosfat**. Ladningen fanger glukosen inni cellen.
2. Enzymet **fosfoglukoisomerase** omdanner glukose 6-fosfat til **fruktose 6-fosfat**. Det har nå to «hanker» av CH_2OH , men den ene er fosforylert.
3. Enzymet **Fosfofruktokinase** fosforylerer andre hanken, stoffet heter nå **fruktose 1-6 bisfosfat**. Det er nå brukt 2 **ATP**.
4. Enzymet **aldolase** kløyver molekylet til **P3P** (triosefosfat) og **DHAP** som kan omdannes tilbake med **isomerase**.
5. (nå er vi i 2 ganger). Karbonylgruppen i G3P oksideres til en karboksylgruppe av NAD^+ og energien brukes til å påsette en fosfatgruppe der. Enzymet som brukes heter **triosefosfat dehydrogenase**. Nytt stoff heter 1,3 – bisfosfогlycerat.
6. Enzymet **fosfогlycerokinase** fjerner den ene fosfatgruppen og danner 2 **ATP**. Nytt stoff heter 3-fosfогlycerat.

7. Enzymet **fosfoglyceromutase** overfører den gjenværende fosfatgruppen til det midterste karbonet. Stoffet heter nå **2-fosfoglycerat**.
8. Enzymet **enolase** spalter av et vannmolekyl slik at det dannet en dobbeltbinding mellom to karboner. Nytt stoff heter **PEP**.
9. Enzymet **pyruvat kinase** fosforylerer ADP. Nytt produkt er **pyruvat**.
10. Fosfoglukoisomerase (evnt glukose-6-fosfat isomerase) konverterer glukose 6-fosfat til isomeren fruktose 6-fosfat.
11. Fosfofruktokinase overfører en fosfatgruppe (ATP-forbrukes) til 1-posisjonen og danner fruktose 1,6-bisfosfat. Veldig energirikt molekyl
12. Aldolase kløyver fruktose 1,6-bisfosfat til glyseraldehyd 3-fosfat og dihydroxyacetonfosfat (sammen = triosefosfat!)
13. Triosefosfatisoerase katalyserer den reversible isomeriseringen av glyseraldehyd 3-fosfat (går videre!) og dihydroxyacetonfosfat
14. Glyseraldehyd 3-fosfat blir oksidert og overfører elektroner til NADH. Energien fra reaksjonen brukes til å fosforylere (fosfor fra cellen, ikke ATP) glyseraldehyd 3-fosfat til 1,3 bisfosfoglyserat – svært reaktivt!
15. Fosfatgruppe på 1-posisjonen blir overført til ADP (substratnivå-fosforylering). Karbonylgruppe 1,3 oksideres til en karboksylgruppe og gir 3-fosfoglyserat.
16. Fosfoglyseratmutase omdanner 3-fosfoglyserat til 2-fosfoglyserat (fosfatgruppe overføres fra 3 til 2)
17. Enolase innfører en dobbeltbinding i 2-fosfoglyserat (spalter av H₂O) og produserer fosfoenolpyruvat (PEP) energirikt.
18. Pyruvatkinase (PK) katalyserer overføring av fosfatgruppe i PEP til ADP (andre substratnivå) og danner pyruvat.

Oksidering av pyruvat til Acetyl CoA

1. Aktiv transport inn i cellen. Pyruvatdehydrogenase er et multikompleksenzym som sørger for å oksidere pyruvatet gjennom en serie komplekse reaksjoner:
2. Karboksylgruppen (-COO⁻, fullstendig oksidert og dermed lite energi) spaltes av og blir **CO₂** (første steg der CO₂ frigjøres)
3. Gjenværende to-karbonfragmenter oksideres til **acetat** (CH₃COO⁻) og elektronet settes på en NAD⁺ til NADH
4. Koenzym A, svovelholdig stoff av B-vitamin, linkes kovalent til acetat via svovelatomet: Høy potensiell energi

Sitronsyresyklusen (krebs)

Oksidering av pyruvat teller som en del av denne. Den mater ut 2 CO₂ per runde og en ATP, men også 3 NADH og 1 FADH₂. Den har åtte steg som kjennetegnes av hver sitt enzym:

1. **Citrat-syntase.** Oxaloacetat fra forrige runde får to-karbon acetylgruppen fra acetyl CoA, som går ut av syklusen og brukes på nytt som bare CoA. Det er nå totalt **fire** karbon, to fra oxo og to fra acetylgruppen. Nytt stoff heter **citrat**.
2. **Aconitase.** Citrat mister og får et molekyl H₂O for å konverteres til **isocitrat**.
3. **Isocitrat-dehydrogenase.** Isocitrat oksideres slik at det dannes 1 **NADH**. Produktet mister så et molekyl **CO₂**.
4. **Alfa-ketoglutarat dehydrogenase komplekset.** Nytt produkt: Alfa-ketoglutarat, mister nok et molekyl CO₂ (dekarboksyleres) og produktet oksideres slik at det dannes mer **NADH**. Koenzym A binder seg ustabil, og produktet heter nå **Ravsyre-CoA**. Høy energi!
5. **Ravsyre CoA-syntetase:** CoA erstattes av en fosfatgruppe som igjen overføres til GDP til GTP, et stoff som minner i funksjon om ATP. Det kan brukes til å danne mer ATP eller brukes i energi direkte. Produkt = **ravsyre**
6. **Ravsyre dehydrogenase:** To hydrogen overføres til FAD og danner FADH₂, produkt = **fumarsyre**
7. **Fumarase:** Vann går inn og endrer bindingen til **eplesyre**
8. **Malat dehydrogenase:** Malarat/eplesyre oksideres og det dannes et NADH, produkt = **Oksalacetat**

Siden det er **to** pyruvat vil hvert molekyl glukose danne **6 NADH, 2 FADH₂ og 2 ATP (GTP)**

Alle enzymene som inngår ligger i mitokondriematriksen **unntatt** ravsyre-dehydrogenasen, den er lokalisert i den indre mitokondriemembranen.

Flere av substratene som inngår i glykolysen og sitronsyresyklusen er også viktige komponenter i bl. a. produksjon av aminosyrer, så det «høstes» stadig ut av syklusen etter behov.

Oksidativ fosforylering

Elektrontransportkjeden er en rekke makromolekyler i indre membran i mitokondriene hos eukaryoter eller i plasmamembranen hos prokaryoter. Den indre membranen er foldet (structure fits function) for å få så stor overflate til dette som mulig. De fleste komponentene i kjeden er proteiner nummerert I til IV. **Prosthetic groups** (hardt bundet strukturelt), er komponenter som noen enzymer behøver for å fungere. Proteinene blir redusert når de mottar et elektron fra en kis over, og oksideres når de gir den videre nedover stigen. De avgir fri energi nedover, med andre ord.

1. NADH gir fra seg de to elektronene til FMN (et flavoprotein – har prostetisk gruppe flavin mononukleotid) i kompleks I.
2. Dette gir det videre til et jern-svovel-protein (Fe.S) i kompleks I, som gir det videre til

3. **Q**, et **ikke-protein** kalt ubiquinone (koenzym Q₁₀). Hydrofobisk molekyl, eneste ikke-protein i kjeden. Det er en mobil bærer i hele membranen i stedet for å fitte fast til et kompleks. Gir fra seg elektroner til kompleks III!
4. De fleste gjenværende proteinene er **cytokromer**, proteiner med en prostetisk hem-gruppe (jernholdig) til å ta opp og gi fra seg elektroner. (a, b, c sier hvilken hem-gruppe)
5. Til slutt i kjeden gis to elektroner til oksygen, den **terminale elektronakseptor** (svært elektronegativt), og den snabber med seg **2 H⁺** og danner vann.

FADH kan også brukes i kjeden, men vi gå inn via kompleks II. Dette gir et lavere energiutbytte (1/3 mindre), siden det ligger på et lavere energinivå.

Kjemiosmose – energybindingsmekanismen

I plasmamembranen på prokaryoter eller indre mitokondriemembranen sitter **ATP-syntase**. Det er en svært kompleks struktur som bruker forskjellen i konsentrasjon av H⁺ mellom indre membran og cytoplasma til å generere ATP. Den består av to hovedsubenheter: F₀ og F₁. F₁ går ut i cytosol og er ikke nær membranen.

ATP-syntase fungerer litt som et vannhjul drevet av protoner. Protonene beveger seg enkeltvis gjennom en kanal i stator-delen som er forankret i membranen. Protonene binder rotordelen i membranen og får den til å rotere. Hvert proton blir med på en rotasjon før den sendes ut gjennom en annen kanal i stator-delen. Rotordelen er koblet til en slags stavformet struktur som er stukket inn i en katalytisk subenheten av F₁. Denne rotasjonen av **staven** i den rigide katalytiske delen driver formasjonsendringer av enzymer og produksjonen av ATP.

Forskjellen opprettholdes av elektrontransportkjeden som pumper H⁺ fra innsiden av mitokondriene ved at kompleksene I, III og IV i kjeden i tillegg til å overføre et elektron også tar opp et H⁺ som det sender ut i mellomrommet. Kjemiosmose er dermed en «energy-coupling» mekanisme som bruker energi lagret i en H⁺-gradient til å drive ATP-syntase.

- Kjemiosmose skjer også andre steder, som for eksempel ATP-generering i kloroplastene fra lysenergi, eller i cellemembranen til prokaryoter der H⁺-gradienten brukes til å lage ATP, drive falgeller (H⁺ driver rotor) og pumpe ut avfallstoffer.

ATP-oppgjøret

- Ca 34% av energien i et glukosemolekyl blir omdannet til ATP, maksimum 32 ATP
- 4 ATP produseres ved substratnivåfosforylering ved glykolysen og sitronsyresyklusen
- Hvert NADH-molekyl kan sette opp en H⁺-gradient som gir maks 3 ATP
- I praksis produserer hvert NADH 2,5 ATP, mens FADH₂ produserer 1,5 ATP.
- Det koster å sende 2 pyruvat og 2 NADH fra glykolysen inn i mitokondriene.
 - NADH som sendes inn i cellen kan både regenereres til NADH **eller** FADH₂
- **Andre grunner:**
 - Transport av NADH fra cytosol varierer mellom ulike celler
 - Noen celler produserer mer FADH₂ enn andre celler
 - En del energi blir brukt til å transportere andre substrater inn i mitokondrien.

Fermentering og anaerob respirasjon

- De fleste typer cellulær respirasjon trenger O_2 som terminal elektronakseptor for å produsere ATP
- Celler har to muligheter for å oksidere organiske molekyler og produsere ATP uten å bruke O_2
- Anaerob respirasjon benytter en elektrontransportkjede, mens fermentering kan kjøres helt uavhengig enn det.
- Mange bakterier lever i oksygenfrie miljø – har en annen elektronakseptor
 - Eks: Sulfatreduserende marine bakterier har SO_4^{2-} som terminal elektronakseptor
- Fermentering høster kjemisk energi uten å benytte elektrontransportkjede eller oksygen
- Ved oksidering av glukose i glykolysen produseres det 2 ATP.
 - Dette forbruker 2 NAD^+ , og man behøver da et system til å regenerere NAD^+

Fermentering

- Benytter substratnivåfosforylering i stedet for elektrontransportkjede
- Man må dermed kunne gjendanne NAD^+ som elektronakseptor
- Normalt dannes NAD^+ ved elektronoverføringer i elektrontransportkjeden
- **Alkoholfermentering:** Totrinnsprosess:
 - Pyruvat blir først dekarboksylert til acetylaldehyd (katalysert av pyruvat dekarboksylase)
 - Acetylaldehyd blir redusert av $NADH$ og gir etanol og NAD^+ (katalyser av alkohol dehydrogenase)
- **Melkesyrefermentering:** Ettrinnsprosess:
 - Pyruvat blir redusert direkte til laktat uten frigjøring av CO_2 , $NADH$ oksideres til NAD^+ som igjen kan brukes i glykolysen (katalysert av melkesyre dehydrogenase)
 - Muskelceller produserer laktat hvis det oppstår mangel på oksygen

Cellulær respirasjon er enormt mye mer effektiv enn fermentering, 32 vs 2 ATP. Obligate anaerobe organismer overlever ikke i nærvær av oksygen, mens fakultativt anaerobe organismer kan overleve i begge miljø.

Glykolysen i evolusjonært perspektiv

- Må ha utviklet seg på et svært tidlig tidspunkt
- Første prokaryote organismene brukte glykolysen til å produsere ATP på en tid da det ikke var oksygen i atmosfæren
- Oksygen er et biprodukt av fotosyntesen etter at de første cyanobakteriene (grønnalger) oppstod for ca 2,7 mrd år siden
- Glykolysen er lokalisert i cytosolen, som er en god indikasjon på dens tidlige opphav

- De første eukaryote cellene oppstod for ca 2 mrd år siden, selv om dette er svært omstridt.

Glykolysen og sitronsyresyklusen sin kobling til andre metabolske spor

- Glukose utgjør en relativ liten del av vårt kosthold. Vi får mest energi fra stivelse/disakkarider, proteiner og fett
- Disse brytes ned via ulike katabolske spor for å skape komponenter til glykolysen og sitronsyresyklusen.
- Stivelse kan hydrolyseres til maltose og glukose og omsettes i glykolysen og sitronsyresyklusen
- Glykogenlagrene våre i lever og muskler kan hydrolyseres til glukose
 - **Glykogen-fosforylase** bryter av kjeden ved å tilføre fosfat og danner glukose 6-fosfat som kan omdannes til glukose 6-fosfat og deretter fortsette glykolysen!
- Proteiner må brytes ned i aminosyrer og deamineres (fjerne aminogrupeer) og omdannes til mellomprodukter som kan gå inn i glykolysen eller sitronsyresyklusen
- Fett (triglyserider) blir brutt ned til glyserol og fettsyrer. Glyserol omdannes til glyseraldehyd-3-fosfat og går inn i glykolysen. Fettsyrene omsettes ved **betaoksidasjon** og har sluttprodukt acetyl CoA og NADH og FADH₂ som går inn i sitronsyresyklusen.
-

Anabolske reaksjonsspor

- Ikke alt brytes ned gjennom glykolysen – noe blir benyttet i anabolske (produserende) spor
- Metabolitter i sitronsyresyklusen kan benyttes til å lage ca halvparten av de 20 aminosyrene.
- De essensiell må suppleres fra dietten
 - Fenylalanin, valin, teonin, tryptofan, metionin, leucin, isoleucin, lysin og histidin.
- Glukosen kan produseres fra pyruvat og fettsyrer kan syntetiseres tilbake fra acetyl CoA.

Regulering av metabolisme i celler

- Tilbud og etterspørsel regulerer produksjonen av en gitt metabolitt
- Høyt nivå av en aminosyre betyr at biosyntesesportet til den aminosyren kan slås av eller nedreguleres
 - Vanligste måten er feedback-inhibering
 - Sluttproduktet inhiberer et av enzymene tidlig i reaksjonsspoeret
- Cellulær respirasjon øker hvis ATP-konsentrasjon synker
- Enkelte enzym spiller en nøkkelrolle her:
 - Fosfofruktokinase som katalyserer det tredje trinnet (produksjon av fruktose 1,6 – bisfosfat, permanent endring).

- Fosfofruktokinase er et allosterisk enzym som inhiberes av ATP og stimuleres av AMP (adenosin-monofosfat)
- Inhiberes også av citrat fra sitronsyresyklusen

Kapittel 11: Fotosyntetiske prosesser

- Fotosyntese forsyner jorden med all den næring via solen
- Autotrofer (selvforsynte) = Produsenter. Planter er fotoautotrofe
- Heterotrofer = konsumenter
- Man regner med at fotosyntese startet med bakterier som hadde foldet membran med fotosyntetiserende molekyler rundt – Første alger 700m år siden
- Endosymbiontteorien tenker at kloroplasten var en fotosyntetiserende prokaryot (beslektet med cyanobakterier) som ble en del av en eukaryot gjennom endocytose.

Kloroplastene (har eget DNA som er «uavhengig» av cellen – støtter endosymbiontteorien

- Som regel i **mesofyllcellen**, vev i indre blad, men finnes også i stilk og frukt (umoden)
- Half million per kvadratmillimeter
- CO₂ og O₂ ut og inn av spalteåpninger, vann fra stilk og gjennom planteårer
- Ca 30-40 kloroplaster per mesofyllcelle

- Dobbel membran som omslutter **stroma**
- Tredje membransystem i stroma kalt **thylakoidene** med **lumen(?)** inni
 - Kan stables til granum, grana i flertall
 - Klorofyll inni thylakoidmembranen i kloroplasten

- **Fotosyntese som redoksreaksjon:**
 - $\text{Energi} + 6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$
 - Egentlig brukes det 12 vann, men det gis 6 tilbake
 - CO₂ reduseres til sukker (egentlig en trekarbon)
 - H₂O oksideres til luft
 - Endergon reaksjon – trenger energi fra solen for å dytte «oppover» kjeden.

Eksperimenter man isotopen oksygen-18 viste at oksygenet som frigjøres ved fotosyntesen kom fra vann, og ikke karbondioksidet. Før var det en tanke at planten tok opp karbondioksid og splittet dette, men det viste seg å være feil. Hydrogenatomene ligger både i vannet som ble igjen og i sukkeret.

Kjapp oversikt over fotosyntesen

To prosesser med flere steg i hver prosess:

- Lysreaksjonene (foto)
 - Skjer i **tylakoidene**
 - Solenergi til kjemisk energi
 - H₂O splittes – gir elektroner og protoner og avgir O₂ som biprodukt
 - NADP⁺ aksepterer elektronene og protonene pga. lys fra klorofyll
 - **Fotofosforylering**: Genererer ATP gjennom kjemiosmose (P til ADP)
- Calvinsyklusen (biosyntese)
 - Skjer i **stroma**
 - Karbonfiksering: CO₂ bindes til organiske molekyler i kloroplasten
 - NADPH reduserer det fikserte karbonet til karbohydrater ved hjelp av ATP
 - Lysuavhengig reaksjon – den går uten lys (CAM)

Cellen har skilt mellom bærere for anabolske (NADP⁺) og katabolske (NAD⁺) reaksjoner

Først: Hvordan fæn funker lys egentlig

- Elektromagnetisk energi
- Lys fungerer som partikler ved at fotoner bærer energi
 - Høyere frekvens og lavere bølgelengde – mer energi. Lilla dobbelt så mye som rød.
- Fotosyntese virker bare med det synlige lyset
- Pigmenter: stoffer som absorberer lys
 - **Absorbsjonspektre** viser hvilke bølgelengder som absorberes via et spektrofotometer
 - **Aksjonsspektrum** viser fotosyntetisk aktivitet opp mot bølgelengder
 - Klorofyll absorberer lilla-blå og rødgult, reflekterer grønt
- Det tilgjengelige lysspekteret utvides av flere pigmenter
 - Klorofyll a reflekterer blågrønt
 - Klorofyll b reflekterer olivengrønt (accessory pigment)
 - Karotenider utvider muligens spekteret, men spiller en rolle i **fotoinhibering**: De beskytter klorofyllet mot skadelige lysbølgelengder (accessory pigment). De finnes også i vårt øye

Klorofyll består av en porfyrin-ring med et fytol-sidegruppe (hydrofob: kan ankre det fast til membranen). Ved å modifisere posisjon C7 i ringen til klorofyll a fra CH₃ til CHO får du klorofyll b – partielt overlappende absorpsjonsspektrum.

Eksitasjon av klorofyll: Klorofyllet eksiteres av lysenergien

- Fotonene som absorberes er bare de som har energi tilsvarende den eksiterte- og grunntilstanden = unikt absorpsjonsspektrum for hvert stoff
- Når de faller tilbake avgis det som varme og noen ganger lys (fluorescens, fotoner)

Fotosystemet – et reaksjonscenterkompleks som høster lys via andre komplekser

- Klorofyllmolekylene er organisert i thylakoidmembranen med andre små organiske molekyler og proteiner i **fotosystemer**
- Et reaksjonscenterkompleks omgitt av lyshøstingskomplekser (se illustrasjon)
- **Reaksjonscenterkomplekset** består av **to** spesielle klorofyll a-molekyler og et molekyl som kan akseptere elektroner og reduseres: **primærakseptor**
- **Høstingskompleksene** rundt RSK består av pigmenter som kan være både a, b og karotenoider
 - Energi fanges av HK og eksiterer pigment til pigment frem til RSK
 - De spesielle klorofyll a-molekylene har et kjemisk miljø som gjør at de kan overføre et elektron til primærakseptoren i stedet for å eksiteres
 - Uten akseptor = fluorisering (flaske med bare klorofyll fluoriserer)
- I thylakoidmembranen ligger **fotosystem II** (oppdaget sist, men fungerer først) og **fotosystem I**.
- Karakteristiske reaksjonscenterkompleks: Bestemt primærakseptor og bestemt «spesiell klorofyll a».
 - Fotosystem II: Klorofyll a heter P680 (absorberer 680nm, rød, best)
 - Fotosystem I: Klorofyll a heter p700 (absorberer rød-gul ++, eller «far red»)
- Klorofyllmolekylene er nesten identiske, men **miljøet** gjør at de eksiteres av litt forskjellig lysenergi

Lineær elektrontransport

- Energioverføringen skjer gjennom en strøm av elektroner gjennom fotosystemene og andre molekylære komponenter bygget inn i membranen:
 1. Lys treffer PSII og eksiterer et pigment. Elektronet faller tilbaket og avgir energi som eksiterer et annet og så videre, helt til et elektron i P680-paret eksiteres
 2. Elektronet overføres til primærakseptoren, P680⁺ er gjenværende.
 3. P680⁺ er det sterkeste biologiske oksidasjonsmiddelet vi kjenner til – H₂O spaltes til to elektroner, to H⁺ og et oksygenatom.
 - Elektronene fyller «hullet» i P680⁺
 - H⁺ går ut i thylakoid-innsiden (lumen)
 - O går sammen med en annen og danner O₂
 4. Primærakseptoren overfører elektronet ned en elektrontransportkjede litt som i celleånding til PSI.
 - PSII → Plastoquinon (Pq) → Cytokrom-kompleks → Plastocyanin (Pc) → PSI
 5. ATP produseres av elektrontransportkjeden siden cytokrom-komplekset pumper H⁺ inn i lumen som skaper en proton-gradient.

6. I PSI har høstingskomplekset eksitert elektroner frem til P700 sitt elektronpar – disse overføres til PSI sin primærakseptor. **Elektronhullet fylles av elektronet fra PSII**
7. Fotoeksiterte elektroner fra PSI går ned en ny transportkjede gjennom proteinet **ferredoxin** (Fd) – Her pumpes ingen protoner = ingen ATP
8. Enzymet **NADP⁺ reduktase** tar to elektroner fra Fd, NADP⁺ og en H⁺ fra **stroma** og danner NADPH.
 - Elektronet bundet til NADPH har mye større energi enn H₂O
 - Sitter på stroma-siden

Syklisk elektrontransport

I noen situasjoner vil Fd (proteinet) overføre elektronet det fikk av primærakseptoren i PSI tilbake til cytokrom-komplekset i stedet for til NADP⁺-reduktase og dermed produsere ATP slik. Dette produserer ikke NADPH og elektronet fyller hullet til P700 som «vanlig». Hos flere av de fotosyntetiserende bakteriene finnes ikke begge fotosystemene, men har i stedet bare ett som minner om PSI. Da er syklisk elektronflyt eneste måten å overføre energi på. Lilla og grønne svovelbakterier gjør dette, og antas å være etterkommere av de første fotosyntetiserende bakteriene.

Noen grupper, som cyanobakterier og visse eukaryote arter som er testet, kan gjøre begge oppleggene. Det er kanskje en evolusjonær leftover, men ved å stenge av genet som koder for syklisk elektronflyt klarer mange arter seg dårligere i sterkt lys – så det har kanskje effekt. Mangelen på syklisk elektrontransport kan skape for mye NADPH i kloroplasten.

Kjemiosmose i kloroplaster vs mitokondrier

- Elektrontransportkjede pumper protoner gjennom en membran for å skape proton-motiv kraft
- ATP-syntasekompleks i samme membran energikobler diffusjonen til fosforylering av ADP – de er ganske like, men ikke 100%
- Mange av elektronbærerne i transportkjedene er ganske like, og ATP-syntasekomplekset er også ganske likt
- Begge drar nytte av H⁺-gradienten (Kloroplast: Høyt i lumen, lavt i stroma) (Hos mitokondrier: Høyt i mellommembranen, lavt i matriks)
- Hos kloroplaster kommer elektronene fra H₂O, mitokondriene fra organiske molekyler.

ATP og NADPH dannes i stroma av NADPH, der de brukes til å drive Calvinsyklusen. Den katalytiske «knob»-en sitter dermed på stroma-siden. I mitokondriene dannes ATP på innsiden (matriks), der det fraktes ut med spesielle transportproteiner. Dette må tegnes!

Calvinsyklusen

Calvinsyklusen er anabolsk, altså krever energi, for å bygge om CO₂ til sukker. ATP brukes til energi, mens NADPH brukes for å legge til elektronene. Produktet er et tre-karbon sukker kalt **glyseraldehyd 3-fosfat** (G3P). Dette krever at syklusen går **tre ganger**, ett per CO₂-molekyl som inkorporeres

1. **Karbonfiksering:** Hvert CO₂-molekyl fikseres til **ribulose 1,5-bisfosfat** (RuBP) ved hjelp av enzymet **rubisco** (ribulose bisfosfat karboksylase oxygenase). Produktet lever kort og splittes i to (en per CO₂) molekyler til **3-fosfoglyserat**. Seks totalt, altså.
2. **Reduksjon:** 6 ATP brukes (fosfoglyserat kinase) til å feste en fosfatgruppe på den ene siden av molekylet slik at den har en fosfatgruppe på hver side: **1,3-bisfosfoglyserat**. 6 NADPH brukes (glyseraldehyd fosfat dehydrogenase) og reduserer molekylet, det mister en fosfatgruppe igjen og blir **glyceraldehyd 3-fosfat** (G3P)
 - NADPH reduserer en karboksylgruppe hos 1,3-bisfosfoglyserat til en aldehydgruppe = mer energi
 - G3P er et sukker som også dannes i glykolysen ved å splitte glukose, den kan brukes til MASSE GØY (aka triosefosfat)
 - Av de seks molekylene G3P som dannes går **bare ett ut av syklusen**, de fem andre behøves for å danne 3 molekyler RuBP
3. **Regenerering a RuBP:** De 5 G3P-molekylene som er igjen omdannes i en serie reaksjoner som bruker 3 ATP til å danne 3 molekyler RuBP. 5x 3-molekyler danner altså 3x 5-molekyler.

Netto her er 9 molekyler ATP og 6 molekyler NADPH per 3 molekyler CO₂. ATP og NADH får planter fra fotosystem II og I, mens G3P-molekylet brukes videre i cellen og til bygging.

Alternative mekanismer for karbonfiksering

Det er viktig for en plante å kunne balansere fordampning med fotosyntese. Spalteåpningene er der den får inn stoffer til fotosyntesen, men der er også der det fordampes mest. Når det er varmt lukker cellen spalteåpningene som fører til mer O₂ inni planten fra lysreaksjonene og mindre CO₂. Dette favoriserer **fotospirasjon**:

C₃-planter heter dette fordi det første produktet er en trekarbonforbindelse. Ris, soya og hvete er dette. Rubisco har evnen til å binde O₂ i stedet for CO₂. Dette produktet splittes, og et to-karbon sendes ut av kloroplasten der peroksisomer og mitokondrier omdanner det til CO₂. Dette koster energi og gir null ATP/NADPH, samt at de stjeler organisk materiale.

- Regner med at det er fra en tid med lite oksygen – at rubisco kunne binde oksygen hadde ikke så mye å si på den tiden
- Forskning viser at planter uten fototranspirasjon tar mer skade av lys

C4-planter fikserer karbon med et fire-karbonstoff som første produkt. Denne formen har utviklet seg **uavhengig** 45 forskjellige ganger og brukes i mange tusen arter i 19 familier. Korn, noen typer gress.

- To typer celler: Parenkymceller og mesofyllceller
 - Parenkymceller er **pakket tett i en slire rundt årene i bladet** med litt løsere pakket mesofyllceller rundt.
 - Calvinsyklusen foregår mest i parenkymcellene, men CO₂ bindes til organiske stoffer i mesofyllcellene først
1. Enzymet **PEP karboksylase** legger til CO₂ til PEP (fosfoenolpyruvat) som danner firekarbonet **oxaloacetat**. PEP karboksylase digger CO₂ mer enn rubisco og liker ikke O₂
 2. Mesofyllcellene eksporterer firekarbonet (eks: eplesyre) inn i parenkymcellene,
 3. CO₂ spaltes av og går inn i calvinsyklusen. Resten er pyruvat (3C), som ved hjelp av ATP konverteres til PEP tilbake i mesofyllcellene.
 4. Ekstra ATP dannes av syklisk elektronflyt i parenkymceller, de har bare PSI, ikke PSII.

C4-sporet øker konsentrasjonen av CO₂ i parenkymcellene. Det krever ATP, men øker effekten av Calvin-syklusen.

CAM-planter

- Binder CO₂ i organiske syrer i løpet av natten
- Kjører lysreaksjoner og dagen og frigjør CO₂ fra de organiske syrene som brukes i calvinsyklusen
- CAM plantene kjører både fiksering og frigjøring til syklus i samme celle, men gjør det første og natten og det siste om dagen. Dette gjør at de kan lukke spalteåpningene om dagen.

Kapittel 12: Mitose

Mitose er en helt grunnleggende egenskap av liv – evnen til å produsere mer av seg selv. «Omnis cellula e cellula» - hver celle fra en celle – beskriver at alle celler har opphav fra et sted. Mitose er helt nødvendig for prokaryoter (siden de er encellede), og for vekst hos eukaryoter etter sammenslåing av kjønnsceller. Fornying av vev, vekst, reparasjon, reprod.

Mitose er celledeling som gir identiske datterceller: Det er mye mer komplekst enn å vokse og så knipe seg i to. Det genetiske materialet blir kopiert og helt nøyaktig fordelt på to nye celler.

Det genetisk materialet, eller **genomet**, er 2m med DNA, med andre ord veldig tettepakket i kromosomer. Utfordringen er å kopiere opp alt dette nøyaktig! $3(6) * 10^6$ baser?

- **Kromatin** er DNA + proteinene som bygger opp kromosomene
- DNA-tråden er surret rundt proteinkompleks kalt **histoner**
- Histoner med DNA-rundt kalles **nukleosomer**
- Nukleosomer pakkes igjen tett inn i kromosomer

Fordeling av kromosomer i eukaryotisk celledeling

- Før og under DNA-replikasjon er kromosomene løse kromatinfibre
- Etter replikasjon: Tettepakket og sammensurret i to **søskenkromatider**
 - Festet sammen hele veien på langs av proteinkomplekser: **Kohesiner**
 - **Sentromer**: Område der de er festet ekstra godt sammen: Proteiner bundet til sentromer-DNA gir «smal midje».
 - Fire «armer» på hver side av sentromeren (når duplikert)
- Etterfølges av **cytokinese** – deling av cytoplasmaet

Faser i celledyklusen (fra kopiert celle til ny kopiering)

- **M-fase** (mitosefase): Består av mitose og cytokinese. Bare en kort, kort del totalt.
- **Interfase**: Står for 90% av syklusen, deles inn i subfaser:
 - **G1**: «First gap»
 - **S-fase**: «Syntesefase»: Duplikasjon av kromosomer
 - **G2**: «Andre gap»
- Man kaller G-fasene gaps fordi man ikke trodde noe skjedde der, men vet i dag at i alle delfasene vokser cellen, produserer proteiner, ER, mitokondrier etc.
- Hos en «eksempelcelle» kan en syklus gå i 24 timer, hvor lenge G- og S-fasene varer kommer an på cellen og dyret:
 - M-fase i 1 time
 - S-fase i 10-12 timer
 - G2 i ca 6 timer
 - G1 i 5 timer
- Noen celler deler seg svært sjelden (eller aldri!) og er i en G0/G1-fase. Da gjør de jobben sin og fungerer som en celle skal gjøre. Eksempler på dette er hjerneceller, muskelceller i hjertet og nerveceller. Leverceller gror bare tilbake, de fornyes ikke

Fullstendig oversikt over celledelingen

G2 – dette er siste del av interfasen og teller ikke

- Kjernemembranen omslutter nukleus
- En eller flere nukleoli (tett område med RNA i kjernen) ligger i kjernen
- To sentrosomer (2 sentrioler i hver) har blitt dannet gjennom duplikasjon av den ene som er der
- Kromosomene duplisert i S-fasen er **ikke** kondensert enda

Profase

- Kromatinfibrene kveiler seg sammen og kondenserer – synlig i lysmikroskop
- Nukleoli forsvinner
- Kromosomene opptrer som søsterkromatider festet i sentromerer eller langs hele (søsterkromatidkohesjon)
- **Mitotisk spindel** vokser ut: Består av sentrosomer og mikrotubuli som vokser ut av dem i «stjerneform», men bare noen vokser hele veien ut. De som ikke vokser hele veien og danner stjerneform kalles **aster**
- Sentrosomene dyttes vekk fra hverandre, delvis på grunn av mikrotubula som vokser mellom dem

Prometafase

- Kjernemembranen «sprekker» opp – mikrotubuli kan nå gå inn og ta tak i kromatider
- Hvert kromosom har blitt pakket enda tettere sammen
- Hvert søsterkromatid har en **kinetokor** – en spesialisert proteinstruktur på sentromeren
- Mikrotubuli fester seg til kinetokorene fra hver side (blir kinetokor-mikrotubuli) og drar søsterkromatidene frem og tilbake
- Mikrotubuli som ikke fester seg til kinetokoren fester seg til hverandre fra motsatt side
- Sentrosomene er på hver sin side av cellen

Metafase

- Søsterkromatidene ligger i ekvatorialt plan mellom dem (metafase-plate)
- Hvert søsterkromatid har en kinetokor-mikrotubuli festet til sin kinetokor som «tautrekker» de til midten

Anafase

- Korteste delen av mitose, varer i ca et minutt (ifølge boken)
- Kohesin-proteinkompleksene kløyves og søsterkromatidene dras fra hverandre
- Hvert kromosom trekkes mot polene med sentromeren først (der ligger jo kinetokoren) etter hvert som deres kinetokor-mikrotubulus blir kortere
- Mikrotubuliene som festet seg til hverandre (ikke-kinetokor-mikrotubulus) og i aster øker i lengde og «strekker» cellen ved å dytte den fra hva side.

Telofase

- Dattercellekjerner oppstår på hver side
- Nye kjernemembraner dannes av rester av den gamle og deler av endomembranene
- Nukleolus gjenoppstår og kromosomene blir mindre tettpakket
- Mikrotubulus som er igjen blir depolymerisert

- **Cytokinese** begynner litt forskjellig etter celle, men er gjerne godt i gang under telofasen
 - Hos dyreceller involverer dette en kløyving av cellemembranen som ikke er godt kjent enda (visstnok)

Mitotisk spindel

- Fibre av mikrotubuli og tilhørende proteiner
- Polymeriseres av enheter (tubulin) fra andre mikrotubuli i cellen, som depolymeriseres for å gi materialer
- Byggingen starter i sentrosomene. Disse inneholder to sentrioler, men sentriolene later til å **ikke** være viktig for celledeling (planter har dem for eksempel ikke!)
- Spindelen består av sentrosomene, mikrotubulus og aster
- Kinetokor-proteinet er festet spesifikke steder på DNA-et på hver sentromer
- Antall mikrotubulus som fester seg til kinetokoren varierer etter art (bok: 1-40)
- Drakampen som oppstår før kohesin-proteinene kuttes tvinger søsterkromatidene i plan
- Enzymet **separase** kløyver kohesin
- Motorproteiner på kinetokoren «trekker» mikrotubulus gjennom seg og depolymeriserer mens de går (pac-man mekanismen)
 - Samtidig viser forskning på andre celler og andre arter at depolymeriseringen foregår ved sentrosom-siden.
- I metafasen overlapper mikrotubuli hverandre et lite stykke og interagerer. I anafasen brukes det ATP og motorproteiner til å dytte disse fra hverandre samtidig som det legges til flere enheter på enden slik at overlappingen forblir.

Cytokinese

- Kløyving – foregår ved hjelp av en ring av mikrofilamenter av aktin som interagerer med myosin som å «snurpe» ringen, og dermed cellen, sammen.
- I **planteceller**, som har cellevegg, skjer dette ved at vesikler fra golgi med materialer slår seg sammen på midten og danner en **celleplate**

Binærfisjon hos bakterier – enkleste delevesen

- Encellede prokaryoters reproduksjon uten mitose
- De fleste har ett enkelt kromosom av sirkulært DNA og proteiner uten membran
- DNA begynner å replisere på ett bestemt sted og går i to retninger
- Dette danner to **replikasjonsorigo** etter gjennomføring av kopieringen
- Hvert replikasjonsorigo beveger seg til hver sin side og forankres i membranen mens cellene øker i lengde samtidig som DNA repliseres
- Plasmamembranen snurper på midten og danner to nye – wohooo!
- Bruker ikke mikrotubuli – hvorfor de beveger seg er aktivt forskningsområde
 - Proteinforankringer
 - Polymerisering av et protein som minner om eukaryotisk aktin
 - Protein relatert til tubulin snurper hele greia sammen

Utviklingen av mitose: Det er å anta at mitose oppstod etter fisjon grunnet liknende molekyler og proteiner i prosessen. Det er funnet mulige «mellomstadier» mellom fisjon og mitose hos dinoflagellater, kiselalger og noen typer gjær der kjernemembranen ikke går i oppløsning.

- Dinoflagellater: Spindel er festet i plasmamembranen og går inn i porer i kjernemembranen og fordeler arvemassen
- Gjærceller og kiselalger: Spindelapparatet er inni kjernemembranen

Cellesyklusens molekylære kontrollsystem

Eksperimenter der to celler i forskjellig fase fikk sitt cytosol slått sammen ga forskere bekreftelse på at molekyler i cytosol styrer dette:

- S og G1: G1 gikk inn i S-fase med en gang
- M og G1: G1 begynte med mitose – spindeldannelse uten at S-fasen hadde skjedd

Cellesyklusens kontrollsystem er et sett molekyler som fungerer syklisk og koordinerer nøkkehendelser under cellesyklusen.

- Som en «vaskemaskinkontroll» med egen klokke
- Regulerer av interne og eksterne signaler ved visse checkpoints
 - Kontrollpunkt der «stopp», eller «fortsett» -signaler kan sendes ut
 - Tre viktige i M, G1 og G2.

Klokken: Sykliner og syklinavhengige kinaser (Cdk)

- Samspill mellom konsentrasjonen av sykliner (som varierer på ulike tidspunkt) og kinaser (enzymer som aktiverer eller deaktiverer andre proteiner ved å fosforylere dem) som er avhengige av syklin for å fungere!
- Cdk er ofte i konstant konsentrasjon, men deaktivert. De aktiveres i takt med økt mengde av deres «syklin-partner».
- **MPF:** M-fase-promoterende faktor, et kompleks av syklin-Cdk som stiger i S og G2, og faller brått i M i takt med økende mengde syklin.
 - Gir «ok-signal» forbi G2
 - Fosforylerer en haug med proteiner og igangsetter mitose
 - Fungerer både som kinase og ved å aktivere andre kinaser
 - Fragmentasjon av kjernemembranen
 - Muligens kondensasjon av kromosomer og spindelformasjon i profasen
- Initierer ødeleggelsen av sitt eget syklin
- Cdk-en blir igjen i cellen
- Dyreceller virker til å ha i hvert fall 3 Cdk-er og flere sykliner

Stopp- og gåsignaler

- Transdukteres på samme måte som I LES KAPITTEL 9
- Sjekker at alt har gått som det skal til nå – signalene kommer fra «overvåkningsmekanismer» inni cellen eller fra signaler på utsiden
- **G1-sjekkpunktet** kalles «**restriksjonspunktet**»
 - Sjekker om ytre miljø er gunstig! Næring og vekstfaktorer (nevnt nedenfor)
 - Trolig viktigst: Cellen vil vanligvis gjennomføre G1, S, G2 og M hvis denne er ok
 - Hvis ikke går den ut av syklus og havner i **G0-fasen** – de fleste cellene er her
 - Celler (lever når den er skadet) kan bli tilbakekalt fra G0
- **G2-sjekkpunktet** sjekker DNA for skade under replikasjon og at alle proteinene som trengs for celledelingen er til stede.
- **M-sjekkpunktet** starter anafasen:
 - Sjekker at alle kromosomene er bundet til spindel i metafaseplanet
 - Når alle kinetokor-kompleksene er bundet spindelen aktiverer et proteinkompleks (som ikke er syklin-Cdk)
 - Aktiverer enzymet separase
- Studier viser at flere ting hindrer celledeling, for eksempel mangel på næring i mediet eller at det må være spesifikke proteiner kalt **vekstfaktorer** til stede (mer i kap 9 om dette)
- Celler reagerer spesifikt på vekstfaktorer eller kombinasjoner av disse
- PDGF – vekstfaktor fra blodplater som kreves for deling av **fibroblaster** (vevceller)
 - Fibroblaster har PDGF-reseptorer på plasmamembranen som trigger en signal-pathway og godkjenner G1-sjekkpunktet.
 - Blodplater (trombocytter) slipper løs PDGF når noe er skadet – stimulerer cellevekst
- Forskning viste at kultiverte celler bare vokser i et lag – vil tette igjen med nye celler når noen fjernes
- Viste seg at overflateproteiner binder seg til mottakere på cellene og sender inhiberende signaler om å ikke gå inn i syklus
- **Forankringsavhengighet:** Må være forankret for å dele seg – signaler minner trolig om de i forbindelse med celletetthet: Overflateproteiner og cytoskjelett-proteiner.
 - Trolig en optimaliseringsfunksjon, kreftceller mangler dette

Kreft er tapt kontroll over cellyklus: De vokser selv om vekstfaktorer ikke er til stede. Kreftsvulsten oppstår i enkeltceller som så invaderer nabovæv. Kreftcellene sprer seg via lymfe og blod til andre deler av kroppen. Metastase er når en ny kreftsvulst oppstår andre steder fordi den har spredt seg.

Vekstfaktorer via tyrosinkinase-reseptorer i brystkreft

- 20% av brystkrefttilfeller har enormt store mengder av overflatereseptor tyrosinkinase kalt HER2
 - o Herceptin er en god behandling mot HER2-reseptorer
- Ved å forstå hva slags molekyler som er involvert i signaliseringen hjelper oss å kunne bekjempe kreft ved å målstyre behandlingen.

Transformasjon av en normal celle til kreftcelle forstyrrer kontrollen av en rekke cellebiologiske prosesser:

- Cellene produserer masse vekstfaktor selv og skaper egen stimuli
- Trenger ikke vekstfaktor for å begynne deling
- Deler av tyrosinkinasereseptoren (HER2) kan ha ødelagte seter – er kronisk fosforylert og dermed i på-modus
- Mange medstrøms-proteiner kan ha mutert i DNA og sender ikke stopp-signal
- Cellesyklus (profilerasjon): Cellen går ikke ut av syklus eller hopper over kontroller. Hvis den stanser er det ikke på «normale» steder
- Mangel på apoptose (celledød): Induseres av eksterne og interne faktorer (DNA-skade, ER-stress).
- Adhesjon:
- Migrasjon – **metastase** er spredning av kreftceller
- Invasjon

Kreftceller gir mange molekylære endringer på mange nivå

- Stoffskifte
- Protein
- Transkript (mRNA)
- Epigenetisk kontroll (Kromatin; DNA-metylering, histon-modifikasjoner)
- Gensekvenser (mutasjoner)
- Har ofte flere kromosomer (usikkert om det er årsak eller virkning)

Systembiologien prøver å forklare og forutsi biologiske egenskaper og responser på høyere nivå (cellevekst) ut ifra modeller av komplekse samspill på mellom molekyler på lavere nivå. Dette gjøres ofte gjennom genom-skala screening. Kan potensielt danne grunnlaget for systemmedisin og **spesialtilpasset medisin!** Behandling rettet direkte mot hvilke prosesser som er forstyrret og hvilke molekylære nettverk som regulerer disse prosessene. Da kan man bruke en **kombinasjonsbehandling**.

Et problem som vi har støtt på er at EGFR-hemmere ofte møter resistens. Hva er mekanismene som skaper resistens? Dette må også undersøkes.

Kapittel 13: Seksuelle livssykluser og meiose

Hva som førte til familielighet var ukjent for forskere før på 1900-tallet og genetikkens oppstandelse. I dag vet vi at transkripsjon av DNA fører til at en celle produserer aminosyrer til proteiner og enzymer som kumulativt gjør deg til den du er.

- Gameter = kjønnsceller
- Somatiske celler = alle andre

Seksuell vs aseksuell reproduksjon: Både encellede og noen flercellede organismer kan reproducere seg aseksuelt. Hos flercellede kan dette skje med knoppskyting, at et nytt individ vokser ut av det andre i et punkt med ekstra mye celledeling. De er mer eller mindre genetisk identiske (husk: mutasjoner og overkryssing)

Kromosomer

- 46 kromosomer i 23 sett - 44 autosomer og 2 kjønnskromosomer.
- **Karyotype:** Sammenlikning og arrangering av alle kromosomene etter størrelse
- Homologe kromosomer – koder for det samme (øye, øye, munn, munn)
- Hvis DNA-syntese: 2 søsterkromatider festet i sentromer og langs kantene.

Kromosomer under menneskets livssyklus vs andre

- Starter med befruktningen til de befruktes selv
- Alle cellene vokser med mitose ut ifra zygoten unntatt kjønnscellene, som vokser fra «**germ cells**» i gonadene – testiklene hos gutter og eggstokkene hos jenter
- Kan gruppere den seksuelle livssyklusen inn i tre hovedretninger:
 - **De fleste dyr:** Gameter er eneste haploide og blir diploid ved befruktning, og produserer flere gameter
 - **Planter og noen alger - generasjonsveksling:** Multicellulære diploide og haploide stadier.
 - **Sopp og protister:** Bare en 2n-celle, resten er encellet eller flercellede haploider.

Alle stegene i meiose – deles inn i meiose I og II

Profase I

- Kromosomer kondenserer gjennom hele
- Spindeldannelse (m/ sentrosomer), kjernemembranens oppløsning skjer som i mitose
- Tidlig profase: De homologe kromosomparene (som er kopiert i søsterkromatider fra S-fasen) legger seg inntil hverandre gen mot gen og **overkrysser** – mikser litt gener
 - **Chiasma** (krysspunkt) er områdene der dette skjer – danner en «x-formatet» region
- Mikrotubuli fester seg til hver sin kinetokor på de homologe kromosomene. Disse fungerer som en «enkelt» kinetokor = lar dem arrangeres i metafaseplan

Metafase I

- Kromosomene arrangeres i metafaseplan
- Begge søsterkromatidene i et kromosom er festet til samme mikrotubuli – hver sin retning hos de homologe kromosomene

Anafase I

- Proteinene som binder søsterkromatider **langs armene** (ikke sentromer) brytes ned
- De homologe kromosomene trekkes til hver sin side
- Søsterkromatidene henger fremdeles sammen i sentromer.

Telofase I og cytokinese

- Hver cellehalvdel har et komplett haploid kromosomsett (som er duplisert, though)
- Cytokinese skjer ca samtidig so telofase I
- Cellekløft hos cyreceller, ny cellevegg hos planteceller
- Hos noen arter = kromosomer kondenseres og danner kjernemembran

Meiose II:

Profase II

- Spindelen formes (virker som sentromeren består)
- Kromosomene (kopierte i søsterkromatider fra S-fasen) beveger seg mot metafase II-planet

Metafase II

- Kromosomer i plan
- Søsterkromatidene er ikke genetisk identiske grunnet overkrysning
- Kinetokorene hos søsterkromatidene er festet til mikrotubuli fra hver sin pol

Anafase II

- Proteinene som holder søsterkromatidene sammen i sentromeren brytes ned, og de trekkes mot hver sin pol

Telofase II og cytokinese

- Kjernemembraner formes, cytokinese skjer og kromosomene dekondenserer
- Resultatet er her 4 datterceller som er genetisk ulike grunnet overkrysning og tilfeldigheter i hvilke som trekkes hvor

Overkrysning og synapser under profase I

- Etter interfasen ligger jo hvert søsterkromatid pent inntil hverandre via kohesiner
- Hver homolog ligger løst inntil hverandre med hvert gen linet opp perfekt
- DNAet til et søsterkromatid på hver homolog brytes opp på samme punkt
- En glidelås-liknende struktur kalt **synaptonemalt kompleks** dannes og holder de to homologene tett sammen. De kalles da en **synapse**
- Punktene som ble brutt opp settes sammen med det homologe kromosomet og danner chiasmata
- Synaptonemalt kompleks holder det hele sammen under dette
- Det må i hvert fall skje en overkrysning per kromosom for at de homologe kromosomene skal henge sammen under metafase I og havne i plan!

Generelt kan man si at søsterkromatid-kohesjon og overkrysning spiller en svært viktig rolle for at de homologe kromosomene skal holdes sammen og føres til metafase-planet i metafase I.

Årsaker til genetisk variasjon er hos seksuelt reprodukerende arter først og fremst kromosomoppgjøret under meiosen og selve pulingen

- **Tilfeldig fordeling av kromosomer** under metafase I gjør at det er 50/50 hvilket av far- eller morskromosomene som havner i hver dattercelle. Med overkrysning blir dette enda mer komplisert, da det i metafase II også handler om hvor et overkrysset kromosom går hen. Vi har 2^{23} antall mulige kombinasjoner å arrangere kromosomene i kjønnsceller på.
- **Overkrysning** skaper rekombinante kromosomer som tidligere nevnt. Det skjer ca to eller tre overkryssinger per kromosompar (litt avhengig av hvor centromeren er og størrelse på kromosomet). Orienteringen av de overkryssede kromosomene i metafase II gir også genetisk variasjon.
- **Tilfeldig parring** gjør at antall kombinasjoner i en zygote er $2^{23} \times 2^{23}$, som er helt latterlig høyt! Det er umulig å vite hvilken sædcelle som treffer hvilket egg. Såå mye variasjoon

Evolusjon og genetisk variasjon i små populasjoner

I et stabilt miljø kan det virke som asexuell reproduksjon gagnar seg mer enn seksuell, som også krever mer energi. Derimot er den bred enighet om at seksuell reproduksjon fortsetter fordi det gir genetisk variasjon, som igjen er fordelaktig hvis noe skulle skje. Hos organismer som har reproduert asexuelt siden de oppstod som art er det funnet andre mekanismer som skaper denne genetiske variasjonen på andre måter.

Kapittel 14: Mendelsk genetikk

- Individer varierer i utseende
- Egenskaper nedarves
- Karakterverdien påvirker fitness (seleksjon)

- På 1800-tallet rådet «blending-hypothesis»: At barna ble en mellomting mellom sine foreldre
 - Problem, etter flere generasjoner ville individer være helt «utvasket».
- Mendel: «particulate hypothesis»: Om gener og alleler på disse genene som opptrer diskret.
 - Langt forut for sin tid
- En kombinasjon av vitenskapelige studier og klosterets fascinasjon for arv og botanikk gjøre at Mendel kunne komme frem til det han gjorde. Han begynte sine eksperimenter i **1857**.

- Stor fordel å bruke erteplanter:
 - Mange ulike **karakterer** (arvelig egenskap) som alle har forskjellige **karaktertrekk** (variant av egenskapen)
 - Kort generasjonstid og mange avkom
 - Lett å krysspollinere ved å klippe av pollenbærere – tvekjønnede planter
- Testet kun karakterer som kom i to former
- Valgte individer som etter generasjoner med selvpollinering gav foreldretyper = **true breeding plants** (=homozygoter)
 - Krysset to ekte-avlende planter med hverandre: **hybridisering**
 - Krysset F1 med seg selv eller annen F1-generasjon
 - Kritisk at han har sjekket F2-generasjonen, ellers hadde han ikke sett mønstre

To fundamentale prinsipper for arv

Mendels modell:

1. Alternative versjoner av et gen («arvelig egenskap») er grunnlaget for variasjon i en arvelig egenskap
2. For hver karakter arver en organisme to alleler av genet, ett fra hver forelder
3. Hvis to alleler på et lokus er forskjellige, vil ett dominere over det andre og det recessive allelet ikke gi noen fenotypisk effekt
4. Loven om segregering: De to allelene for en arvelig karakter separeres når det dannes kjønnsceller.
 - True breeders er homozygote: Allelet finnes i alle kjønnsceller
 - Heterozygote: 50% av gameter får dominant, 50% får recessivt.

Loven om segregering: Baserer seg på resultatene der han så på en enkelt egenskap (**monohybrid arv**). Monohybrider er heterozygote for en bestemt egenskap. Monohybrid kryssing krysser disse individene.

- Krysset en lilla og hvit true-breeding og fikk bare lilla F1 – ikke noen «lyselilla»
- Selvpollinerte F1 og det dukket opp noen hvite! Tyder på at hvit ble «gjemt»
- Sjekket en rekke slike karakterer ved å parre true breeders, alle ga ca 3:1 forhold i trekk.
 - Under dannelse av gameter i meiosen vil de to allelene segregeres
 - Hvis en organisme har identiske alleler for en bestemt karakter vil det samme allelet dukke opp hos alle, men ikke hvis heterozygot

Loven om uavhengig fordeling: Ser på to egenskaper samtidig (**dihybrid arv**)

- Mendel visste fra før hvilke av de 4 trekkene (to per) han så på som var dominante
- Krysset homozygoter for begge trekk
 - Skapte **dihybrider** i F1 – heterozygote for to trekk (YyRr)
 - Selvpollinerte disse og vi kan nå spekulere: **Avhengig fordeling** eller **uavhengig fordeling?**

Hvis avhengig vil kjønnscellene ha samme materiale som foreldrene og gi 3:1 fenotyp

	YR	yr
YR	YYRR	YyRr
yr	YyRr	yyrr

Hvis uavhengig vil alle varianter av kjønnsceller eksistere. Dette gir 9:3:3:1 i fenotyp

	yr	YR	yR	Yr
yr	yyrr	YyRr	yyRr	Yyrr
YR	YyRr	YYRR	YyRR	YYRr
yR	yyRr	YyRR	yyRR	YyRr
Yr	Yyrr	YYRr	YyRr	YYrr

Dermed: Loven om uavhengig fordeling sier at to eller flere gener sorteres uavhengig av hverandre – ingen henger sammen (men du vet det er unntak til dette). Genene **må** ligge på forskjellige kromosomer eller langt unna på samme kromosom.

- Mendel var heldig med at alle trekkene han så på satt på forskjellige kromosomer

Sannsynlighetsregning og mendelsk arv

- Mendels lover om segregering og uavhengig sortering følger samme sannsynlighetsregler som gjelder når en slår mynt og kron
 - Bruker multiplikasjonsregelen (eks to mynt på rad = 0,25)
 - Summeringsregelen (summerer sannsynligheten for hver av hendelsene)

Dihybrid eller flerekarakterkryss er egentlig bare mange monohybride kryss «samtidig». Dette kan man regne på.

- **Sett at YyRr x YyRr**

- Ved å se på bare en karakter (Yy eller Rr) i hver gamet vet vi at fordelingen av trekk YY – Yy – yy er 1:2:1. Dette er monohybrid krysning, og sjansene for hver gamet er dermed ¼, 2/4, og ¼. Dette gjelder for både Yy og Rr, selvfølgelig.
- I **dihybrid** krysning er dermed sjansen for YYRR $\rightarrow \frac{1}{4}(YY) * \frac{1}{4}(RR) = 1/16$
- På samme måte er sjansen for YyRR $\rightarrow \frac{1}{2}(Yy) * \frac{1}{4}(RR) = 1/8$

På samme måte: PpYyRr x Ppyyrr: Hvor stor andel av avkommet vil være recessive for **minst** to av karakterene? De som oppfyller kravet: ppyyrr, ppyyRr, ppYyrr, Ppyyrr

- ppyyrr $\rightarrow 0.25 * 0.5 * 0.5 = 1/16$
- ppyyRr $\rightarrow 0.25 * 0.25 * 0.5 = 1/16$
- ppYyrr $\rightarrow 0.25 * 0.25 * 0.5 = 1/16$
- Ppyyrr $\rightarrow 0.5 * 0.5 * 0.5 = 2/16$

	P	p		Y	y		R	r
P	PP	Pp	y	YY	yy	r	Rr	rr
p	Pp	pp	y	Yy	yy	r	Rr	rr

Legger man dette sammen blir det 6/16, eller 3/8.

14.3: Mer komplekse mønster for arv

De grunnleggende prinsippene om segregering og uavhengig sortering gjelder fremdeles, selv om Mendel ikke kunne forklare de mer avanserte arvemønstrene han så når han krysset planter og så på mange egenskaper.

For ett gen

- **Ulike grader av dominans.** Husk at dominans ikke er interaksjon på noen måte.
 - Ufullstendig: Fenotypen er en mellomting mellom foreldrene.
 - Kodominans: Fenotypen uttrykkes samtidig
- **Multiple alleler**
 - De fleste gener har mer enn to ulike alleler som styrer: Eks ABO
- **Pleiotropi**
 - De fleste gener har flere fenotypiske effekter – ikke overraskende
 - Sigdcelleanemi gir både blodcellene sigdform og gir reduksjon av malaria-symptom – (kommer an på hvilket nivå du ser det på)

For to eller flere gener

- **Epistasi**
 - Interaksjon mellom gener der den fenotypiske effekten av et gen endrer det fenotypiske uttrykket av et annet gen
 - Eks: Pels hos labradorer. B gir sort pels og bb gir brun pels
 - MEN: Et annet gen E koder for **pigment** – ee gir ingen pigment.

- **Polygenetisk arv:** Flere gener virker på samme egenskap! Eksempler er høyde og hudfarge. Disse har over 150 gener som koder! Jo flere av dem som uttrykkes, jo mørkere blir fargen. En kumulativ effekt, **kvantitative karakterer!**

Sammenhengen mellom dominans og fenotype

- Dominans er ikke at et gen blokkerer det andre eller liknende
- Eksempel er at recessiv ofte koder for en defekt versjon av et enzym, mens et dominant allel gir nok enzym til at det blir «normalt» uttrykt.
- **Tay-Sachs sykdom** er et eksempel på at observert dominant/recessivt forhold kommer an på hvilket nivå vi ser på det:
 - Organismenivå: Recessivt for man trenger to recessive alleler for å få det.
 - Biokjemisk: Ufullstendig dominans fordi heterozygoter produserer halvparten så mye enzym.
 - Molekylært: Kodominant fordi det recessive allelet i et individ uttrykker et ikke-fungerende enzym samtidig som det dominante uttrykker et fungerende enzym.

Arv og miljø

- Miljø påvirker enkel mendelsk nedarving – næring påvirkes kroppshøyde for eksempel
- Generelt: Genotype gir et spekter av fenotyper, som igjen avhenger av miljøforholdene
- Størst fenotypisk spekter for polygenetiske karakterer (multifaktorielle)

14.4: Mennesket som genetisk studieart

Mennesket er ikke så lett å studere fordi vi har lang generasjonstid, får få avkom, og det er etiske problemer med krysningsforsøk. Vi har derimot gjort ganske viktige studier og teknologi som gjør dette lettere.

Stamtavler kan brukes til å analysere parringer som allerede har funnet sted og dermed finne mønstre o.l.

Recessivt nedarvede sykdommer: Tusenvis av sykdommer nedarves som enkle recessive trekk, alt fra milde til dødelige. Her er det gjerne at et allel koder for et ikke-fungerende protein. Det er vanlig at folk er heterozygote bærere for slike alleler. Genetiske sykdommer forekommer også ujevnt mellom ulike folkeslag på grunn av innavl via geografisk isolasjon – innavl øker sjansen for en recessiv sykdom fordi folk i slekt har større sjanse for å dele alleler.

Dvergvekst er et eksempel på en **dominant** nedarvet sykdom. Mange av de dominante sykdommene fører til fosterdød eller død før reproduksjon. De er derfor mer sjeldne.

Huntingtons sykdom er et eksempel på en sykdom som ikke viser seg før du gjerne har fått barn, og på den måte kan slike dominant nedarvede sykdommer holde seg i en populasjon.

Multifaktorielle sykdommer: Flere sykdommer har flere faktorer som påvirker seg. Hjertesykdommer, kreft, alkoholisme, schizofreni. Livsstilen vår påvirker ofte i større grad enn om man bare har grunnlaget for det. Den arvelige komponenten er ofte polygenetisk, slik at noen er mer utsatt i større grad enn andre.

Gentesting og rådgivning

- Rådgivning basert på Mendelsk genetikk og sannsynlighetsregler (stamtavler)

Eksempel: Jon og Kari har begge brødre som har dødd av en recessiv sykdom. Dette betyr at begge deres foreldre er bærere, og Jon og Kari kan være enten AA eller Aa begge to. Sjansen for at begge er bærere er $2/3 * 2/3$ (de vet jo at de ikke er syke), multiplisert med sjansen for at barnet er sykt hvis de er bærere = $1/4$. Totalt $1/9$ sjanse. Hvis de allikevel føder et sykt barn må de begge være bærere og sjansen er $1/4$ hver gang.

- Tester for å identifisere bærere
- Fosteresting og nyfødt-screening er i dag mulig gjennom å ta ulike prøver og dermed avgjøre før eller etter barnet er født om det er sykt. Eksempler er fostervannsprøve, korionbiopsi (tar prøve av morkaken = DNA fra barnet). Det kan også isoleres DNA fra barnet i morens blod. Det screenes for maaaange sykdommer.

Kapittel 15: Kobling og kromosomer

Mendels «arvelige faktorer» ble ikke oppdaget før lenge etter at han foreslo dem i 1900. Først da mitosen og meiosen ble oppdaget mot slutten av 1900-tallet begynte man å se sammenhengen mellom fordelingen av kromosomene og arvelige faktorer. I 1902 ble **Kromosomteorien om arv** utviklet parallelt av flere ulike forskere som så sammenhengen.

- Mendelske gener har loci (områder) på kromosomet
- **Loven om uavhengig sortering** i metafase 1: Tilfeldig hvilket kromosom (dermed allel) som legger seg «opp» eller «ned».
- **Loven om segregering** i anafase 1: De to allelene for et gen separeres

15.1: Morgan beviste mendelsk arv med eksperimenter på *Drosophila*

- Thomas Hunt Morgan brukte bananfluer til å vise at et spesifikt gen var assosiert med et bestemt kromosom
 - Produserer veldig mange avkom
 - 2 uker generasjonstid
 - Har bare 4 kromosompar ($2n = 8$) som er lette å skille i mikroskop. 3 autosomer og 1 kjønnskromosom
- Paret **villtype-hunner** (oransje øyne: w^+) med mutante hanner (hvite øyer: w)
 - F1 hadde alle røde øyne, mens F2 hadde en 3:1 ratio
 - MEN: Bare hanner hadde hvite øyne!
- Allelet for hvite øyne er recessivt og ligger på X-kromosomet: Det viser seg dermed oftere hos hanner enn hunner, siden en mutant hann må pare bærer/mutant dame

15.2: Kjønnsbundede gener gir unike nedarvingsmønstre

- Pattedyr har to kjønnskromosomer, X og Y
- Y er mye mindre enn X, og kun korte områder på hver ende er homologt med X for å sikre paring under mitose/meiose
- SRY-genet på Y koder for et protein som regulerer andre gener og er nødvendig for utvikling av testikler. Gonadene blir ovarier ellers.
 - Sekvensering av Y har funnet 78 gener som koder for rundt 25 proteiner (duplikater)
- **X-linket** og **Y-linkede** gener gir ulike nedarvingsmønstre siden Y-kromosomet nedarves mer eller mindre intakt nedover en gutte-rekke.
- Gresshopper, kakkerlakker og noen insekter har X-0 system for gener.
- Fugler: Z-W system. ZZ gir hanner og ZW gir hunner i motsetning til XY og XX. Dermed er det egget som bestemmer kjønn, ikke spermien.
- Noen insekter: Haplo-diploide system. Hunner er diploide, hanner er haploide.

Arv av X-linkede gener

X-kromosomene har mange andre gener som ikke er relatert til kjønn. Fedre fører X-koblede gener videre til alle døtre, men ingen sønner. Mødre fører X-koblede alleler videre til både sønner og døtre. **Hemizygot:** Enver hann som får et recessivt allel vil uttrykke det.

- Duchenne er en X-linket sykdom
- Hemofili, eller blødersykdom, er også det, og var svært spredt i kongefamilier.

X-inaktivering hos hunn-pattedyr

- Det ene X-kromosomet til hunn-pattedyr blir inaktivert under embryo-utvikling (tilfeldig hvilket) for å ikke få «dobbel opp» med proteinproduksjon
- Genene uttrykkes ikke, kromosomene kondenseres til «**barr-body**» via modifisering av DNA-et (metylgrupper påsettes)
 - Barr-body kromosomer re-aktiveres i celler som er opphav til egg
 - Hunner består av en mosaikk av to typer celler, de som har aktivt X-kromosom fra faren og som har aktivt X-kromosom fra moren
 - Når genet inaktiveres er litt usikkert, men det er i hvert fall **før** alle de ferdig spesialiserte cellene er dannet
 - Dette gir blant annet tortoiseshell-farging hos katter
- En region på X har gener involvert i prosessen – de to assosierer seg kort med hverandre tidlig i embryoutvikling og den ene inaktiveres ved at RNA-produkt fra sitt eget XIST-gen fester seg til X-kromosomet.

15.3: Koblede gener

Hver kromosom har hundrevis til tusenvis av gener (unntatt Y-kromosomet). Gener som nedarves på det samme kromosomet kalles **koblede gener**. Morgan krysset fluer med ulik kroppsfarge og vingestørrelse for å undersøke om genene for trekkene er koblet.

Kobling sin påvirkning på nedarvingsmønstre

Morgan krysset villtypen «lange vinger, grå kropp = $b^+b^+vg^+vg^+$ » med dobbelt mutant «korte vinger, svart kropp = $bbvgvg$ » for å skape heterozygote F1 som alle **ser ut** som villtypen.

Mutantallelene er recessive

	b^+vg^+	b^+vg^+	b^+vg^+	b^+vg^+
bvg	b^+bvg^+vg	b^+bvg^+vg	b^+bvg^+vg	b^+bvg^+vg

Deretter **testkrysset** han denne F1-generasjonen med en homozygot recessiv og så på resultatet:

	b^+vg^+	bvg	b^+vg	bvg^+
bvg	b^+bvg^+vg	$bbvgvg$	b^+bvgvg	$bbvgvg^+$

Her **skulle** han ha fått like mange av disse **unike** genotypene, men det gjorde han ikke! Han fikk desidert flest av $bbvgvg$ og b^+bvg^+vg , noe som tyder på at de nedarves **sammen**. Samtidig fikk han også de andre typene, så det må være en form for **interferens**.

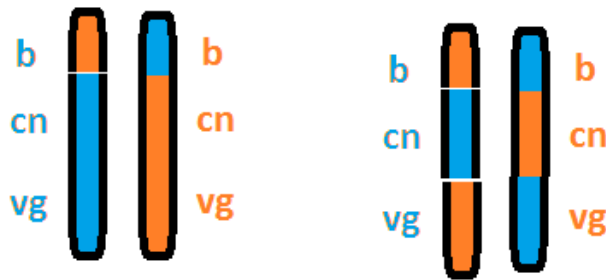
Genetisk rekombinasjon og linkede gener

- Meiose og tilfeldig befruktning genererer genetisk variasjon blant avkom hos organismer med kjønnet formering gjennom:
 1. Uavhengig sortering av kromosomene i metafase 1 (og 2, med overkrysning) rekombinerer ikke-koblede gener
 2. Overkrysning i meiose I (profase I) rekombinerer koblede gener.
 3. Tilfeldig befruktning
- Koblet gen i meiose uten overkrysning: b^+bvg^+vg (b^+vg^+ sitter på samme) → Alle datterceller blir 50/50 b^+vg^+ og bvg .
- Koblet gen med overkrysning gir mulighet for å skape kromosom som er for eksempel bvg^+ eller b^+vg .

Rekombinasjonsfrekvens = antall rekombinante delt på antall avkom totalt. **Rekombinanter** har fenotyper som ikke finnes hos foreldrene, mens **foreldretyper** har samme fenotype som en av foreldrene.

Kartlegging av gener langs et kromosom kan gjøres ved å bruke sannsynligheten for overkrysning, som er proporsjonal med avstanden mellom lociene. **Alfred H. Sturtevant** antok at jo lenger unna to gener er hverandre, jo større sjanse er det for at en overkrysning vil skje, og at dette kan brukes til å lage et **koblingskart**.

- Jo lenger unna – jo flere områder mellom dem kan det foregå en overkrysning
- Gir deres relative posisjon i forhold til hverandre
- **Eks: b, cn og vg ligger etter hverandre:**
 - 9% rekombinasjonsfrekvens mellom b og cn, og 9,5% mellom cn og vg. Mellom b og vg er det 17%.
 - Overkrysning mellom b og vg skjer dermed dobbelt så ofte som mellom b og cn eller cn og vg.
 - «Går ikke opp» fordi en eventuell overkrysning mellom b og cn «cancels out» hvis det også overkrysses mellom cn og vg



Dette er grunnen til at partallsoverkryss er vanskelige, hvis du ser på vg og b vil du ikke se at det har foregått en overkrysning! Dette er grunnen til at det er bedre å legge sammen de mindre rekombinasjonsfrekvensene.

- Avstanden mellom genene måles i centiMorgan og angir relativ avstand og rekkefølge på genene, ikke deres eksakte plassering (1 cM = 1% rekombinasjonsfrekvens)
- Gener langt fra hverandre på samme kromosom kan ha 50% rekombinasjonsfrekvens slik som gener på ulike kromosomer: De er **fysisk forbundet**, men ikke **genetisk** – de oppfører seg som om de ikke satt på samme kromosom!

Forandringer av kromosomtall og –struktur gir ofte spontantabort eller store sykdommer. Dette kan forårsakes av kjemiske og fysiske forstyrrelser eller feil under meiosen. Planter tåler dette ofte bedre enn oss.

Feil antall kromosomer

- **Nondisjunksjon:** Kromosomene separeres ikke korrekt under meiose I eller meiose II, separeres ikke og det havner for få eller for mange i en gamet.
 - Skaper **Aneuploidi:** En feildannet gamet smelter sammen med en normal en og skaper en zygote med for mange eller for få kromosomer. Kan også skje i mitose og danne kreftceller.
 - **Monosomi** hvis den mangler ett kromosom. 10-25% av alle forsøk. This kills the baby.
 - **Trisomi** hvis den har ett kromosom for mye
- **Polyploidi:** Komplette ekstra sett kromosomer (triploidi, tetraploidi).
 - Vanligst i planteriket, men noen fisk og amfibier har dette
 - Ser ut til å gi bedre «balanse», da et helt ekstra sett er til stede

Endringer i kromosomstruktur

- Delesjon: Et kromosomsegment slettes
 - Duplikasjon: Et søsterkromatid repeteres med en kopi/den slettede biten fra delesjon
 - Inversjon: Rekkefølgen reverseres ved at biten settes på andre vei
 - Translokasjon: Flytter et segment fra ett kromosom til et annet, **ikke-homologt** kromosom
- Spesielt vanlig i meiose, ujevn overføring av DNA (ikke like store) fører ofte til tap av genetisk informasjon som er dødelig

Menneskelige sykdommer som resultat av kromosomendringer

Downs kommer av et ekstra kromosom 21. De fleste fungerer normalt, men i ulik grad. De fleste er sterile. Sjansen for å få et downs-barn øker til nesten 1% ved 40 år. Det kobles til nondisjunksjon i meiose I.

Kjønnskromosomer virker til å ikke gi like store utfordringer. Y-kromosomet bærer få gener, og ekstra X-kromosomer blir **barr bodies**. Mennesker med ekstra X eller Y-kromosomer har utfordringer når det kommer til utvikling og blir ofte høyere eller utvikler egenskaper til det motsatte kjønn.

Flere **sykdommer**, og spesielt **kreft**, er relatert til kromosomer som har endret seg strukturelt. Et eksempel er *cri du chat* som kommer av en delesjon på kromosom 5.

Philadelfiakromosomet er lett å kjenne igjen og stammer fra at en stor del av kromosom 22 og en liten del av kromosom 9 bytter plass og skaper CML: Kronisk myelogen leukemi.

15.5: Noen nedarvingsmønstre er unntak fra standard Mendelsk nedarving

Genomisk preging

- Fenotypisk effekt avhenger om genet er nedarvet fra mor eller far
- Gjelder gener på autosomer i kjernen
- Ca 60 gener preges hos pattedyr
- Skjer under dannelse av gameter → Et bestemt allel «skrus av»
- Pregingen skrus av og deretter på i neste gametdannelse om dyret er av riktig kjønn
- Pregingen er alltid lik
- Virker som det er metylering som skrus **av**, men er også eksempler på at metylering skrur **på!**
- **Eksempel:** Igf2 hos mus som kreves for normal vekst (hormon)
 - Bare genet fra far uttrykkes
 - Heterozygoter er bare dverger om det mutante allelet kommer fra far
- Det virker som de fleste pregede genene er viktig for utviklingen

Organellegener

- Ikke alle genene er lokalisert i kjernen eller på kromosomer
- Mitokondrier, kloroplaster og andre planteplastider (organeller med doble membraner) har små sirkulære DNA-molekyler
 - Kalles **cytoplasmiske gener** eller **ekstracellulære gener**
- Organellene reproducerer selv og følger ikke mendelske lover biiiitch
- Cytoplasmaet i zygoten kommer fra plasma i egget, og det er derfor det arves fra mødre
- Gjelder for mitokondrier også, mitokondriene i spermene ødelegges
 - De fleste mitokondriegenene lager proteinkompleksene i elektrontransportkjeden
 - Mutasjoner i disse gjør mitokondriene mindre effektive
 - Nerveceller er ekstra ømfintlige, da disse trenger energien mest
 - Rekke sykdommer relatert til dette

Kapittel 16 – Nukleinsyrer

Det ble oppdaget at egenskaper kan overføres mellom bakterier uten av bakteriedonoren er i live! Folk tenkte at proteiner var arvematerialet, 20 aminosyrer hørtes ut som et bra grunnlag for slik variasjon. Det ble gjort et forsøk tidlig 1940(?) der patogene S-celler ble overført til en mus så den døde. R-celler toklet musen helt fint. S-cellene ble varmeinaktivert og blandet med levende R-celler og injisert i musen, som allikevel døde! Dessuten kunne han dyrke frem nye, patogene S-celler av R-cellene! Hvordan og hvorfor skjedde dette? Noe måtte ha endret bakterien, selv om donoren ikke var i live.

- **Transformasjon** (i dette tilfellet): Bakterie tar opp DNA fra utsiden og endrer fenotype.
- Annet begrep: Omdannelse av vanlig celle til kreftcelle (annen prosess)

Overføringen av arvemateriale fra fager (bakteriofager) ble mye brukt for å legge grunnlaget for å finne arvemateriale. **Max Delsbrück** jobbet for Caltech og lagde et genialt eksperiment:

Er arvematerialet protein eller DNA? Han dyrket bakterier og fager i to radioaktive miljøer. I den ene ble aminosyrer merket av S-35, som dermed bare farget proteiner. I den andre ble nukleinsyrer merket med P-32, som bare finnes i nukleinsyrene hos bakterier. Disse blendet han for å løse bakteriofagene fra cellene. Ved å undersøke radioaktivitet i pelleten (som kun bestod av celler) kunne han bestemme hva som ble overført.

Navn: Alfred Hershey, Martha Chase, Horace something Judson. "Hershey heaven".

DNA sin struktur

- Polymer med en ryggrad av sukker (deoksyribose) og fosfat med **fosfo-diesterbinding**
- 5' og 3' ende etter hvilket karbonatom som gjelder.
 - 5' er karbonet som står ut av ringstrukturen
 - 3' er OH-gruppen.
 - Til karbon 1 sitter nitrogenbasen.
- Områder med mye adenin og tymin går lettere fra hverandre fordi de bare har 2 hydrogenbindinger.

Watson og Crick så blant annet ved hjelp av røntgendiffraksjon av DNA at den måtte være helix-struktur og at basene satt på innsiden. Diameteren de måle støttet også opp at puriner måtte matche pyrimidiner for å få konsekvent diameter. Linus Pauling hadde blant annet foreslått 3 eller 4 tråder med baser på utsiden, men de hadde tilgang på data som avkreftet dette.

Erwin Chargaff studerte hvor mye det var av base og noterte seg at det alltid var like my A og T som C og G.

DNA-replikasjon

- Tre mulige modeller for replikasjon var mulig!
 - Malen gikk sammen igjen etter replikasjoner (konservativ modell)
 - Hver halvdel dannet ny tråd (riktig, semikonservativ modell)
 - Alle, både gamle og nye, var blandet av originale og kopier (dispersive modell)

Replikasjon starter i et **origo** og går ut fra hver side av disse punktene. Bakterier har bare ett replikasjonsorigo i plastidene der hvor det er mye A og T (lett å bryte opp). Det dannes **replikasjonsbobler** som møter hverandre.

Mange proteiner samarbeider i denne prosessen i et kompleks.

- **Topoisomerase** lager kutt i DNA-et før det replikeres slik at DNA-et ikke får for mye spenning når det tvinnes opp, men fikser også dette etterpå.
- **Primase** syntetiserer RNA-primere av RNA som fungerer som starten på syntesen
- **Polymerasen** fester nukleotider (tre fosfatgrupper) på 3' ender og spalter av to fosfat (pyrofosfat), som igjen spaltes til fritt fosfat. Dette er en exergon reaksjon, og energien brukes til å fortsette syntesen.

Starten

- **Replikasjonsstart** er en kort, spesifikk basesekvens på DNA. De sirkulære kromosomene har ett startpunkt, eukaryotisk DNA har flere.
 - Proteiner gjenkjenner denne sekvensen, som ofte er «svak» pga basekombinasjonen
- **Replikasjonsgaffel** dannet av **helikaser**
- **Enkeltrådbindende proteiner** binder seg til de uparede trådene slik at de ikke går sammen igjen
- **Topoisomerase** går foran og hindrer for mye stress på DNA-tråden ved å kutte og lime den opp (prøv å dra to tråder viklet inn i hverandre fra hverandre lol)
- **Primase** syntetiserer en **primer** av **RNA** (5-10 nukleotider lang) som polymerasen kan bygge på i 3'-enden.

Syntese av ny tråd

- **DNA-polymerase** – funnet 11 i eukaryot og litt færre i prokaryot
 - 500 nukleotider per sekund i bakterier
 - 50 nukleotider per sekund i menneskeceller
- **Nukleotid:** Sukker til en base og tre fosfatgrupper
 - ATP vs dATP: Deoksyribose i DNA, mens ribose i RNA.
 - Ustabile på grunn av trifosfat-halen
 - Når de legges til forsvinner to av fosfatene i et **pyrofosfat**-molekyl som igjen spaltes i en **exergon** reaksjon som er koblet til polymeriseringsreaksjonen.

Antiparalell elongering

- Polymerase kan bare legge til på 3' enden, ikke 5' enden
- **Leading strand** blir syntetisert uten avbrudd og trenger bare **en** primer
- **Lagging strand** blir syntetisert i **okazakifragmenter** på 100-200 nukleotider i mennesket.
 - Kan bare syntetiseres så snart gaffelen åpner nytt DNA
 1. Primase lager en primer 1 oppstrøms til origin of replication
 2. DNA polymerase (pol III) lager første okazakifragment frem til origin of replication
 3. Løsner fra tråden og går bakover, syntetiserer neste fragment fra primer 2 frem til primer 1.
 4. En **annen** polymerase (pol I) erstatter RNA fra primasen ved å feste seg til slutten av fragment I, og deretter II. Følger hakk i hel.
 5. **Ligase** limer sammen okazakifragmentene med det som «var» primeren

Dette er for **bakteriereplikasjon**. Hos eukaryoter er det flere polymeraser involvert.

Replikasjonskomplekset er lett å tanke på som et «tog», men slik er det ikke. Det er heller et **maskinerikompleks** støttet av bindeproteiner som trekker DNA'et gjennom seg. På den måte kan de ulike enzymene og proteinene interagere hverandre og jobbe i samme tempo.

Kontroll og reparasjon under/etter replikasjon

- En av 100 000 baser blir **kopierte** feil, og siden det er så sykt mange baser blir jo dette faktisk en del.
 - Men i virkeligheten er det bare 1 av 10^{10} som faktisk blir feil i ferdig DNA: Sykt god kvalitetskontroll
 - Enormt mange proteiner og enzymer sklir langs tråden og ordner opp
 - UV-lys kan gi Tymin-Tymin kovalent binding, men **nuklease** og andre proteiner kutter det vekk, mens polymerase og ligase setter inn og limer på nytt.
 - Kalles «**nucleotide excision repair**»
- Dette vedlikeholdet av spontane mutasjoner etc er livsviktig for organismer som lever lenge.

Lineære kromosom – forkorting av telomerene

- Som resultat av at polymerase ikke kan bygge på 5-enden vil disse bli kortere og kortere for hver replikasjon (selv når RNA-primeren sitter helt ytterst! = tomrom)
- Telomerase forlenger DNA-et i kromosomene og er svært aktivt hos kjønnsceller og stamceller (dette er for at de skal ha maksimal lengde på DNA-et).
- Celledød er i utgangspunktet bra fordi DNA-replikasjon ikke er feilfritt og vil akkumulere mutasjoner
- Kreftceller reaktiverer i svært mange tilfeller telomerasen.

Kapittel 17: Genuttrykk

Proteiner er linken mellom genotype og fenotype fordi genene styrer proteinsyntesen i organismen. **Genuttrykk** er prosessen der DNA koder for proteiner.

17.1: Gener spesifiserer proteiner via transkripsjon og translasjon

- Gener → Enzymer → Fenotype ble først foreslått i 1902
 - Regnet med at folk som hadde en arvelig sykdom hadde dette på grunn av at de ikke produserte riktige symptomer.
- «**Ett gen-ett enzym**» - hypotesen om at ett gen dikterer ett enzym

Studier av bakterier som ble bombardert med røntgenstråler og deretter plassert i næringsmedium kunne vise hvilke stoffer bakterien ikke lenger kunne produsere etter å ha fått muterte gener. Ved å i tillegg introdusere mellomprodukter kunne de finne ut hvor i reaksjonssporet et gen har mutert.

«Ett gen-ett enzym»-teorien er ganske utdatert etter hvert som man skjønnte at mange genprodukter ikke er enzymer, men også andre proteiner, deler av proteiner (hemoglobin trenger to gener for eksempel) samt ikke-kodende RNA-molekyler. Sistnevnte er grunnen til at man ikke kan kalle det «ett gen-ett polypeptid» heller, det er ikke presist nok.

Grunnleggende prinsipper i transkripsjon og translasjon

Nukleinsyrer og proteiner inneholder informasjon skrevet på to ulike «språk»: Nukleinsyrer er polymerer der nukleotider er monomerene, mens proteiner er polymerer av aminosyrer. I RNA erstattes basen Tymin med Uracil.

- **Transkripsjon** er syntese av alle typer RNA
- **Translasjon** er syntese av et polypeptid i ribosomene ved å oversette informasjonen i mRNA til aminosyrer.
- Transkripsjon og translasjon foregår ganske likt med tanke på enzymer involvert og ribosomer.
 - **Bakterier:** Mangler kjerne, transkripsjon og translasjon er derfor i cytoplasma.
 - Lar bakterier begynne translasjon mens transkripsjon fremdeles foregår
 - **Eukaryoter:** Transkripsjon og RNA-prosessering i kjernen, translasjon ute i cytoplasma.
 - Modifikasjoner av pre-mRNA før det sendes ut av kjernen
 - **Arkebakterier:** Forskningen henger etter, de har fellestrekk med både bakterier og eukaryoter.
- **Primærtranskriptet** er RNAet fra et gen

Genene og triplettkoden

- Enkel logikk sier at hverken 1 eller 2 baser er nok til å kode alle aminosyrene
- Triplettkoden sies å være **redundant**, men er ikke **flertydig!**
 - Hvert kodon koder for bare en aminosyre, men flere kodon kan kode for samme aminosyre.
 - Det er også start- og stoppkodon.
- **Templattråden** er alltid den samme for hvert gen, men **ulike gener kan sitte på ulik del av tråden.**
- **Ikke-templat**-tråden kalles også «coding strand» fordi denne er «identisk» med produsert mRNA med unntak av U og T
- **Kodon** er en aminosyre og leses i 5' – 3'
- Koden ble knekket ved at kunstig RNA ble laget og polypeptidproduktet analysert
- AUG koder for både metionin (Met) og start, polypeptider har derfor metionin i starten som ofte fjernes.
- **Reading frame** er viktig, altså hvor det starter. Det skilles ikke mellom «hvilke» kodon som skal lese: AAG TGA GTT → AGT GAG TT hvis det leses feil

Eksperimenter med spleising viser hvor bevart denne koden er. Ett kodon står for samme aminosyre i så godt som alle organismer med bare noen få unntak. Dette er kanskje det sterkeste tegnet på organismenes felles opphav og den evolusjonære signifikansen av dette systemet.

17.2: Transkripsjon

RNA-polymerase splitter de to DNA-trådene og setter sammen RNA komplementært til templatstråden. RNAet kan som DNA bare settes sammen fra 5' til 3', men behøver ikke en primer for å sette i gang. **Promoter** er sekvensen der polymerasen fester seg, hos bakterier er stoppsekvensen **terminator** (annerledes for eukaryoter). Nedstrøms er transkripsjonsretning. **Transkripsjonsheten** er den DNA-sekvensen som blir et RNA-molekyl. Bakterier har bare en RNA-polymerase til alle sine RNA-molekyler, mens eukaryoter har polymeraser til andre RNA-tråder også. Minst tre er kjent, polymerase II lager pre-mRNA.

1. Polymerasebinding og initiering av transkripsjon

- **Startpunkt:** Det nukleotidet i promoteren der polymerasen begynner
- RNA-polymerasen bestemmer hvilket tråd som brukes ved å binde seg der
- Bakteriepolymerasen kjenner igjen og binder seg til promoteren, mens eukaryote polymeraser trenger **transkripsjonsfaktorer** (proteiner)
 - Transkripsjonsfaktorer + polymerase = **transkripsjonsinitieringskompleks**
 - Eksempel på viktig protein-proteininteraksjon
 - I likhet med DNA-polymerase senkes aktiveringsenergien for at en trifosfat-nukleotid kan binde seg til RNA-tråden

2. Elongering av RNA-tråden

- Åpner helixen ca 10-20 nukleotider av gangen
- Legger til nye nukleotider på 3'-enden av RNA (bygger 5' til 3'), beveger seg 3'-5' langs templatet
- Flere polymeraser kan jobbe etter hverandre i en konvoi
- I eukaryoter legges det til 40 nukleotider per sekund

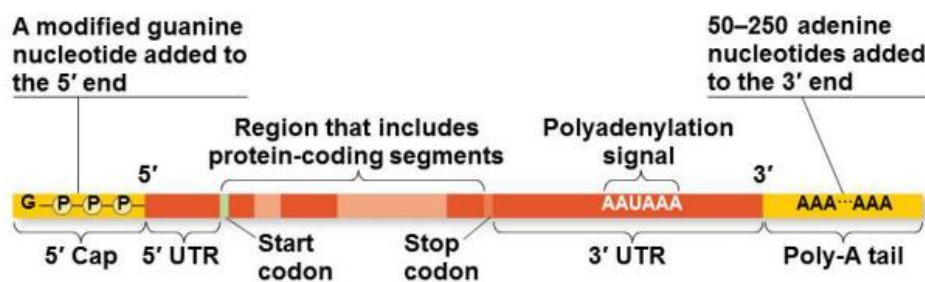
3. Terminering

- Forskjellig mellom bakterier og eukaryoter
- **Bakterier:** Stoppsignal
 - Polymerasen hopper av
 - Transkriptet løsner, ingen modifikasjoner før translasjon
- **Eukaryoter:** RNAP II transkriberer **polyadenylasjon-signalet**
 - (AAUAAA) – initierer binding av proteiner i kjernen
 - 10-35 nukleotider nedenfor dette punktet kutter proteinene den vekk fra polymerasen
 - Videre prosessering
 - RNAP II fortsetter å transkribere nedover, men den nye 5'-enden er ikke beskyttet av en cap, så enzymer bryter det ned helt til de tar igjen polymerasen

17.3: Eukaryote celler modifierer RNA etter transkripsjon

mRNA-endene

- 5' enden (som syntetiseres først) får en **5' cap**: Et modifisert **guaninnukleotid** som settes på etter rundt 20-40 nukleotider har blitt transkribert
- 3' enden, som blir synlig kort etter polyadenyleringsignalet (AAUAAA) får påsatt 50-250 nukleotider med **adenin**, kalt en **poly-A-hale**.
- Disse igangsetter transport ut av kjernen og beskytter for enzymer
- Hjelper også ribosomene å feste seg til 5'-enden.



Legg merke til 5' UTR og 3' UTR, som ligger mellom halene. Disse har også viktige funksjoner i form av genregulering. Eller blir oversatt til proteiner som bidrar i genreguleringen.

RNA-spleising

- Store deler av DNA er **introner** (INtervening) som kuttes vekk ved hjelp av RNA-spleising.
- Den koden som faktisk blir proteiner er spredt med mellomrom i genet- **eksoner** (EXpressed).
- 5'UTR og 3'UTR blir også transkribert til mRNA, og kuttes ikke vekk
- Gjøres av et **spleisosom**
 - Kompleks av proteiner og snRNA (short, nuclear RNA)
 - Binder seg til sekvenser i intronet, inkludert sekvenser på enden, og kutter vekk intronet.
 - Limer så sammen eksonene på hver side
 - RNA bidrar til gjenkjenning, sammensetting og katalysering av reaksjonen!
- Eksonet som kuttes ut inntar en ringstruktur med en løs ende (**lariat**)

Ribozymer

- RNA-molekyler som fungerer som enzymer
- Noen organismer har intron-RNA som fungerer som ribozymer = de spleiser seg selv
 - Pre-rRNA til en protist fjerner sine egne introner
- Tre karakterer ved RNA som gjør at det kan være enzymer:
 1. Enkeltråd gjør at den er komplementær med seg selv og danner **3D-struktur**
 2. Noen av basene har funksjonelle grupper som kan delta i katalysen, akkurat som aminosyrene i enzymatisk protein
 3. RNA kan hydrogenbinde seg til annet DNA/RNA og skaper **spesifisitet**

Evolusjonsmessig har det vært diskutert om introner har gitt selektive fordeler eller ikke, men det er trolig mange fordeler. **Alternativ spleising** gjør at det er ulikt hva som oppfattes som et intron eller et ekson, som igjen gjør at samme gen kan gi ulike proteinprodukter. Siden hvert exon ofte koder for et **proteindomene** har intronene hatt betydning for **exon-shuffling** fordi det er «lettere» for et helt exon å bli med under overkrysning når det er så mye intron-terreng. Det antas også at noen introner oversettes i en viss grad.

17.4: Translasjon

Struktur og funksjon til tRNA

- Oversetter kodon til aminosyre fordi de bærer en aminosyre og har et antikodon
- Ca 80 nukleotider lang og foldet 3D av hydrogenbindinger innad.
- Flatpresset og utvunnet er det en kløver, mens i 3D ser det ut som en L
 - 5' og 3'-enden munner ut sammen, 3' enden er der aminosyren festes
- Transkriberes fra DNA i kjernen de også
- To instanser av molekylær «matching» foregår:
 - **tRNA-Aminosyre:**
 - Utføres av enzymer kalt **aminoacyl-tRNA-syntetase** som matcher aminosyren med alle tRNA som kan bære den
 - **MERK: INGEN tRNA KAN BÆRE FLERE AMINOSYRER**
 - Finnes 20 aminoacyl-tRNA-syntetaser – en for hver aminosyre
 - Aminosyren bindes kovalent til tRNA drevet av hydrolysering av ATP
 - Aminosyre + tRNA kalles **aminoacyl tRNA**
 - **tRNA antikodin-mRNA kodon:**
 - Det er ikke 61 ulike tRNA som man skulle tro (en for hvert kodon)
 - Dette betyr at noen tRNA må kunne binde seg til flere kodon
 - Årsak: Binding med tredje base er litt så-som-så: Kalles **wobble**
 - **Wobble forklarer hvorfor ulike tredje base ofte gir samme aminosyre**

Ribosomer

- Igangsetter tRNA antikodon mot mRNA kodon
- Består av en **stor** og **liten** subenhet, laget av komplekser av proteiner og en eller flere **rRNA** (tre hos mennesker og fire hos bakterier)
- **Eukaryoter:** Subenheter lages i nukleolus av rRNA og proteiner fra plasma. Sendes så ut gjennom porer.
- Hos både bakterier og eukaryoter settes subenhetene kun sammen når de skal oversette.
- Eukaryotiske ribosomer er **større** og har noen annen sammensetning enn bakterier sine, dette gjør at man kan inaktivere bakterieribosomer uten å påvirke de eukaryote.

- Bakterieribosomer er undersøkt helt til molekylært nivå!
 - Bindingssted for mRNA
 - **P-sted:** Holder tRNA som er «koblet» til den voksende kjeden
 - **A-sted:** Holder tRNA som er «next up»
 - **E-sted:** Holder tRNA som har gitt fra seg aminosyren
- Ribosom holder alt tett og godt sammen og katalyserer dannelsen av peptidbindingen mellom C-terminus på gamle og N-terminus på den nye
- Den store subenheten har et **tunell** over P som aminosyren vokser gjennom
- Store enighet i at **rRNA** har «ansvaret» i ribosomet, derfor er det et stor **ribozym!**

1. Initiering

- mRNA, en tRNA med en aminosyre, og begge subenhetene går sammen
 - En liten subenhet binder først mRNA og tRNA med metionin (AUG)
 - **Bakterier:** Binder i hvilken som helst rekkefølge, ribosomet binder seg til mRNA litt oppstrøms fra start-kodonet på en spesifikk sekvens
 - **Eukaryoter:** Subenheten har allerede festet metionin-tRNA og binder seg så til 5-capen og skanner nedover til det treffer AUG, der tRNA hydrogenbinder seg
- mRNA med initiator-tRNA og liten subenhet får så en stor enhet festet på seg og blir et **oversettelsesinitiatorkompleks**
 - Trenger **initieringsfaktorer** (proteiner) for at dette skal gå sammen
 - Krever energi ved hydrolyse av GTP
- Syntese foregår fra N-terminus til C-terminus

2. Elongering

- Aminosyrer lenkes til kjeden på C-terminus, dette krever hjelp av flere ulike elongeringsfaktorer (proteiner)
 1. **Kodongjenkjennelse:** Antikodon til innkommende aminoacyl-tRNA binder seg til mRNA på A-stedet. GTP → GDP
 2. **Peptidbinding:** RNA i stor enhet katalyserer peptidbinding mellom den nye i A og den i P-stedet. Aminosyre på tRNA i P bindes i stedet til aminosyren til tRNA i A.
 3. **Translokasjon:** tRNA i A flyttes over i P samtidig som «tomt» tRNA i P flyttes til E og slippes løs. mRNA beveger seg. GTP → GDP
- mRNA går gjennom ribosom med 5'enden først = ribosom beveger seg 5' – 3' på mRNA. Egentlig tror jeg den bare «dras gjennom».
- En «syklus» tar 1/10 sekund. Hvert tomme tRNA går ut i cytoplasma og «lades» på nytt av aminoacyl-tRNA-syntetaser

3. Terminering

- Stoppkodon (UAG, UAA og UGA) treffer **A-stedet**
- **Slippfaktor/ «release factor»**, et protein formet som et tRNA, binder seg til A-stedet.
 - Binder et vannmolekyl i stedet som hydrolyserer (kutter) båndet mellom kjeden og tRNA i P → polypeptid slippes løs
- To GTP brukes på å bryte ned elongeringskomplekset.

Ferdigstilling av protein

- Begynner å folde seg med en gang pga interaksjoner mellom de ladede aminosyrene
 - Chaperoner (bøtta) hjelper til med folding gjennom godt miljø
- Post-translasjonelle modifikasjoner
 - Kjemisk modifikasjon: Sukker, lipider, fosfatgrupper, sulfidbroer etc
 - Fjerning av aminosyrer fra aminoenden eller kløyving i flere deler
 - Sammenslåing av separate polypeptider som gir kvartærstruktur

Veivisning av polypeptidet til spesifikke områder i cellen

- **Bundne ribosomer:** Sitter på utsiden av ER og kjernemembranen. Lager proteiner til bruk i endomembransystemet (kjernemembran, ER, Golgi, lysosomer, vakuoler og plasmamembran) og sekreerte proteiner som **insulin**
 - **Frie ribosomer:** Syntetiserer proteiner som brukes i cytosol
 - Ribosomer kan bytte mellom å være frie og bundne
 - MEN: **all** proteinsyntese starter i cytosol, men polypeptidet til endomembranproteiner er **merket** med et **signalpeptid** (ligger i genet)
 - ~20 aminosyrer nær starten eller på starten (N-terminus)
 - Gjenkjennes av et protein-RNA-kompleks kalt **SRP** (signal-recognition-particle) som fører ribosomet til et reseptorprotein i ER
1. Polypeptidsyntese begynner i cytosol som normalt i fritt ribosom
 2. Signalpeptid er så godt som i starten, SRP gjenkjenner dette
 3. SRP binder til reseptorprotein i ER-overflaten og danner et proteinkompleks som har en **pore** og et signalkløyvende enzym
 4. SRP fjerner seg og syntesen fortsetter etter å ha translokert «hullet» inn i membranen slik at produktet spyttes inn der
 5. Signalkløyvende enzym kutter signalpeptidet vekk
 6. Polypeptid foldes inni ER og er good to go. Ribosom brytes ned.
 - a. Hvis proteinet skal sekreseres går det inn i ER (=vesikler etc etc)
 - b. Hvis proteinet er membranprotein blir det i stedet inkorporert i ER-membranen. (også her vesikler ut)

Det er også andre signalpeptider som brukes så polypeptidet i stedet går til kloroplaster, mitokondrier, insiden av kjernen eller andre organeller som ikke er i endomembransystemet. Her oversettes derimot mRNA **alltid** ferdig før det går inn i organellen, samt at translokasjonsmekanismene ofte varierer. Bakterier bruker signalpeptider for å sende de direkte til plasmamembranen (har ikke ER yo).

Bakterier og eukaryoter lager flere polypeptider av gangen ved at flere ribosomer fester seg til samme mRNA og danner kjeder av ribosomer kalt **polyribosomer**. Det går også an å lage flere mRNA. Bakterier har ingen cellekjerne, og kan derfor **samkjøre** transkripsjon og translasjon for masseproduksjon av genprodukt. Eukaryoter har post-translasjonelle modifikasjoner de må gjennomføre, dette gjør at det ikke fungerer.

17.5: Mutasjoner av en eller flere nukleotider påvirker proteinstruktur og funksjon

- **Punktmutasjoner** er mutasjoner i et enkelt nukleotidpar
- Mutasjoner må skje i kjønnsceller for å overføres og virkelig påvirke hele systemet

Substitusjon erstatter et nukleotidpar med et annet

- **Silent:** Mutasjonen koder samme aminosyre grunnet redundansen til koden
- **Missense:** Endrer aminosyren. Kan ha lite å si hvis området den sitter i ikke er kritisk.
 - Vanligste
 - Mange gir store endringer hvis det er i en viktig del av proteinet. Disse kan være positive, men som regel negative
- **Nonsense:** Endrer kodonet til et **stoppkodon**. Stanser produksjonen tidlig og gir fucka protein.

Inersjon og delesjon er innskudd eller fratrekk av nukleotidpar. Dette kan føre til **frameshift** som garantert gjør proteinet ikke-funksjonelt med mindre det skjer sent i sekvensen.

Nye mutasjoner og mutagener

- Mutasjoner kommer fra DNA replikasjoner og rekombinasjon
- Kan påvirke store strekker med DNA eller bare enkeltnukleotidsubstitusjoner
- Mye fikses av organismen selv gjennom kontrollorganer
- Kalles **spontane mutasjoner**
- **Mutagener** interagerer med DNA fysisk og kjemisk og øker sjansen for mutasjoner
- Fysiske: Røntgenstråling og nedover
- Kjemiske:
 - Nukleotidanaloger: Kjemikalier som likner nukleotider men parrer feil.
 - Andre kan feste seg til DNA og hindre korrekt kopiering.
 - Andre endrer nukleobasene slik at parringen blir annerledes

Definisjonen av et gen har med andre ord utviklet seg litt. Vi lander på at et gen er et område på DNA'et som kan uttrykkes for å produsere enten et ikke-kodende RNA-molekyl eller kodende RNA-molekyl. Samtidig er det mange som inkluderer promotere og andre regulære områder til bruk i translasjonen.

DU MÅ IKKE BLANDE REGULÆRE OMRÅDER I DNA OG RNA. UTR FINNES IKKE I DNA, MEN I RNA

Kapittel 18: Regulering av genuttrykk

Dette er ekstremt viktig fordi det kreves et svært intrikat system for å regulere hvilke proteiner en celle skal produsere, og dermed også dens funksjon.

GENERELT: Gener er skrudd AV. Hvilke mekanismer finnes for å fremme disse organismene?

Bakterier responderer på miljøendringer ved å regulere transkripsjon

- Eks: Evolusjon har favorisert bakterier som produserer kun det de trenger
- Eksempel: *e. coli* kan aktivere et spor som produserer tryptofan (aminosyre) hvis det er lite av det i tarmen og skru det av hvis det kommer
- To nivåer av metabolsk kontroll:
 - **Tilbakekobling:** Produktet virker på første enzym i sporet. Vanlig i anabolisme (biosyntese). Dette er justering av enzymene som allerede er produsert ved hjelp av andre kjemiske signaler.
 - Produktet justerer genuttrykk slik at produksjonen går ned eller opp. Kontrollen skjer på mRNA-produksjon, altså transkripsjon.

Operoner: Modell for mekanisme for kontroll av genuttrykk i bakterier fra 1961, foreslått av Francois Jacob og Jacques Monod

- *E.coli* produserer tryptofan av fem gener som gir 3 enzymer
 - De har samme promoter, og de sitter etter hverandre = en **transkripsjonsenhet** som blir ett langt mRNA-molekyl
 - mRNA har start- og stoppkodon som gjør at de blir fem ulike polypeptider.
 - Dermed: Hele produksjonen av skrur av på likt: **Koordinert kontrollert**
- «Bryteren» er en **operator** – DNA-segment som ligger inni promoteren eller mellom promoteren og de enzym-kodede genene. Styrer RNA-polymerasens tilgang til genene.
 - Operator + promoteren + genene de kontrollerer = **operon**
- *trp*-operonet er til vanlig skrudd på, men en *trp* **repressor**, et protein, kan binde seg til operatoren. Dette hindrer polymerasen i å gå langs tråden
 - Proteinet er spesifikt til operatoren slik at andre gener ikke skrur av
- Repressoren produseres av et **regulerende gen** (*trpR*) som er et stykke unna operonet og har egen promoter.
- Repressor-molekyler finnes hele tiden i lav konsentrasjon i cellen, men operonet er ikke permanent avskrudd fordi:
 - Binding av repressorer er reversibelt – jo færre av disse, jo oftere er genet skrudd på
 - Repressor er et **allosterisk protein** som bare kan feste seg (aktiv form) til operatoren når tryptofan binder seg til det
 - Tryptofan er en **corepressor** – samarbeider med et repressormolekyl

Undertrykkelige og induerbare operoner: To typer negativ genregulering

- Undertrykkelig operon: Vanligvis på, kan skrues av
- Induserbart operon: Vanligvis av, kan skrues på
- Eksempel: *Lac*-operonet (laktose)
 - Beta-galactosidase bryter ned laktose (disakkarid) til glukose og galaktose hos bakterier, men det er lite av dette enzymet når det er lite laktose
 - *Lac*-operonet kontrollerer tre gener, ett beta-galactosidase og to andre til bruk av laktose. Det har en operator, en promoter – r
 - Regulerende gen sitter unna operonet og kan skru det av ved å lage et allosterisk repressor-protein som binder seg til operatoren.
 - Repressor er derimot **aktiv** hele tiden og **blir inaktivt** når et lite molekyl – **inducer**, fester seg.
 - Aktiv betyr at den er festet til operatoren og ingen ting transkriberes – **genet er inaktivt**, men blir aktivt når repressor er inaktiv
 - I laktoses tilfelle er dette allolaktose – en isomer som skapes i små mengder når laktose går inn i cellen
- Dette er **negativ** kontroll fordi aktiv form av repressor-molekyl skrur genet **av**

Enzymene i laktosesporet er **induserende** – de kan skrues på. Induserende enzymer finner man gjerne i katabolisme fordi de reagerer på at et stoff kommer og skal brytes ned.

Enzymene i Tryptofansporet er **undertrykkelige** – de kan skrues av. Undertrykkelige enzymer finner man i anabolisme fordi de stanser produksjon av stoffet når det er nok. Begge disse «taktikkene» sparer ved å ikke lage overfløydige molekyler (enten det er katabolsk enzym eller et produkt av et anabolsk).

Positiv genregulering

- Regulerende protein interagerer med DNA for å skri transkripsjon **på**

E.coli foretrekker glukose hvis både det og laktose er til stede, enzymene for glykolyse er alltid til stede. Nedbrytning av laktose skjer først når det er laktose til stede **og** lite glukose. Syklisk AMP (cAMP) er «coaktivator» til CAP (catabolite activator protein), en **aktivator**. cAMP produseres når det er lite glukose til stede. Med cAMP bundet fester CAP seg til promoteren og øker affiniteten til RNA-polymerase (til *lac*-operon), som vanligvis er ganske lav. Dette stimulerer genuttrykk!

Lac-operonet styres dermed av to ting: Negativ kontroll av lac-repressoren, som alltid er aktiv, og positiv kontroll av CAP. Lac-repressor er en av/på knapp som skruer på når Lactose er til stede, mens CAP kontrollerer hastigheten ved å styre hvor høy affinitet polymerasen har. Dette gjør at selv om både glukose og laktose er til stede vil e.coli foretrekke glukose, mens når det er lite glukose vil den kjøre på med laktose. CAP regulerer også andre operoner som koder katabolske enzymer, disse kjører dermed i gang når det er lite glukose.

Husk at alt dette over gjelder for BAKTERIER

Eukaryotisk genuttrykkelse reguleres på flere nivåer: Både

en- og flercellede eukaryoter skruer av og på gener i respons på miljøforandringer. Regulering er viktig for at cellene skal kunne spesialisere seg og fylle ulike oppgaver, ulike celler har egne «program» for hvilke gener som er skrudd på og av.

Differensiell genuttrykkelse

Dette er fenomenet at selv om alle cellene i kroppen (unntatt hvite blodceller) har samme gener, blir disse uttrykt ulikt. En «typisk» celle uttrykker 20% av de protein-kodende genene, og svært spesialiserte celler som muskel- og nerveceller uttrykker enda færre. Det er mange steg i genuttrykkelsen som kan reguleres:

Eukaryoter har kjernemembran, dette gjør at det kan kontrollere etter transkripsjon i form av RNA-prosessering (bla. fjerning av introner, disse har ikke bakterie-DNA). De har også flere kontrollmekanismer før transkripsjon og etter translasjon enn bakterier. Alle disse stegene inngår ikke alltid i hver enkelt genuttrykk. RNA-postmodifisering spiller en stor rolle her.

Det vanligste punktet å kontrollere genuttrykk i organismer er ved transkripsjon, regulering her kommer fra utvendige molekyler som hormoner etc. Genuttrykk sidestiller derfor ofte med transkripsjon, men mer avanserte organismer enn bakterier regulerer også senere.

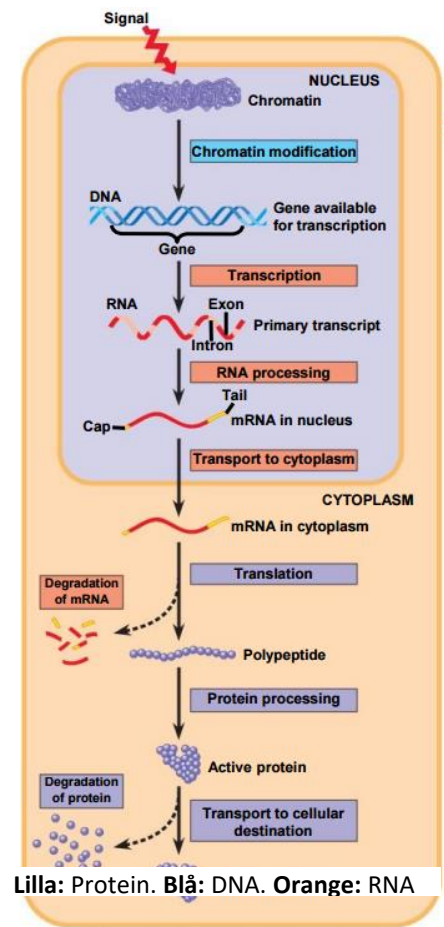
Ulike trinn

1. Kromatinstruktur

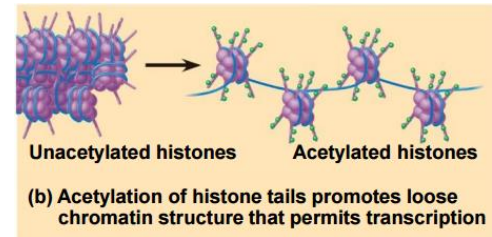
Genene er gjemt i kromatin som må blottlegges for å gjenkjennes av maskineriet.

Heterokromatin er så tett pakket at det vanligvis ikke lar seg pakke ut. Gener i dette uttrykkes ikke. **Eukromatin** lar seg derimot påvirke - kjemisk modifisering av histoner (DNA-bindene proteiner) og DNA i kromatin påvirker både kromatinstrukturen og uttrykk av gener

Histoner (som er basiske) har «haler» av aminosyrer (N-terminus) som står ut av nukleosomet som enzymer kan legge til grupper til.



- **Acetylering:** Løser opp kromatinstrukturen. Dekondenserende = transkripsjon
- **Metylering:** Kondenserer kromatinet
- **Fosforylering:** Dekondenserer ved siden av en metylgruppe! Regulerer.



- Histon-kode hypotese: Det er **kombinasjonen** av de ulike histonmodifikasjonene som gir endret genuttrykk.

DNA kan også **metyleres** ved å legge metylgrupper til cytosin i DNA

- Assosiert med redusert transkripsjon og **langvarig** inaktivering
- Nedarves ved at enzymer metylerer etter replikasjon = differensiering
- **Genomisk imprinting:** Metylering regulerer genuttrykk i maternalt eller paternalt allel helt i starten av utviklingsprosessen, avhengig av genets opphav!

Epigenetisk arv: Arvelighet av egenskaper uten at DNAet reflekterer det, med andre mekanismer enn nukleotidsekvens! Modifiseringene kan bli overført til neste generasjon celler. Eks: Tvillinger kan være ulikt sårbare for sykdommer fordi de er annerledes metylert.

2. Regulering av transkripsjonstart

- Eukaryot gen har eksoner og introner – de kodende genene trenger ikke sitte nær hverandre som hos bakterier
- Klump av proteiner: *Transcription initiation complex* dannes på promoteren oppstrøms på genet
- Pre-mRNA prosesseres og får blant annet en 5' cap og en poly-A hale.
- **Kontrollelementer:** Sekvenser av ikke-kodende DNA som er bindingssteder for transkripsjonsfaktorer.
 - Viktige for presis genregulering i ulike celletyper

Rollen til transkripsjonsfaktorer

- **Generelle** transkripsjonsfaktorer er essensielle for **alle** protein-kodende gener
 - Noen binder seg rett på DNA (til TATA-boksen for eksempel)
 - Flere binder seg til andre transkripsjonsfaktorer eller til RNA polymerase II
 - Viktig at hele komplekset er bundet før transkripsjon begynner
- **Spesifikke** transkripsjonsfaktorer behøves for å ha høye nivåer av transkripsjon på rett tid hos eukaryoter

Enhancere og spesifikke transkripsjonsfaktorer

- **Proksimale** kontrollelementer ligger nær promoteren
- **Distale** kontrollelementer, kalt **enhancere** kan ligge langt unna, både foran og bak eller i et intron.
 - Et gen kan ha flere enhancere, men aktivert til ulik sted, tid eller celletype
 - Enhancere er spesifikke
- Binding av spesifikke transkripsjonsfaktorer som **aktivatorer eller repressorer**, til kontrollelementene i enhancere, kan gi stort utslag i uttrykksaktivitet

Aktivatorproteiner har ofte en DNA-bindende del og en aktiveringsdel som binder andre regulerende proteiner eller deler av transkripsjonsmaskineriet

- De kan ha flere enn bare en av hver av disse delene
- Modellen for øyeblikket: **Bøying** av DNAet via proteiner fører enhanceren mot promoteren. Aktivatorproteiner har bundet seg til kontrollelementene i enhanceren.
 - **Mediatorproteiner** binder seg til aktivatorproteinene etter/rundt bøying, og disse interagerer med proteiner på promotoren
 - Protein-proteinkompleks dannes og polymerase kan kjøre på

Repressorproteiner kan inhibere på flere måter

- Binde seg direkte til kontrollelementer på DNA (på enhancere for eksempel) for å hindre at aktivatorer fester seg
- Kødde med selve aktivatormolekylene så de ikke kan binde seg

Noen spesifikke transkripsjonsfaktorer påvirker også **kromatinstrukturen**.

- Noen aktivatorer samler proteiner som acetylerer histoner nær promoteren, og dermed frigjør gener og promoterer transkripsjon
- Noen repressorer samler proteiner som fjerner acetylgrupper og dermed «silencer» gener

Kontroll via riktig kombinasjon

- Presis transkripsjon er svært avhengig av aktivatorer på kontrollelementer (slik som enhancere) – det er enormt mange gener = mange aktivatorer?
 - Nope: Det er overraskende få unike sekvenser på enhancere
- Ca 10 unike kontrollelementer per enhancer, og de kan binde 1 eller 2 spesifikke transkripsjonsfaktorer
- **Kombinasjonen** av disse er utslagsgivende, her er det mange muligheter fordi alle må være til stede for at det skal gå
- Situasjoner der de «riktige» er til stede skjer på ulik tid i cellen
- Ulike celler har ulike transkripsjonsfaktorer = ulik fenotype
- Dette skjer tidlig med «fordeling» av molekyler i blastocyst/egg

Koordinert kontrollerte gener i eukaryoter

- Ikke funnet operoner i eukaryotisk DNA
- Gener som skal samvirke sitter ofte langt fra hverandre
- Løsning: En spesifikk kombinasjon av kontrollelementer som interagerer med alle genene i «gruppen», som blir for eksempel enzymer i et spor.
- Respons på utvendig kjemisk signal – hormon-reseptor kompleks aktiverer transkripsjon ved at det er transkripsjonsfaktor på kontroll-element
 - Alle gener som stimuleres av komplekset vil kjennes igjen uansett hvor det sitter på kromosomene
- Gener med samme sett kontrollelementer aktiveres av samme kjemiske signal også for signaler som ikke går inn i cellen (slik som hormoner)

Kjernearkitektur og genuttrykk: I interfase trodde forskning før at det genetiske materialet lå som en spagettibolle hulter til bulter. Derimot viser det seg at regioner av kromosomene interagerer med hverandre ved å legge «løkker» av DNA i samme område der det er høy polymerase- og transkripsjonsaktivitet. Dette blir som en transkripsjonsfabrikk, og det er mye forskning på området fremdeles.

3. Regulering etter transkripsjon

Finregulering av genuttrykk hurtig i respons til skiftende miljø uten å måtte endre hva den produserer. Dette er ofte mekanismer som mangler i prokaryoter.

RNA-prosessering

- **Alternativ RNA-spleising:** Ulike mRNA produsert fra samme råtranskript avhengig av hvilke RNA-segmenter som oppfattes som exon/intron. En tråd 12345 kan oppfattes som 1235 eller 1245 for eksempel.
- Styres av proteiner
- Eksempel: *Drosophila* har et gen som kan spleises til 19000 membranproteiner, 94% av disse eksisterer
- Foreslått som forklaring på hvorfor det er så få «menneskegener».

Initiering av translasjon

- Kan blokkeres av regulatoriske proteiner som binder til sekvenser eller strukturer i mRNA på mi-deler (untranslated) i 5' eller 3'-enden. Både 5' capen og poly-A-halen er viktig for at ribosomer skal feste seg.
- Translasjon av alle mRNA i en celle kan være regulert samtidig
 - Eksempel er utviklede egg, som har mRNA som er ferdiglaget i tilfelle befruktning skjer eller hos planter der sollyst aktiverer translasjonsmaskineriet

mRNA-degradering: Levetiden til mRNA i cytoplasma = nøkkelfaktor.

- Bestemmer hvor ofte det leses av = mengde protein. Degraderes av enzymer.
- Bakterielt mRNA brytes raskt ned = rask respons på skiftende miljø
- Eukaryot mRNA lever lenger generelt, timer, dager, uker!
 - mRNA til hemoglobin i røde blodceller er eksempel
- **Leader** (5') og **trailer** (3') regioner bestemmer dette. Exo- og endo-RNA-nukleaser deltar i nedbrytning av mRNA ved å feste seg på disse.
 - **Exo** spiser fra enden: lengden av påhengene på endene bestemmer levetid
 - **Endo:** Klipper rett gjennom

Eksport av mRNA ut av cellen er induert av tilstedeværelse av poly-A-halen. Dette er også et viktig reguleringsprinsipp.

Proteinprosessering og degradering

- Kutting av polypeptidkjeden og addisjon av kjemiske grupper som fosfor (reversibel aktivering eller deaktivering) eller sukker (cellemembran)
- Eks: Insulin produseres som pro-insulin - en lang kjede A-B-C, men bare A og B-kjedene brukes C-kjeden kuttes vekk.
- **Proteasomer** er store proteinkomplekser som binder proteiner og degraderer dem. Proteiner kan «merkes» med ubiquitin, og det vil da gå inn i proteasomet og fragmenteres.
 - Kortlivethet er viktig for mange stoffer i cellen, slik som sykliske molekyler

18.3 Ikke-kodende RNA sin rolle i uttrykk av gener

- Bare en liten del av DNA koder for proteiner
- Masse av DNAet kan derimot transkriberes til ikke-protein-kodende RNA: **ncRNA**
 - rRNA, tRNA
 - Piwi-interacting RNA
 - MicoRNA
- Svært viktig i følge ny forskning – bakgrunnsmusiker mot rockestjerne
- Små og store ncRNA regulerer flere ganger før genet uttrykkes

MikroRNA og «small interfering RNA» sin effekt på mRNA

- Fokus på to små ncRNA, der begge er laget av dobbeltrådet RNA
 - **miRNA** (mikroRNA): Enkeltrådet, rundt 22 nukleotider lang tråd laget av en RNA-forgjenger via enzymer. Former et kompleks med en eller flere proteiner og er **komplementær** med mål-mRNA i minst 7-8 nukleotider. Bryter ned heller hindrer translasjon. Estimert at 50% av proteinkodende gener reguleres slik.
 - **siRNA** (small interfering RNA): Virker veldig likt som miRNA og binder til liknende molekyler for å få liknende resultater. Brukes i lab til å skru av gener.
- Disse kan leve **lenge** og påvirke ofte.
- Dette kalles **RNA-interferens (RNAi)**, i hvert fall i siRNA sitt tilfelle.
- Antatt å være beskyttelse mot virus-DNA, men eukaryoter produserer sitt eget dobbeltrådet DNA allikevel som brukes til andre ting

Remodelering av kromatinet av ncRNA

- Spiller en rolle i formasjon av heterokromatin i sentromeren
- I noe gjær: siRNA behøves for å danne heterokromatin igjen etter at det er løsnet opp og kopiert i S-fasen
 1. RNA produseres av sentromerisk DNA
 2. Komplementær RNA produseres – dobbeltrådet RNA dannes
 3. Prosesseres til enkeltrådet siRNA som former kompleks med proteiner
 4. Kompleksene binder seg til RNA som produseres av sentromerisk DNA
 5. Rekruttering av kromatin-modifiserende enzymer som initierer kondensering
 - Slik mekanisme ikke forstått i pattedyrceller enda

- **piRNA (piwi-interacting RNA):** Nylig oppdaget klasse av ncRNA som inducerer heterokromatindannelse og stanser parasitt-DNA (transposoner) fra å uttrykkes. 24-31 nukleotider lang og har enkeltrådet RNA som opphav. Svært viktig i kjønnceller for å etablere metyleringsmønstre etter duplikasjon.
- ncRNA er viktige for inaktivering av X-kromosomet hos hunner
- **Evolusjon av ncRNA** kan være viktig for kompleksitet, men dette er ikke bekreftet.

18.4: Et program av differensiering leder til forskjellige celletyper

Celler til vev, vev til organer og organer til organsystemer er alle et resultat av differensiering. Celledeling, celledifferensiering og morfogenese har alle opphav i celleoppførsel. Programmet er skrur av og på gener til ulik tid og i respons på ulike signaler for å til slutt ende opp med en organisme. Selv hos en fullt utviklet organisme er denne presise og nøyaktige reguleringen av gener en viktig mekanisme.

- **Morfogenese** er 3D-arrangeringen av ulike organer og bestanddeler av en organisme

Cytoplasmiske faktorer og utlørsignaler

- Skaper de første differensieringene i embryoet
- Eggets cytoplasma har RNA og proteiner fra morens DNA
- **Ujevn fordeling** av mRNA, proteiner, organeller og andre substanser ligger ujevnt i egget og påvirker utviklende embryo. Disse kalles **cytoplasmiske faktorer**
- **Induksjon:** Signaler fra nærliggende celler gjennom kontakt med overflatemolekyler eller vekstfaktorer sekretet av disse. Interaksjon mellom nærliggende celler!

Sekvensiell regulering av genuttrykk under cellulær utvikling

- Før de kjente til det molekylære i embryoet var differensiering punktet der cellen hadde ingen vei tilbake selv om den ble plassert et annet sted i embryoet
- I dag: **vevsspesifikke proteiner** markerer overgangen og gir cellen utseende og funksjon
 - Først: mRNA dannes i cellen, så: Observerbare endringer
- Flere ulike steg i uttrykking reguleres under differensiering, transkripsjon er mest normalt og fortsetter å være det i ferdig celle
- Differensierte celler er «spesialister» i å danne vevsspesifikke proteiner
- **Determinering:** Gener skrur av/på og cellens «skjebne» forsegles.
- **Myoblaster:** Etter cellen har blitt determinert

Determinering av muskelcelle

- Forskning har isolert embryoniske opphavsceller og skrudd av/på gener helt til det skjedde noe. **Sjefsregulatoriske gener** ble funnet.
- Eksempel: Sjefsregulatorisk gen kalt **myoD** koder for MyoD protein, en transkripsjonsfaktor som binder seg på enhancere og stimulerer genuttrykk av muskel-spesifikke gener

- myoD gir positiv feedback til egen produksjon av myoD slik at det holder seg gående
- Skruer på gener som blokkerer cellesyklusen

Mønsterdannelse og etablering av kroppsplan

- Induserende signaler og cytoplasmiske determinanter er viktige i dannelsen av kroppsform og organenes plassering i denne. Prosessen kalles **mønsterdannelse** og de viktige molekylene er tegn som kalles **posisjonsinformasjon**
 - Forteller en celle sin relative posisjon i forhold til kroppsaksen og de andre cellene
- Begynner hos dyr i tidlig embryo med utvikling av de tre aksene, x, y, z før organer
- *Drosophila* har gitt mange svar på slik forskning og sørget for oppdagelsen av prinsipp for utvikling felles for mange andre arter

Drosophila sin livssyklus

- Bilateral symmetrisk
- Cytoplasmiske faktorer som avgir posisjonsinformasjon er til stede allerede før eggets befruktning.
- Egget utvikles i livmor med celler som gir egget næring, mRNA og andre stoffer som behøves for cellens utvikling
- Segmentert larve utvikler seg som igjen blir til et voksent individ

Genetisk analyse av tidlig utvikling

- Edward B. Lewis studerte mutasjoner av bananfluen og la grunnlaget for at gener sørger for prosessene i utviklingen
- **Homeotiske gener:** Kontrollerer mønsterdannelse
- **Embryoniske dødeligheter:** Gener som man tuklet med for å se utviklingsresultatet førte til død på et alt for tidlig stadium
 - Løsning: Så på recessive mutasjoner
- Forskning på **bicoid**-genet (produserer proteinet **bicoid**, ansvarlig for å danne foranbak-aksen) viser at **konsentrasjonen** av proteinet er størst foran i embryoet
 - Morfogen-gradient-hypotesen: Gradienten bestemmer dannelsen av strukturer
 - Injiserte bicoid mRNA – hodestrukturer dannet seg der de gjorde det.
- Etter at mRNA fra moren har kjørt sitt «opplegg» blir disse ødelagt og DNA tar over.

18.5 Kreft er et resultat av genetiske endringer som påvirker cellesykluskontroll

Gener assosiert med kreft

- Gener som vanligvis regulerer cellevekst produserer vekstfaktorer, deres reseptorer, og molekyler brukt i signalspor.
- **Oncogener:** Gen som fører til kreft
- **Proto-oncogen:** Vanlig gen som stimulerer til normal cellevekst- og deling
- Tre kategorier av mutasjoner som kan konvertere proto-oncogener til oncogener:

- Translokasjon og transposisjon: Gen flyttes til nytt lokus og får dermed ny (og muligens veldig aktiv) promoter.
- Amplifikasjon: Flere kopier av genet fører til mer produkt
- Punktmutasjon: Kontrollelement fungerer ikke eller produkt motstår degradering

Tumor-supressor-gener har produkter som inhiberer ukontrollert cellevekst. Mutasjoner kan føre til for få av disse.

- Reparasjon av DNA (hindrer mutasjoner)
- Kontroll av tilknytning til andre celler
- Inhibering av cellesyklus

Interferens i normale signalspor

- Mutasjoner i ras-genet kan føre til et hyperaktivt ras-protein (g-protein) som ikke lar seg stanse selv om det ikke er en vekstfaktor koblet til det. Dette gjør at kaskaden alltid er aktivert og transkripsjonen går. Dermed blir det **overuttrykk**
- Mutasjoner i **p53-genet** gjør at en transkripsjonsfaktor ikke produseres, som igjen fører til at et protein som inhiberer cellesyklusen ikke produseres.
 - p53 = **Skytsengel**
 - Aktiveres i respons på DNA-skade og aktiverer igjen flere andre gener som reparerer DNA, hindrer cellesyklus eller fører til **apoptose** hvis DNA ikke klarer å repareres.
- Fremdeles ikke fullstendig forstått hva som nøyaktig gjør en celle til en kreftcelle.

Multistep-modellen: Man trenger ofte mer enn en mutasjon for at en celle skal bli en kreftcelle, dette kan forklare hvorfor man ikke får kreft før man blir gammel (ofte). Genene må «hope seg opp» på samme måte som en vannglass sakte fylles med vann. Arver du nok mutasjoner til å ikke føre til kreft med en gang vil du allikevel trolig få det etter hvert som DNA-et ditt muterer. Mutasjoner føres ikke videre med mindre det skjer feil i celledelingen under embryoutvikling, i meiosen eller i cellene som produserer kjønnceller. Ofte må mutasjonen være i minst i flere tumor-supressor gen og proto-oncogener. Både *ras* (normal cellevekst) og *p53* (hindrer cellesyklus og reparerer når det er skade) er ofte involvert i kreft. Man regner med at rundt 6 gener må mutere. Mutant-tumor-supressor-gener er veldig ofte recessive, noe som betyr at begge må mutere. Oncogener er derimot ofte dominante. Dette hjelper også til å forklare arveanlegg for kreft, og hvordan disse nedarves og gir noen «garantert» kreft.

Virus og kreft

- Tumorvirus kan føre til kreft ved å injisere kreftfremkallende DNA og integrere det i organismen
- Virus kan ha så mye som 15% av kreft
- Virus kan produsere proteiner som deaktiverer p53 og andre tumor-supressorgener

Bryskreft: Det er funnet 4 «hovedtyper» brystkreft der alle artene er relatert til signalreseptorer, enten det er for mange eller for få. Mary-Claire King jobbet lenge med brystkreft på 1970-tallet og kom frem til at mutasjoner i BRCA1 eller BRCA2, tumor-supressor-gener, var assosiert med høy risk for brystkreft.

Kapittel 19: DNA-teknologi

Anvendt biologi. Anvendelse av naturvitenskap og teknologi på levende organismer og på deler, produkter og modeller av disse. Feltet har hatt enormt rask vekst etter at vi fikk kunnskap om arvematerialet og evnen til å hente ut enzymer som kan klippe, lime og syntetisere DNA. Det har også blitt ekstremt mye billigere

Verktøykassen

- Sekvensering av humant genom i 07'
 - Nylig fullstendig sekvensering av neandertalere og ullmammut
- Ny teknologi for ekstremt mye bedre og raskere, billigere sekvensering
- **Rekombinant DNA:** Nukleotidsekvenser fra forskjellige kilder satt sammen *in vitro* til ett DNA-molekyl
- Vi er på «tredje» generasjon sekvenseringsteknologi.
- **Nukleærasyrehybridisering**, baseparingen av en tråd nukleinsyre til den komplementære sekvensen i den andre tråden
- **Genetisk ingeniørkunst** er direkte manipulasjon av gener i praktisk henseende.

DNA-sekvensering – prinsippet om A-T og C-G er utgangspunktet

Bedre DNA-sekvensering har ført med seg en kaskade av fremskritt og skapt forståelse for grunnleggende biologiske og evolusjonsmessige prinsipper.

Dideoxy kjedetermineringsmetoden: Prinsipp av Sanger for å sekvensere korte DNA-fragmenter

- Fikk nobelpris
- Brukes fremdeles i dag for små jobber
 1. DNA som skal sekvenseres brytes til enkelttråder
 2. I testbeholderen: Primer, polymerase, vanlige deoksiribonukleotider (dNTP) og **dideoxyribonucleotider** (ddNTP) som er tagget fluoriserende
 3. Syntese starter med primer og danner ny tråd bortover, men STANSER hvis det TILFELDIGVIS legges til en ddNTP
 4. Etter hvert har det blitt laget et tråd med hver eneste lengde som er mulig
 5. De ulike lengdene skilles nedover et rør med gel, og fluoriserende tag leses av for hver lengde

«Next-generation» -teknikker: En immobilisert templattråd kopieres og produserer sinnsykt mange fragmenter som sekvenseres parallelt: Høykapasitetsteknologi

- «Sekvensering gjennom syntese» - maskin teller hvilke nukleotider som legges til
 1. Genomisk DNA fragmenteres til 400-1000 basepar
 2. Hver fragment isoleres med en plastkule (dynabeads)
 3. PCR kjøres på fragmentet, 5'-enden fester seg på kulen til 10^6 dekker hele
 4. Kulen plasseres i en nedsenkning (2 millioner av disse) sammen med polymeraser og primere som kan hybridisere med 3' enden.
 5. En løsning av hver nukleobase legges over og vaskes av igjen, for hver av nukleobasene.
 6. Hvis det er «riktig» base vil PP_i (difosfat) frigjøres når den legges til av polymerasen, dette skaper et **lysglimt** som kan registreres
 7. Feil base = ikke noe lysglimt
 8. Dette gjøres igjen og igjen til alle sekvensene er ferdige

Tredjegerasjonssekvensering gir raskere og billigere teknikker. Her kan en enkeltrådet DNA bevege seg gjennom nanoporer mens basene detekteres gjennom strøm.

DNA-kloning og dets anvendelse

Problemet med DNA er at det er veldig lang, bærer mange gener, samt at det ofte er stor avstand mellom disse genene. Det er vanskelig å skille gener og introner fra hverandre. Løsningen er DNA-kloning for å lage veldefinerte og kjente kopier av gener/DNA-lengder.

Kloning av DNA i lab via bakterier og plasmider

- Plasmider replikerer separat fra bakteriekromosomet og den klarer seg som regel uten – de brukes i spesifikke omgivelser for eksempel
 - Plasmider er spesifikke for sin bakterie
 - Hentes ut og modifiseres for effektiv kloning
 - DNA fra annen kilde (fremmed DNA) settes inn – **rekombinant plasmid**
 - Settes inn og skaper en **rekombinant bakterie**
- Hvorfor ikke PCR?
 - PCR har utfordringer relatert til lengde på gen som skal kopieres
- Hvis DNA skal inn i bakterier må man bruke cDNA!
- Primære plasmid kalles en **kloningsvektor**
 - Frakte fremmed DNA inn i en vertscelle og replikere der
 - Kan i dag kjøpes fra firmaer

Restriksjonsenzymer for å lage rekombinant DNA

- Restriksjonsenzymer, eller restriksjonsendonukleaser, kutter DNA i spesifikke sekvenser kalt **restriksjonssteder**
- Egentlig en forsvarsmekanisme, det finnes flere hundre av disse som har blitt isolert!
 - Bakterien beskytter eget DNA ved å ha metylgrupper til A eller C innenfor stedet
- Danner flere **restriksjonsfragmenter** fordi hvert enzym «kjenner igjen» de 4-8 nukleotidparene flere steder i DNAet!
 - De mest nyttige kutter på en «trappetrinns måte» som lager **limbare ender**
 - Kutting med samme restriksjonsenzym gjør at restriksjonsfragment kan limes inn i fremmed molekyl via limbare ender
 - **DNA ligase** forseglar sukker-fosfatryggen etterpå

For å teste om plasmidet har tatt opp fragmentet kan det kjøres ny runde med restriksjonsenzymer på «nytt» plasmid og et standard, gammelt ett. Disse kan så kjøres i **gelelektroforese** for å skille de ulike fragmentene fra hverandre. Rekombinant plasmid vil ha en «ekstra» strek for fragmentet sitt, mens det «gamle» ikke vil ha dette. (PCR først da).

PCR og dets bruk i DNA-kloning

- Hvis sekvensen som skal kopieres er kjent kan man starte med fullt gDNA og tilsette riktig primer, for så å kopiere opp flere millioner kopier.
 1. Oppvarming for å separere DNA-tråden
 2. Nedkjøling for at primer skal hybridisere med tråden
 3. Oppvarming til optimal temperatur for DNA-polymerasen, gjerne Taq-polymerase fra *Thermus Aquaticus* funnet i varme kilder.
- Kan ikke brukes som alternativ til genkloning i celler fordi feil nå og da begrenser antall gode kopier og lengde på disse
 - Brukes i stedet til å kopiere opp det spesifikke fragmentet som skal inn i cellen
 - Primere designes med en restriksjonssete på hver ende av DNA-fragmentet som matcher vektoren det skal brukes i
- Vektoren (plasmider) inneholder ofte et gen som gjør det resistent mot en type antibiotika slik at bakterien kan avles frem!
- PCR har gjort det mulig å hente store mengder DNA fra blod, vev, sæd etc.

Genomisk bibliotek er alt DNA fra en hel organisme lagret i form av identiske vektorer.

- **Plasmidbibliotek:** Lagret i plasmider hos ulike bakteriekolonier
- **Fagebibliotek:** Lagret i fage-virus
- **BAC-bibliotek:** «Bacterial artificial chromosome» som er trimmet ned i størrelse og kan oppta mange ulike fragmenter.
- **cdNA-bibliotek** lages ved kloning av DNA-fragmenter laget *in vitro* ved revers transkripsjon av mRNA i en spesifikk type. Dette gjør at man slipper intronene.
 - Representerer dermed bare en liten del av DNAet: Den delen som transkriberes i det aktuelle vevet.

Screening av et bibliotek for å finne et spesifikt gen gjøres ved **nukleinsyrehybridisering**. Man tilsetter en løsning med sekvenser tilsvarende genet/sekvensen man ønsker å finne og merker av disse radioaktivt. Kolonien som inneholder genet man vil ha kan deretter kultiveres ytterligere.

Klonede gener kan uttrykkes i både bakterier eller i eukaryote celler, begge har fordeler og ulemper:

Bakterielle uttrykksystemer

- Klonet eukaryot gen har ofte utfordringer i bakterier fordi genuttrykk er forskjellig for de to organismene – promotere og andre DNA-kontrollsekvenser
 - Trenger **uttrykksvektor**: Kloningsvektor med svært aktiv bakteriepromoter litt foran restriksjonssetet der det nye genet settes inn
- Trenger å bruke cDNA

Eukaryotisk DNA-kloning og uttrykksystemer

- **Gjær** vokser like raskt og enkelt som bakterier og **har også plasmider!**
 - Plasmider som fungerer i både gjær og bakterier har blitt laget!
 - YAC og BAC: Artificial chromosomes fra gjær og bakterier respektivt.
- Mye eukaryote proteiner trenger etterbehandling i form av glykolysering eller lipidgrupper – dette kan ikke bakterier gjøre, og heller ikke alltid gjær en gang!
 - Funnet andre cellelinjer som kan gjøre dette, deriblant insektceller og pattedyr.
- **Elektroporer** er korte elektriske pulser for å skape hull i plasmamembranen
 - Bakterier trenger nesten bare å blandes med nytt DNA
- **Injisering** av DNA direkte i celler ved å bruke mikroskopisk tynne nåler
- **Bakterier/virus** til å injisere DNAet.

Gelelektroforese

- Hurtig analyse og sammenligning av genomer
- Gel er molekylær sikt for å separere proteiner eller nukleinsyrer basert på størrelse
- Molekyler sorteres i «bånd» basert på størrelse
- Trekkes fra katode til anode
- **Restriksjonsfragmentanalyse**: Restriksjonsenzymet behandler et DNA-molekyl og disse sorteres størrelsesmessig
 - Nyttig analyse for å sammenlikne cDNA for å se uttrykking av gen

Analyse av genuttrykk

- Baserer seg ofte på å identifisere hva slags mRNA som blir produsert i cellen
- Viktig steg i å forstå hva som skiller celler fra hverandre

Uttrykk av enkeltgener

- Lage «probemolekyler» med fluoriserende merker for å finne ut hvor for eksempel i embryoet ulike gener uttrykkes
- **In situ hybridisering:** Analyse av noe der det vanligvis forekommer
- **RT-PCR** (revers transkriptase PCR): Sammenlikne mengden av et spesifikt mRNA i ulike steder
 1. Enkeltråd DNA lages av revers transkriptase fra alle de ulike mRNA fra stadiene i en utvikling
 2. PCR kjøres med primer som kun korresponderer til genet vi vil undersøke, og kjøres like lenge for hvert «stadium»
 3. Fluoriserende stoff som bare binder seg til dobbeltrådet produkt kan merkes av PCR-maskinen (bra kvantitativt, RT-qPCR), eller det kan kjøres gelelektroforese og se på tykkelsen av båndene.
 - RT-PCR kan også brukes til å bestemme hvilket vev som produserer mRNA

Uttrykk av grupper av gener

- Systemtilnærming for å identifisere nettverk av genuttrykk over et helt genom
- **DNA-mikromatrise** (microarray, DNA-chip) – en **høykapasitetsanalyse** som sammenlikner uttrykk av ulike vev eller til forskjellig tid.
 - Enkeltrådet DNA som representerer ulike gener er festet i et mønster, representerer ideelt hele organismen.
 - mRNA av interesse lages om til cDNA som igjen merkes av fluorescens
 - cDNA fra ulike kilder merkes ulikt – sendes over samme medium og **graden av farge** bestemmer hvilket cDNA det er mest av
- **RNA-sekvensering** (RNA-seq) sekvenserer cDNA fra ulikt vev for å se hvilke gener som uttrykkes
 - Enkel og grei metode
 - Blir billigere og billigere, kan overta for mikroarray
 - Må fremdeles kjøre RT-PCR for å sammenlikne mengden RNA som produseres

Bestemmelse av genfunksjon

- Liknende gen hos andre betyr ofte liknende funksjon – geners fellestrekk og felles opphav avdekkes ofte (Øyne hos drosophila gir øyne hos frøsk)
- Inaktivere gen og observere konsekvens
 - **In vitro mutagenese:** Mutasjoner introduseres i et klonet gen og settes tilbake i cellen = sammenlikning
 - «**Knock-out**»-strategi: Slå ut et gen og observere mutanten
 - Endrer ikke nødvendigvis fenotypen, men hvis den gjør det gir det informasjon om hva funksjonen til genet ofte er!

- «**Knock-in**»-strategi: Setter inn mange kopier av et enkelt gen og setter tilbake = overuttrykk
- **RNA-nterferens (RNAi)**: Syntetiske dobbelttrådede RNA-molekyler som matcher sekvensen av et spesifikt gen brukes til nedbrytning eller blokkering av translasjon.
 - Celler liker ikke dsRNA og prøver å fjerne that shit = nedbrytning av gen
- Hos mennesker kan vi av etiske årsaker bare sammenlikne genene til folk som er syke for å analysere dem.
 - Sjekker **genetiske markører** – DNA-sekvenser som varierer i en populasjon = polymorfisme
 - Finnes både i kodende og ikke-kodende områder
- **SNP – enkeltnukleotidpolymorfisme** er variasjoner i ett enkelt basepar som finnes i minst 1% av befolkningen. De står for 90% av menneskets genetiske variasjon
 - Ca 10-20 millioner av disse i menneskets DNA, ca 1/300 basepar (kodende og ikke-kodende)
 - Kan bli funnet gjennom PCR eller mikroarray
 - Mange av disse **er relatert til sykdom**
- Identifiserer felles SNP i alle de syke og fokuserer på området rundt SNPen
 - Hvis SNP og sykdoms-allelet er nærme nok vil disse aldri skilles i overkrysning og dermed nedarves sammen
 - Funnet sammenheng mellom SNP og diabetes, hjertesykdom og kreft

Kloning og stamceller til forskning og andre anvendelser

- Interessant på grunn av **stamceller**
 - Kan reprodusere evig
 - Kan differensiere til ulike celler – reparere cellelev
- Ikke uproblematisk å sette en kjerne fra en differensiert celle til å bli en hel organisme
- **Totipotent celle**: Kan generere en komplett ny organisme ved å **dedifferensiere** til en primitiv celle og deretter differensiere «tilbake» igjen.
 - Eksperimenter på 1950-tallet viste at enkeltceller fra gulrot fint kunne bli en ny plante

Kloning av dyr

- Kultiverte spesialiserte dyreceller deler seg som regel ikke
- I stedet brukes kjernetransplantasjon: Fjerner kjernen fra et befruktet eller ubefruktet egg og erstatter med kjernen fra differensierte celler
- Froske embryoer viser at transplantert kjerne KAN dirigere normal utvikling
 - Med økende alder/differensieringsgrad synker prosenten som utvikler seg normalt
 - Embryocelle = som regel normalt, tarmcelle = stans i vekst

Reproduktiv kloning av pattedyr

- Dolly i 1997 gjennom kjernetransplantasjon fra **differensiert** jurcelle (altså ikke embryo, som de visste var mulig)
 - Jurceller ble kultivert i næringsfattig medium
 - Transplantert inn i eggceller uten kjerne, utviklet seg til embryo
 - Embryo inn i surrogatmor = ny sau
 - Mitokondrie-DNA kom fra eggcelledonor, dette var forventet
- Dollys døde prematurt i 2003 av alderdomssymptomer = spekulasjon om «ufullstendig» reprogrammering av den opprinnelige kjernen

Kloning har så langt vist seg å være dritvanskelig. Dyrene har lav sjanse for å bli til, og dør/blir syke tidlig. Dette er trolig grunnet epigenetiske endringer som DNA i ulike celler gjennomgår. Kromatinstrukturen må endres for at dette skal fungere ordentlig.

Stamceller

- Unge embryo inneholder **stamceller** som er utgangspunkt for differensierte celler
- **Embryoniske stamceller** kan vokse uendelig i kultur
 - Kulturbetingelser (hormoner) gir ulike celler av disse
 - Opphav til alle embryoniske celletyper
- **Stamceller fra voksne** kan gi opphav til mange celletyper som behøves i kroppen for å erstatte ikkedelende celler etter behov, men ikke alle!
- Stamceller kan både multiplisere til spesialisert celler eller flere kopier av seg selv i påvente av dette
- Få antall av disse i voksne individer, de er funnet i mange rare steder i kroppen

Embryoniske stamceller (ES): Er **pluripotente**, kan differensiere til mange forskjellige

- Ønske å fremstille celler til reparasjon av ødelagte eller syke organer
- ES er omstridt etisk og politisk fordi de hentes ut av embryo
- Blastocystceller hentes ut og kultiveres i vekstkultur slik at de differensierer
 - **Terapeutisk kloning**
- **Induserte pluripotente stamceller (iPS):** Behandling av differensierte celler tilbake til ES-celler.
 - Retrovirus setter inn ekstra kopier av fire stamceller master regulatoriske gener for å lage iPS
 - iPS kan gjøre mesteparten av det ES kan
 - Celler fra sykt vev kan gjøres om til iPS-celler for å studere forskjellen
 - Kan reprogrammere et pasients egne celler til stamceller for å erstatte vev uten at immunforsvaret reagerer
 - iPS får svært mye forskning og kan være nøkkelen for å slippe alle de etiske spørsmålene

Praktisk anvendelse av DNA-teknologi

Identifisering av humane gener der mutasjoner gir sykdom

- PCR og primere som detekterer sykdomsgener – ved kjent rekkefølge kan RT-PCR brukes til å kopiere opp, og dermed bekrefte tilstedeværelsen, av et gen
 - HIV, sigdcelleanemi, cystisk fibrose og duchenne sitter alle på kjente rekkefølger, disse oppkopieres og sekvenseres
- **Enkeltnukleotid polymorfisme (SNPs, snips)** er genetiske markører som er en-basepar i genomet som varierer i en populasjon
 - Tilsats av restriksjonsenzym resulterer i DNA-fragmenter av varierende lengde på grunn av SNP: **Restriksjonsfragment lengdepolymerase (RFLP)**
 - Assosiert med ulike sykdommer

Human genterapi

- Erstatte sykdomsfremkallende gen med et friskt – lovende behandlingsprinsipp
- Kun for sykdommer som oppstår av enkeltgener
- Kan kun brukes hos celler som deler seg gjennom hele livet, eller erstatte alt sykt vev fullstendig
- Vektorer anvendes for å levere genene – virus er vanlig
- Reiser etiske spørsmål og andre problemer
 - Kontroll av hvor mye som uttrykkes
 - Passe på at andre gener ikke skades
 - Lage perfekte mennesker? Etter hvert som teknologien blir bedre og bedre blir dette svært relevante spørsmål

Farmasøytiske produkter

- Syntese av små molekyler som legemidler
 - Imatinib: Lite molekyl som hemmer overuttrykk av en spesifikk leukemi-fremkallende tyrosinkinase-reseptor (aka kreft)
 - Kreften utviklet seg, de med mutasjonen som overvinnet imatinib består og får mindre «konkurrans» = evolusjon
- Proteiner kan syntetiseres i stor skala i cellekulturer og planter
 - For eksempel – insulin, humant veksthormon, vaksiner etc.
 - Kan designes slik at det sekreseres etter produksjon = enda lettere å få tak i
- «Farma-dyr og planter» er **transgene** dyr laget ved å introdusere gen fra en art til genomet i en annen art
 - Farmasøytiske fabrikker som kan lage sjeldne substanser!
 - De er *litt* annerledes, trolig pga. forskjeller i modifisering av proteinet

Rettsmedisin og genetisk profilering

- DNA-profil kan finnes ved analyse av vev eller kroppsvæsker
 - Kan brukes som bevis i **rettsaker** eller **farskapssaker**
 - Genetiske profiler kan analyseres ved RFLP analyse
- **STR: Korte tandemmarkører** er to til fem nukleotider som repeterer igjen og igjen i spesielle deler av kromosomet
 - Trenger ikke å være homologe (aka ulike alleler!). På det ene kan det repeteres 30 ganger, på det andre for eksempel 15.
 - Sammenlikning av disse gjennom fluoriserende primere og gelelektroforese viser lengden
 - Behøver bare å bruke 13 STR-markører fordi sjansen for at disse er identiske er utrolig liten
- Markørfrekvens varierer i ulike etniske grupper, dette må tas hensyn til!

Miljørensing: Modifisere metabolismen til mikroorganismer for å ekstrahere mineraler eller degradere giftig miljøavfall. Dette kan gjøres fordi slike organismer allerede eksisterer, men ikke alltid møter gode levekår der det trengs. Derfor hentes gener ut! Disse kan potensielt rense alt som vi trenger å rense, spesielt fytalater i vann, klorerte hydrokarboner og annet.

Biodrivstoff som mais, soyabønner og andre busker kan erstatte fossilt brennstoff. **Bioplast** kan fremstilles og er mer miljøvennlig enn å bruke fossilt brennstoffbasert plast

Husdyr og avlsplanter kan få en **raskere selekteringsprosess** ved at gener for egenskapene man ønsker settes inn i stedet for å avles frem. Dette kan være bedre kvalitet på ullen, større muskler eller hurtigere vekst, for eksempel.

- **TI-plasmidet** er vanlig vektor for å introdusere nye gener i planteceller
 - Kommer fra en jordbakterie som integrerer litt av sitt DNA inn i plante-DNA.
 - Kan gjøres på vanlige somatiske celler siden de ofte kan gro en ny plante
- Plasmider kan gjennom teknologi i dag introduseres i mange eukaryote celler
<https://www.quora.com/Genetic-Engineering-How-can-eukaryotic-plant-and-animal-cells-take-up-and-express-genes-delivered-on-prokaryotic-plasmids>

Sikkerhet og etiske spørsmål oppstår alltid når det kommer til GMO. Det er flere sikkerhetsrutiner for forskere som jobber med dette for å hindre at organismer med endret genom slipper ut av laboratoriet. Samtidig er det bekymring for GM-organismer.

1. De kan hybridisere med for eksempel ugress og skape farlige hybrider
2. De kan utkonkurrere naturlige dyr og skape ubalanse i sitt økosystem
3. De kan være farlige for mennesker gjennom allergier og liknende
4. Vi vet ikke fullstendig konsekvensene, da dette er forholdsvis ny teknologi

Det stilles i dag ulike krav til GMO fra USA og Europa. EU er veldig strenge på dette, mens det i USA er meget normalt å bruke, spesielt med tanke på grønnsaker. Det er mange instanser som kontrollerer at maten som slippes ut på markedet er «trygg».

Kapittel 20: Genomer og deres evolusjon

Det finnes komplette genomsekvenser for bl.a. e.coli, gjær, en nematode, mus, drosophila, rhesusape, arabidopsis og flee. Sammenlikning av genomer mellom organismer gir informasjon om evolusjonær utvikling av gener og taxonomiske grupper!

- **Genomics:** Studium av hele sett gener og deres interaksjoner
- **Bioinformatikk:** Anvendelse av computer-baserte metoder for å lagre og analysere biologisk data

Nye metoder og teknologier har økt hastigheten ved sekvensering

- Human genome project var for det meste ferdig i 2003
- Enorm utvikling i hastighet etter hvert
 1. Genetisk kartlegging (grovkartlegging av kromosomer, bestemmer grovt sett hvilke gener som sitter sammen på hvilket kromosom og hvor langt unna hverandre = **koblingsanalyse**)
 2. Fysisk kartlegging tar for seg basene en for en
 3. DNA-sekvensering
- **Fysisk kart** beskriver avstanden mellom genetiske markører i form av antall basepar
 - Kutter kromosomer med restriksjonsemzymer og identifiserer enkeltfragmenter for å sette de etter hverandre og identifisere overlappende områder
 - Sekvenseringsmaskiner brukes til å bestemme komplett nukleotidsekvens
- **Shotgun-metoden** ble utviklet i 1992 og sekvenserer tilfeldige DNA-fragmenter direkte i stedet for å kartlegge. Programmer brukes deretter til å ordne fragmentene som en fortløpende sekvens
- **Metagenomics** brukes avansert datateknologi til å sortere ut individuelle genomer ut av et miljøprøve, slik som i kulturer av mange ulike bakterier. Man slipper å kultivere hver enkelt koloni på den måten.

Både 3-fasesekvensering (dedeoksymetoden) og shotgun ble brukt i «Human Genome Project». Forskere var skeptisk til shotgun først, men dette er nå den mest brukte metoden «method of choice».

- Nyere metoder lager «reads», fragmenter på 25-500bp som avleses direkte og samtidig
 - Disse kan sekvenseres enormt fort
 - «Whole genome sequencing», flere firmaer har utviklet metoder for å gjøre dette
 - Nanoporer
 - 454 technology
 - Fluorophore technology
 - DNA nanoball technology

Bioinformatikk til å analysere genomer og deres funksjoner

- Genomet er bare en laaang mengde A, T, C og G, man må lage et system på det!
- Databaser har blitt opprettet som kan søkes gjennom via internett
 - Har gitt fremskritt i DNA-sekvensanalyser fordi informasjonen er tilgjengelig (heldigvis)
 - Sammenlikne gener med liknende sekvens i andre organismer = kan forstå funksjon gjennom å se på andre
 - Sammenlikne aminosyresekvensen de tror et protein har med genene til en organisme som produserer samme aminosyre
- **Genbank**, NCBI (sekvensdatabase, national centre for biotechnology information)
 - Dobler sin datamengde hver 18 måned
 - Onlinesøk av en spesifikk DNA eller proteinsekvens.
- Finnes også en proteinbank med 3D-struktur av alle kjente proteiner
- **Proteomics**: Systematiske studier av alle proteiner som lages på grunnlag av et genom. Det er tross alt disse som utøver mesteparten av funksjonen i en celle. Proteom = Alle proteiner som lages av en celle
- **Metabolomics**: Studien av kjemiske stoffer fra metabolismen (ikke polymerer)

En systembiologisk studie setter sammen geno- proteo og metabolomics for å definere gen-nettverk og nettverk av proteiner som vekselvirker med hverandre. Dataprogrammer har predikert 4700 proteinprodukter som deltok i 4000 interaksjoner i *Drosophila*.

Genannotasjon har som mål identifisere alle proteinkodende gener i en sekvens og deres funksjon. Dette kan man ikke gjøre ut ifra å bare se på sekvensen

- Var mye vanskeligere før, har nå blitt automatisert
- Maskiner ser etter start-stoppkodon, steder for RNA-splicing og andre trekk ved proteinkodende gener
- Ser også etter korte sekvenser som spesifiserer kjente RNA-molekyler
 - **Expressed sequence tags (ESTs)**: har blitt samlet fra cDNA-sekvenser og lagret i databaser. Det er gjerne «deler» av et cDNA som dermed matcher RNAet helt eller delvis

Proteomics og genomics har sammen med avansert datateknologi gitt forskere muligheten til å kartlegge interaksjoner mellom ulike gener og deres proteiner. Dette krever avansert datateknologi, men det har blitt produsert «klaser» av proteiner som alle interagerer sammen med hverandre. Dette fant de ved å knocke ut to-og-to gener og se om kolonien vokste eller sank i forhold til at de bare knocket ut ett-og-ett gen.

- ENCODE (encyclopedia of DNA elements): Lære alt om de delene av genomet som har en funksjon

Eksempler på systembiologiske studier innen medisin

- Cancer genome atlas-prosjektet undersøker 2000 gener i kreftceller med fokus på forandringer gjennom mutasjoner og rearrangering
- Genuttrykks-mønster hos en pasient kan skreddersy behandling
- DNA-sekvensering kan i fremtiden brukes til å avsløre folk i faresonen

Genomer varierer i størrelse, antall gener og gentedtetthet

Man har gjennom sekvensering fått muligheten til å gi noen pekepinner på hva som karakteriserer primitive og høyerestående organismer. Vi har sekvensert latterlig mange organismer (4300 i 2013, 9600 påbegynte) i alt fra bakterier, planter, sopp, dyr, fisk, insekter etc. Følgende lærte man av dette:

Genomstørrelse (aka lengden på hele greia)

- Bakterier og arkebakterier: 1-6 mB (millioner basepar), med unntak
 - Flere arkebakterier har ikke blitt sekvensert, dette kan endre seg
- Eukaryoter er generelt større
- Ingen sammenheng mellom eukaryotens genomstørrelse og dens fenotype
 - Større bredde på størrelse hos encellede eukaryoter, insekter, planter og amfibier, men ikke så stor hos pattedyr og reptiler

Antall gener

- Bakterier og arkebakterier har færre gener enn prokaryoter, (1500-7500 mot 5000-40000)
- Eukaryoter har ofte mye færre gener enn man skulle tro i forhold til genomstørrelse (=gentedtetthet)
 - ENCODE: Kjent antall proteiner gjorde at beregnet antall gener i mennesket var rundt 50 000/100 000, men fant færre enn 21! Dette er like mye som en nematode
 - RNA spleising skaper mer enn ett polypeptid
 - Ett menneskegen er ca ti eksoner, og 90% av disse genene kan spleises ulikt fra to til hundre ulike
 - Posttranslasjonelle mekanismer og miRNA

Gentedtetthet og ikke-kodende DNA

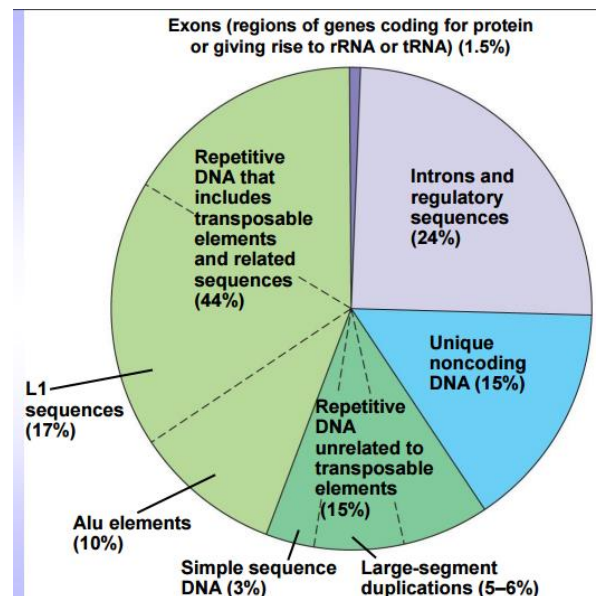
- Gentedtetthet tar for seg både lengde og antall gener
- Pattedyr og mennesker har lavest tetthet
- **Bakterier:** Ingen avbrudd av introner, bare gener for protein, tRNA, rRNA og regulatorer som promoter.
- **Eukaryoter:** 10 000 ganger mer ikke-kodende DNA, mye av dette er introner

Ulike typer ikke-kodende DNA-sekvenser

- **Ikke-kodende funksjonelt RNA:** tRNA, rRNA, piwi-interacting RNA og microRNA
- **Cis- og transregulatoriske elementer:** Promotere og enhancere.
 - Cis: Kan ligge i ikke-oversatte regioner eller i introner oppstrøms
 - Trans: Kontrollerer fra langt unna
- **Introner:** Fjernes fra mRNA. Mange er mobile elementer, og noen har vært uendret lenge
- **Pseudogener:** Mistet protein-kodende evne og uttrykkes derfor ikke
- **Repeterende sekvenser (SINE og LINE), transposoner og gammelt viralt DNA**
- **Telomerer**

20.4: Multicellulære eukaryoter har mye ikke-kodende DNA og mange multigenfamilier

- Bare 1.5% vet vi så langt koder for protein, tRNA eller rRNA. 98.5% koder for nada.
- Introner og regulerende sekvenser står for ca 25%
- Resten er mellom funksjonelle gener (intergenisk) og inkluderer **unikt ikke-kodende DNA** (enkeltkopier):
 - Genfragmenter
 - **Pseudogener** – tidligere gener med så mange mutasjoner at det ikke er funksjonelt
 - **Repetitivt DNA:** Sekvenser i flere kopier i DNAet. Ca 60% av genomet
- Mesteparten av eukaryotisk genomet består av sekvenser som ikke koder for proteiner eller transkriberes for å produsere RNA med andre funksjoner.
 - Mennesker, rotter og mus har 500 regioner ikke-kodende DNA som er **identiske** i sekvens hos alle, tyder på stor viktighet!
 - Vi har veldig dynamisk DNA som resultat av mye «junk-DNA»:



Transposable elementer og relaterte sekvenser

- DNA-lengder som kan bevege seg rundt i genomet i både pro- og eukaryoter
- Kattes aldri helt av, men proteiner «bøyer» DNAet slik at gammelt og nytt område kommer nær hverandre
- **Barbara McClintock** forsket på avling av mais og oppdaget endringer i farger på korn som kun kunne bety at genetiske elementer kunne bevege seg inn i genet for farge
- Stor skepsis, men det ble bekreftet senere. Nobelpris i 1983.

Bevegelsen av transposoner og retrotransposoner

- **Transposoner** bruker et DNA-mellommolekyl, enten gjennom «klipp-og-lim» som fjerner elementer fra opprinnelsesstedet eller «kopier-og-lim» som etterlater en kopi. Bruker enzymer **transposase**.
- **Retrotransposoner** bruker et RNA-mellommolekyl som **alltid** er et transkript av retrotransposon-DNA. Revers transkriptase kodes av retrotransposonet og vertscellens polymerase gjør det så om til DNA. Et nytt enzym katalyserer innsetting (naturlig rekombinering).
 - **Retrovirus** har enkelttrådet RNA som arvemateriale, disse kan ha utviklet seg fra retrotransposoner!

Sekvenser relatert til transposable elementer (TE)

- Flere kopier av transposable elementer og sekvenser relatert til dem er spredt rundt i eukaryotisk genom
 - Hundre til tusener av basepar
 - Kopier likner, men er ikke identiske
- Mange kan bevege seg, enzymene kodes av andre TE eller av TE som flytter seg
- Andre relaterte sekvenser har mistet evnen til å bevege seg
 - Utgjør til sammen 25-50%
 - Hos planter kan så mye som 85% være transposable elementer
- **Alu elementer:** Liknende DNA relatert til TE som står for 10% av genomet
 - Størsteparten og mest suksessfulle av TE, **primatspesifikke**
 - Retrotransposoner (aka blir RNA)
 - Ca 300 nukleotider langt (kortere enn de fleste funksjonelle TE)
 - Tror de brukes i genuttrykk (polymeraser blant annet)
 - Forbundet med kreft hvis de transponeres feil
- **L1, LINE-1:** Retrotransposoner som utgjør 17% av genomet
 - Mye lengre, ca 6500 basepar
 - Lav transponeringsrate, mange er inaktive
 - Mye mer aktive i unge hjerneceller, spekuleres i deres betydning for hjernecelledifferensiering

Andre repeterende DNA-sekvenser, inkludert «enkle DNA-sekvenser»

- Repeterende DNA som ikke er relatert til transposable elementer
- Ca 14% av humant genom
- Stammer trolig fra feil under DNA-replikasjon eller rekombinasjon
- En tredjedel av dette består av duplikasjoner av lange strekker med DNA fra 10 000 til 300 000 basepar.
 - Ser ut til å ha blitt kopiert fra ett kromosom til et annet, inneholder trolig funksjonelle gener
- «**Enkle DNA-sekvenser**» eller «**mikrosatellitter**» er mange kopier av en repeterende sekvens på 2-500 nukleotider
 - **STR** (short tandem repeat) er 2-5 nukleotider

- Som tidligere, repeterer i antall ulikt per homologe kromosom og ulikt mellom mennesker. Kan repetere flere hundre tusen ganger
- Ca 3% av humant genom
- Enkle DNA-sekvenser er ofte konsentrert i telomer og sentromer
 - Har trolig med søsterkromatidseparasjon å gjøre
 - Trolig viktig for struktur
 - Organisering av kromatin i kjernen i interfase
- Telomerer består av dette – hindrer nedgradering av DNA
 - Har seter som beskyttende proteiner kan binde seg til – hindrer kromosomødeleggelse og i å smelte sammen i andre kromosomer
- Alle disse over skaper usikkerhet i såkalt shotgun-sekvensering fordi alle regionene hindrer at datamaskinen kan sette sammen genomet ordentlig igjen

Gener og multigenfamilier

- Genrelatert DNA (både kodende og ikke-kodende) står for ca 25%
- «**Solitary genes**»: Ett kopi per haploid sett kromosomer
- **Multigenfamilier**: Samlinger av to eller flere identiske/veldig like gener
 - De med identiske DNA-sekvenser har som regel RNA som produkt (med unntak av histoner) og repeteres tandem tusenvis nedover.
 - Vanlig for rRNA (ribosomalt RNA) for å produsere så mange ribosomer som mulig.
 - Produktet kløyves av en lang rRNA til tre litt mindre, men fremdeles store rRNA.
 - Ikke-identiske DNA-sekvenser: **Globiner** har familier av gener på både kromosom 16 (alfaglobin) og 11 (betaglobin).
 - Begge er subenheter av polypeptider i hemoglobin
 - Ulike deler av familiene uttrykkes ulikt ved embryo og voksen for å sikre optimalt oksygenopptak

20.5: Duplikasjon, rearrangering og mutasjoner av DNA bidrar til evolusjon av genomet

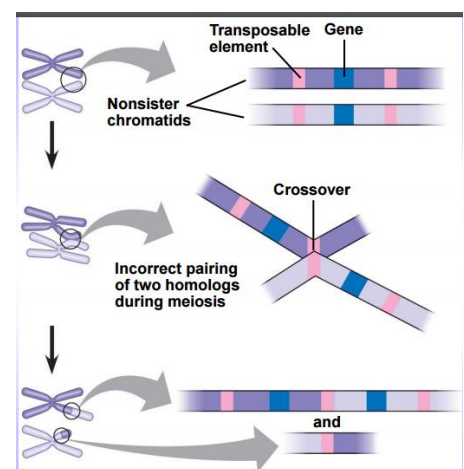
- Tidlige former for liv hadde et minimalt antall gener – kun de som var nødvendige
- Gen-diversifisering er et resultat av økning i genom-størrelse og innføringen av nytt genetisk materiale. Dette har skjedd av feil under meiosen.
- Feil under meiosen fører til **polyploidi** – multiplisering av kromosomer
 - Ofte dødelig, men akkumulering av mutasjoner kan bli permanente hvis organismen overlever og reproduserer seg
 - Så lenge ett av genene fungerer kan det andre ofte akkumulere mutasjoner
 - Sjelden hos dyr, vanlig hos planter (80% av blomsterplanter viser dette)

Endring av kromosomstruktur

- Bedre genteknologi lar oss sammenlikne kromosomer og se hvor ting har endret seg
 - Sammensmelting av to kromosomer skilte oss fra sjimpansene ($n=24$). Sjimpanskromosom 12 og 13 fusjonerte ende til ende og skapte vårt kromosom 2. Vi har telomerliknende sekvenser rett ved sentromeren i dette kromosomet.
 - Store deler av vårt kromosom 16 finnes fordelt på 4 ulike musekromosomer
- Analyser av mennesket og 6 andre pattedyr fant inversjoner og duplikasjoner av store og små kromosomdeler
 - Akselererte for ca 100 millioner år siden, 35 millioner år før dinosaurene døde
- Rearrangeringer av kromosomene skaper dyr som bare kan parre seg med hverandre

Duplikasjon og divergens i regioner av DNA på gen-størrelse

- Feil i meiose kan skape mindre områder, ikke bare større
- Ujevn overkrysning kan skape en delesjon og en insersjon (duplikasjon)
- Transposable elementer kan skape homologe områder for overkrysning og kan «ta med seg» et gen, selv om kromatid-regionene ikke er korrekt inntil hverandre
- Kan skje ofte i regioner med mange «repeats»
- STR er trolig resultat av slik mutasjon



Evolusjon av gener med liknende funksjon: Globiner

- Likheter og forskjeller kan gi hint om hvilke gener som er «minst» i slekt i en slik familie
- Ett felles globingen divergerte i alfa- og betaglobin for ca 450-500 millioner år siden
 - Begge dupliserte og divergerte videre til det vi har i dag (pluss transposerte til ulike kromosomer!)
 - Har også skapt **myoglobin** (muskelprotein som binder oksygen) og **leghemoglobin** (planteprotein som også binder oksygen)
 - Flere av genene er ikke aktive i dag
- Mutasjoner skapte videre divergens – ett alfaglobingen gjorde trolig nytten mens det andre muterte

Evolusjon av gener med ulike funksjoner: Mutasjoner kan akkumuleres i så stor grad at «opprinnelig» funksjon endres

- **Eksempel:** Lysozym (dreper bakterievegger) og alfalactalbumin (melkeproduksjon i pattedyr) Lysozym finnes i både fugler og pattedyr, men ikke alfalactalbumin: Divergens etter pattedyr
- Genet har blitt duplisert og forandret til en helt annen funksjon
- Klare likheter mellom peptidsekvensen til disse enzymene

Rearrangering av deler av gener: Duplikasjon av eksoner og omrokking

- Eksoner innad i et gen står for ulike domener av et protein: disse kan også dupliseres i ett homologt kromosom og slettes i det andre
 - EGF-genet har flere EGF-eksoner inni for hurtig produksjon
 - Trolig resultat av en duplikasjon
- TPA – plasminogenaktivator (et gen) har eksoner som finnes i andre gener. Har trolig oppstått av en **eksonstokking (shuffling)** og en duplikasjon (TPA er F-EGF-K-K)

Transposable elementer og evolusjon av genomet

- Transposable elementer har trolig bidratt i svært stor grad evolusjonsmessig, dette er også grunnet til at de er en så stor del av genomet
- Øker rekombinasjon, kan splitte gener og kontrollelementer, eller bære gener og eksoner til nye områder
- **Rekombinasjon:** Transposable elementer med lik sekvens promoterer rekombinasjon andre steder enn normalt ved å skape homologe overganger
- **Splitte:** Kan hoppe midt inn i en proteinkodende sekvens eller kontrollelement. Dette kan både ødelegge eller senke/øke uttrykket.
- **Bæring:** Gener eller grupper av gener kan flyttes. Dette kan gi dem en ny enhancer = mer uttrykk. Det kan også skape divergens hvis genet ble kopiert. Proteiner kan få et nytt domene gjennom at en ekson flyttes over.
- Kromosommutasjon: Delesjon, duplisering, inversjon, translokasjon
- Punktmutasjon: Substitusjon (silent, missense, nonsense), insersjon, delesjon

20.6: Sammenlikning av genomsekvens gir hint om evolusjon og utvikling

Sammenlikning av genomer

- Lik sekvens betyr mellom to arter betyr at de er nært relatert i evolusjonær historie
- Sammenlikning av to liknende arter vitner om nyere evolusjonære hendelser, mens fjerne arter vitner om grunnleggende likheter.
- Identifiserer hvilke gener som essensielle og karakteristiske for feks pattedyr

Fjerne: Noen gener har holdt seg like gjennom mange millioner av år. Dette har hjulpet oss med å finne grunnleggende forskjeller på de tre domenene bakterier, arkebakterier og eukaryoter.

Nære

- Likheter i genom har gjort gensekvensering av liknende arter lettere
- Gir hint om hva som skaper en art. Hvilke gener er det som gjør oss forskjellige? Eukaryoter har fremdeles helt grunnleggende like gener
- Gjør det lettere å knytte forandringer til bestemte sett med gener
- Mennesker og sjimpanser er i punktmutasjoner bare 1.2% ulike, men 2.7% er forskjellig i form av insersjoner, duplikasjoner eller delesjon av større områder i genomet slik som repeterende DNA-sekvenser.

- Flere alu-områder i mennesket, men flere retrovirale provirus i sjimpanse
- Mennesket er mer i slekt med sjimpanse og bonobo enn sjimpanse er med bonobo og omvendt.
- Noen gener endrer (evolusjon) seg raskere i mennesker enn hos mus og sjimpanser
 - Beskyttelse mot malaria og tuberkulose
 - Gen for hjernestørrelse
 - Gener for transkripsjonsfaktorer
- **FOXP2**: Gen for transkripsjonsfaktor som er involvert i tale og snakking
 - Mutasjoner gir problemer med uttale generelt
 - Knockout-eksperimenter fucker opp mus, liten hjerne og ingen uttale
 - Uttrykkes i mange sangfugler mens de lærer seg å synge
 - Satte inn menneskelig FOXP2 i mus (to aminosyrer forskjell) og musene lagde andre lyder og hadde andre signalspor i hjernen
- Sekvensering av neandertalergenomet viser identisk FOXP2 med mennesket, peker mot at de kunne snakke og ikke bare grynte

Sammenlikning av gener innad i en art

- Lite variasjon innad i vår art, mesteparten er SNP, variasjoner av disse finnes i minst 1% av mennesket
- Også funnet deler av kromosomet med inversjoner, duplikasjoner og delesjoner
- **CNV (Copy-number-variants)**: Løst der noen har flere kopier av et gen eller en region i stedet for de vanlige to (per homolog)
 - Resultat av inkonsistent delesjon eller duplikasjon av deler av kromosomet i populasjonen
 - Lengre strekker av DNA enn SNP, kan dermed ha mer å si enn vi tror
 - Antatt at rundt 13% av genomet har disse
- CNV, SNP og STR brukes alle til å bestemme forskjeller mellom genomer og kan peke på likheter og forskjeller mellom dem.
 - Forskning sammenliknet 4 afrikanske genomer og fant større forskjeller mellom disse enn mellom en europeer og en asiater.

Konservering av utviklingsrelaterte gener i ulike dyr

- **Evo-devo**: Sammenligner utviklingsprosessene hos ulike dyr (evolutionary developmental biology)
- Ny kunnskap viser at relaterte dyr med helt forskjellige fenotyper bare har små endringer i gensekvens eller genregulering.
- I homeotiske gener (mønsterdannelse) er det funnet **Homeoboxer**: 180 nukleotid lang sekvens som koder for et 60 aminosyrer langt **homeodomene** i proteinproduktet.
 - Proteinproduktet er en transkripsjonsfaktor, homeodomene binder DNA
 - Liknende homeoboxer er funnet i mange vertebrater og invertebrater
 - Også funnet i mer fjernt relaterte eukaryoter som gjær og planter

- Homeotiske gener kalles **Hox-gener** fordi de før bare fant homeoboxer i disse
 - Senere funnet andre gener med homeoboxer som ikke direkte kontrollerer identiteten til kroppsdeler - har allikevel med utvikling å gjøre
- I embryoer er ulike kombinasjoner av homeobox-gener aktive i ulike deler av embryoet – slik selektivt uttrykk er viktig for utvikling
- Andre gener har også blitt godt bevart, slik som komponenter av ulike signalspor og andre gener involvert i utvikling.
- Mye forskning på hvordan de samme genene kan være aktive i så ulike dyr
 - Små endringer i regulatoriske sekvenser til ulike gener kan gi for eksempel flere eller færre ben hos insekters ulike ledd.
 - Like hox-gener kan påvirke ulike mekanismer og prosesser hos ulike organismer

Kapittel 26: Introduksjon til virus

På sent 1800-tall filtrerte Martinus Beijerinck saft fra en syk plante gjennom et anti-bakteriefilter og gnidde saften over en syk plante. Planten ble allikevel syk! Han oppdaget også at hva enn som forårsaket sykdommen kunne ikke bli kultivert i en petriskål eller liknende. Selve begrepet virus ble ikke satt før i 1935, da Wendell Stanley fikk krystallisert et virus.

Struktur

- Minste 20 nm: Mindre enn ribosomer
- Selv det største viruset er nesten ikke synlig i lysmikroskop
- Kan krystalliseres, dette kan ikke vanlige celler
- Består av nukleinsyre med et dekke av proteiner og noen ganger en slags membran.

Genomet

- Mye forskjellig, kan ha dobbelt- og enkeltråd DNA eller dobbelt- og enkeltråd RNA!
- Kalles DNA eller RNA-virus alt ettersom.
- DNA som regel organisert som et enkelt lineært eller sirkulært molekyl
 - Noen kan ha flere av disse
 - Minste har 3 gener, de største har flere hundre av dem

Kapsider og «envelopes (membraner)»

- **Kapsid:** Proteinskall rundt bakterien
 - Stavformet, polyhedrisk eller mer kompleks i formen
 - Laget av **kapsomerer**, subenheter av protein. Ikke særlig mange ulike proteiner.
- **«Envelope»:** Ekstra membran tatt fra vertscellen
 - Inneholder proteiner og fosfolipider, også de fra viruset (virale)
 - Noen virus har et par virale enzymer i kapsidet også
- **Bakteriofager:** Komplekse virus som infiserer bakterier.
 - Består av et hode med DNA og en haledel av protein med fibre den bruker til å feste seg i bakterien med.

Virus replikerer seg kun i vertscellen

- Virus mangler metabolske enzymer og organeller til å gjennomføre replikasjon
- Uten vertsceller er de pakker av DNA i protein med litt enzym.
- **Vertsomfang:** Hvilke verter som viruset er i stand til å infisere
 - Resultat av evolusjon, «nøkkel-nøkkelhull» med overflatemolekyler de gjenkjenner
 - Noen virus har svært bredt omfang (flere arter), men meslinger, for eksempel, går bare på mennesker.
- Virus angriper gjerne spesifikt vev/celler i en art. Influensa: halsen

Generell viral replikasjonsyklus

1. Begynner når et virus binder seg til vertscellen og får injisert arvestoff
 2. Vertsenzymer replikerer viralt genmateriale
 3. Vertsenzymer transkriberer viralt genmateriale til mRNA og bruker egne ribosomer til å lage kapsidproteiner
 4. Viralt genom og kapsidproteiner samler seg til nye virus og går ut av cellen
- Hvordan DNA kommer inn i vertscellen varierer
 - Direkte innsprøytning som hos fagene
 - Endocytose
 - Fusjon av viral membran med cellemembranen (for de som har det)
 - Proteinene i viruset tvinger cellen til å replikere og transkribere viralt DNA
 - Verten bruker egne nukleotider til å lage viralt DNA/RNA, samt enzymer, ribosomer, tRNA, ATP og alt som skal til for å lage proteiner viruset trenger
 - DNA-virus bruker vertens DNA-polymeraser
 - RNA-virus bruker egne RNA-polymeraser som kan bruke RNA som templattråd
 - Når ferdig: Setter seg sammen av seg selv
 - Forskning: Holder å blande de forskjellige delene i riktige miljøforhold
 - Ødelegger eller skader celler når de sprekker ut av den – skaper sykdom

Bakteriofager kjennes til best, det viser seg at DNA-dobbeltrådvirus kan replikere 2 måter:

Lytisk syklus

- Kulminerer i død av vertscelle (lyserer = lytisk)
- Virus sprer seg ut av den sprukne cellen – mangedobling per gang
- **Virulent fage:** Replikerer seg kun med lytisk syklus
 1. T4-fage fester seg med fibrene til overflateproteiner på bakterien
 2. Halen snurper seg sammen og sprøyter DNA inn i bakterien
 3. Fage-genom replikeres og transkriberes til de forskjellige delene
 4. Fage-genom pakkes inni kapsiden og delen setter seg sammen
 5. Fage-genom produserer et enzym som bryter ned celleveggen så den tar inn vann og sprekker – 100-200 virus sprenger ut av den

- Flere grunner til at bakterier overlever og ikke har blitt utryddet:
 - Evolusjon favoriserer bakterier med andre overflateresptorer
 - DNA fra virus identifiseres og kuttet opp av restriksjonsenzymmer. Bakteriens eget DNA motstår disse enzymene på grunn av måten det er metylert.
- Samtidig: Evolusjon favoriseres også virus, så kappløpet er evigvarende.

Lysogen syklus

- Annen årsak til at bakterier ikke utryddes
- Replikasjon av fage-DNA uten at verten ødelegges
- **Temperate fager:** Kan gjennomføre både lytisk og lysogen syklus
- **Lambda** er en temperat fage som det forskes mye på
 - Injisierer lineært DNA
 - Lambda-DNA former en sirkel. Den kan nå gå inn i lytisk eller lysogen syklus
 - Lysogen: Lambda-DNA inkorporeres inn i et spesifikt område på verts-DNA ved hjelp av virale enzymer
 - Viralt DNA heter nå **profage**
- **Profage** har et gen som hindrer transkripsjon av de andre profage-genene = kan ligge på lur mens bakterien kopierer seg igjen og igjen
- Ved stimuli kan derimot fage-DNAet initiere lytisk syklus!

Noen andre fage-gener kan uttrykkes når det ligger som en profage. Dette endrer vertens fenotype, noe som ofte er årsaken til at visse typer bakterier er farlige for oss. Dette er fordi den endrede fenotypen produserer stoffer som er giftige for kroppen. E.coli vs O157:H7 feks

Replikasjonssykluser i dyrevirus

- Hvordan arvematerialet forekommer er måten man inndeler virus på (enkelt, og dobbeltbåndet RNA eller DNA).
- Virus som bruker RNA-enkeltråd deles igjen inn etter hvordan dette RNAet brukes i cellen
- Membran er vanlig i dyrevirus, de fleste med RNA har det, noen med DNA har også

Virale membraner

- Brukes til å komme inn i vertscellen. Utstyrt med «utstikkere» av glykoproteiner som binder seg til reseptorer
- Eksempel or et virus med membran og RNA som genom:
 1. Glykoproteiner i membranen binder seg til reseptorer på vertscellen, dette promoterer vertscellens «inntak» av viruset (endocytose?). Membranen forsvinner
 2. Cellulære enzymer bryter ned kapsidet og virusgenomet slipper ut
 3. Virusgenomet er templat for en komplementær RNA-tråd
 4. Komplementær RNA-tråd er templat for nye tråder **og** mRNA som transkribes til kapsidproteiner (i cytosol) og glykoproteiner (ER, golgi) til bruk i membranen.

5. Vesikler transporterer dette til cellemembranen
6. Kapsid former seg rundt hvert nye virale genom
7. Når virusene går ut av cellen «legger» glykoproteinene seg rundt den som en membran (som eksocytose)

- Ribosomer i ER lager proteinene mens enzymer i ER og golgi setter på sukkeret
- Virusets membran «kommer fra» cellemembranen, men molekylene er virusets
- Ikke nødvendigvis dødelig for cellen
- **Herpesvirus** har midlertidig membran tatt fra kjernemembranen som de kaster i cytoplasma til fordel for ER/golgimembran.
 - Formerer seg i kjernen – har DNA dobbeltråd
 - Bruker både virale og cellulære enzymer til å kopiere arvemateriale
 - Kopier av herpesvirus-DNA kan ligge latent som «kromosomer» i nervecelle-kjerner og kan trigges senere. Du mister aldri herpes.

RNA som genetisk viralt materiale

- De fleste RNA-virus er dyrevirus
- Tre typer enkeltrådet RNA-virus funnet i dyr:
 - IV: RNA er mRNA og kan oversettes til proteiner med en gang
 - V: RNA er templat for en komplementær RNA som brukes til syntese av ny RNA og mRNA. RNA → RNA trenger et eget enzym som viruset har
 - VI (retrovirus): Mest komplisert. Bruker enzymet **revers transkriptase** til å syntetisere RNA → DNA. Består av to identiske tråder RNA og to molekyler revers transkriptase.

Typisk retrovirus-syklus:

1. Virusmembranglykoproteiner identifiserer cellemembranen og de to fusjonerer
 2. Kapsidproteinene ødelegges og de virale proteinene og RNA slippes løs
 3. Revers transkriptase lager en RNA-DNA hybrid med en RNA-tråd og en komplementær DNA-tråd.
 4. Revers transkriptase lager en komplementær DNA-tråd til den første DNA-tråden
 5. DNA-doppeltråd inkorporeres i celle-DNA som et **provirus**
 6. Provirus-DNAet transkriberes til virus-RNA som brukes i nye virus og som mRNA til virale proteiner
 7. Kapsidproteiner og revers transkriptase syntetiseres av mRNA i cytosol og glykoproteiner til membranen lages i ER/golgi og går til cellemembranen
 8. Kapsider settes sammen rundt det virale RNAet og revers transkriptase
 9. Nye virus spruter ut
- Provirus blir en permanent del av cellen
 - HIV er typisk slik virus

Evolusjon av virus

Virus er skrevet på samme evolusjonære kode som vi er, men er ikke i stand til å eksistere uten en vertscelle. Er de bare en veldig komplisert form for molekyler, eller den enkleste formen for liv? Virus er funnet i alle former for liv, men på grunn av deres formeringsmåte er det grunn til å tro at de utviklet seg etter cellen oppstod. Teorien er at nakne nukleinsyrer gikk inn i skadede og fikk litt av membranen med seg.

Plasmider og transposoner er kandidater til å være de originale virus-DNAene. Plasmider kan eksistere og replikere seg uavhengig av en bakteries kromosom og kan overføres mellom dem. Transposoner er DNA-segmenter som kan bevege seg til ulike deler av en celledens genom. Fellestrekket for plasmider og transposoner er at de er **bevegelige**.

Mange virus har DNA som minner svært mye om vertscellens DNA og er annerledes fra virus som har andre vertsceller, samtidig som det har blitt funnet likheter mellom virus med helt andre verter (dyre- og plantevirus for eksempel).

Mimivirus er DNA-dobbeltrådvirus på størrelse med en liten bakterie og genom 100 ganger større enn influensa. Genomet inneholder også DNA-sekvenser tidligere bare funnet i celler. Disse koder for proteiner i translasjon, DNA-reparasjon, proteinbretting og syntese av polysakkarider. Det har også blitt oppdaget enorme virus som pandoravirus og pithovirus med gener som ikke likner på cellulære gener i det hele tatt.

Virus, viroider og prioner fører alle til store problemer for organismer som blir utsatt for dem

- Ødelagte celler eller celler som produserer giftstoffer
- Kommer an på cellen: Kan vevet reparere seg selv raskt går det fint. Poliovirus angriper nervene, og disse cellene deler seg ikke
- Mange virussyntomer er kroppen som beskytter seg, ikke at viruset angriper deg
- **Vaksiner** er harmløse varianter av et virus og stimulerer immunforsvaret til å bygge opp et forsvar. Kopper ble utryddet av vaksinasjon fordi det bare infiserer mennesker.
- En virusinfeksjon er vanskelig å knekke med dagens teknologi når den først har skjedd
 - Virale legemidler virker på viral nukleinsyresyntese ved å inhibere polymerasene som brukes til å syntetisere viralt DNA/RNA
 - Mot HIV: Hindrer revers transkriptase. I dag er «cocktails» av legemidler beste løsning

Oppstående virus er virus som plutselig oppstår av ingen steder, slik som HIV i San Fransisco på 80-tallet og H1N1 (svineinfluensa) og fugleinfluensa.

- RNA-virus muterer ekstremt fort fordi virale RNA-polymeraser ikke «ser over» det de replikerer. Dette er grunnen til at man blir forkjølet igjen og igjen.
- Globalisering blander mennesker som vanligvis hold viruset isolert til en del av verden
- Spredning fra dyr. Dyr kan være friske, men bære på farlige virus

H1N1, svineinfluensa

- Tre typer, A, B og C.
- B og C infiserer mennesker og har aldri skapt en epidemi
- A infiserer både mennesker og dyr
 - A-typerne gis navn etter hvilke virale overflateproteiner som er til stede
 - Hemagglutinin (H), 16 ulike typer
 - Neuraminidase (N), 9 ulike typer
- Vannfugler har alle kombinasjonene av N og H.
- Forskjellige typer kan gjennomgå genetisk rekombinasjon når en celle har flere enn en type virus i seg
- H1N1 hadde DNA fra både fugler, griser og menneskevirus
- Folk blir syke fordi de ikke er motstandsdyktige/har aldri sett noe slikt før
- H5N1 er potensielt veldig farlig hvis det utvikler seg til å kunne spres lett

Virale sykdommer hos planter

- 2000 typer er kjent, utgjør tap på 15 milliarder dollar på verdensbasis hvert år
- Brune, bleke flekker på planten, misdannelser og dårlig vekst
- Samme struktur og formering som dyrevirus – mange har RNA og er heliske eller polygone.
- Planter er mer utsatt for virus når de er skadet på grunn av celleveggen
- Dyr og insekter er potensielle bærere, og dermed spredere
- Kan også overføres fra foreldreplanten av aseksuell eller seksuell reproduksjon (infiserte frø)
- Sprer seg i planten via plasmodesmata (de kanalene mellom celleveggene)
 - Virale proteiner øker størrelsen på plasmodesmata
- Forskning basert på å hindre spredning, ikke å kurere plantevirus

Viroider og prioner

- Viroider: Sirkulære RNA-molekyler som infiserer planter
 - Koder ikke for proteiner men replikeres av vertscelleenzymer
 - Fucker opp plantes kontrollsystemer
 - Ett eneste molekyl som fører til sykdom! Ganske sykt.
- Prioner: Proteiner som kan spre seg
 - Hjernesykdom. Hvis du spiser biff med prioner eller kannibalisme kan det spre seg
 - Kan ligge og lure over lang tid og LAR SEG IKKE ØDELEGGE. Ingen kur!
 - Misdannet protein kommer i kontakt med andre proteiner og fører til at de også blir misdannet – hoper seg opp
 - Mulig link til Alzheimers og Parkinsons.