**Moleculaire Biologie**

Open vragen

* **Lac operon: rol van cAMP zodat liever glucose gebruikt wordt (schema is gegeven)**

Wanneer zowel lactose als glucose aanwezig is in de cel, gaat de cel eerder gebruiken maken van glucose dan van lactose om energie te genereren. Dit komt omdat RNA polymerase maar zwak bindt op de promoter van het operon (operator + promoter + structuurgenen Z,Y,A)

Er zijn andere eiwitten nodig voor versterking => CAP = catabolite activator protein, wordt allosterisch geactiveerd door cAMP

Wanneer glucoseconcentratie laag is, zal cAMP geproduceerd worden als hongersignaal

Wanneer glucoseconcentratie hoog is, zal cAMP laag zijn

Glucose aanwezig, geen lactose → cAMP is laag → CAP is inactief en repressor → lac operon is inactief → geen expressie van Z,Y,A

Glucose en lactose aanwezig → CAP inactief, maar geen repressor op operator DNA → laag transcriptie niveau van Z,Y,A

Glucose afwezig, lactose aanwezig → cAMP hoog → CAP actief een geen repressor → actief RNP → expressie van Z,Y,A

Glucose en lactose afwezig → cAMP synthese → CAP actief maar repressor dus geen expressie van Z,Y,A

Expressie van Z,Y,A → synthese van β-galactosidase waardoor lactose wordt afgebroken tot glucose en galactose

* **HAT's en HDAC's:**

Chemische modificatie van histonen: acetylatie lys residu’s

Catalyse acetylatie door histon acetyltransferasen (HATs)

Catalyse deacetylatie door histondeacetylasen (HDACs)
**- Hfr stam**

High frequency recombination stam

Wanneer een Ffactor zich door recombinatie intergeert in het bacterieel chromosoom, ontstaat een Hfr cel. De cel zal tijdens conjugatie een keten van het hele chromosoom overdragen ipv alleen de Ffactor.

**- Leu-rits eiwit
- KDEL receptor**

Enzymen van ER lumen: retentie en retrieval door binding van hun COO-terminale aminozuren op KDEL receptor (→ Lys – Asp – Glu – Leu) op ER membraan  **-Telomerase**

Gespecialiseerde reverse transcriptase dat eigen RNA component als template gebruikt  **- Homeodomein
- Definieer RFLP** → restriction fragment length polymorfism **-DNase hypergevoeligheid**

DNAse hypersensitieve regio’s → thv klein gebied 5’ van het actieve gen => als gevolg van ontrollen van DNA tot euchromatine => toegangelijker voor transcriptiefactoren maar ook voor DNAse

**-Helicasen en SSBP**

Helicasen openen de dubbele helix van een DNA streng, waardoor 2 replicatievorken en een replicatiecomplex ontstaan. Dus essentieel voor de initiatie van de replicatie in eukaryoot genoom.

SSBP stabiliseert esDNA (= enkelstrengig DNA) → voorkomt het opnieuw opwinden van ontwonden DNA, beschermt esDNA tegen nuclease afbraak

**-COP en SNAREs**

Uitstoten en versmelten van vesikels mbv fissie en fusie eiwitten

→ fissie eiwitten: clatherine en COP (coat protein) → hoog MW eiwitcomplexen, rond vesikel

→ fusie eiwitten: t- en v-SNARE zorgen voor versmelting met lipidenmembraan van transportvesikel met doelwitmembraan met specifieke receptoren

SNARE complex bestaat uit syntaxin, synaptobrevin (v-SNARE eiwit) en SNAP-25 (t-SNARE eiwitten)

* **Spliceosoom: leg de opbouw en werking uit, er was ook weer schema gegeven**
* **Waarom komt CG sequenties weinig voor, wat zijn CG-eilanden en wat is hun functie?**

Cytosines in CG worden omgezet naar 5-methylcytosines. 5MeC wordt gemakkelijker gedeamineerd dan C. MeC in MeCG zijn doelwitten voor puntmutaties daarom komen ze weinig voor.

CG sequenties zijn belangrijk voor de regulatie van de genexpressie, maar ook endogeen mutageen en carcinogeen, omdat MeC in MeCG een doelwit is voor puntmutaties.

* **Tekening van ribosoom, vraag: leg a, p en e domein uit, waarvoor dienen ze en beschrijf kort de elongatie van translatie**

Op ribosomen zijn er 2 bindingplaatsen voor tRNA

Aminoacyl-site = A-site → binding van nieuw aangevoerde aminoacyl-tRNAs

Peptidyl-site = P-site → binding van tRNAs met groeiende polypeptide keten

Laatst binnengekomen tRNA springt van A naar P-site

Elongatie van translatie → begint als 2de tRNA op lege aminoacyl-site bindt

Eerste peptide binding vindt plaats: methionine van peptidyl-tRNA met geactiveerde COO-groep naar vrije amino-groep van aminoacyl-tRNA, waardoor aminoacyl-tRNA peptidyl-tRNA wordt.

Bij translocatie verhuist tRNA van P- naar E-site.

Het peptidyl-tRNA verhuist van A- naar P- site

Ribosoom verschuift 3 basen naar 3’ richting van mRNA

Lege A-site ligt tegen over volgend codon.

Langs E-site verlaten lege tRNAs het ribosoom tijdens de translocatie stap

→ 2 stappen: eerst loskomen van grote subeenheid van ribosoom, daarna van kleine subeenheid => voorkomen dat onvolledige peptidyl-tRNA ribosoom verlaat

Polypeptide keten groeit door opeenvolgende aanhechting van aminozuren aan de carboxyterminus

* **Tekening RNA splicing: leg uit**
* **Tekening co-translationeel transport in ER: leg uit + bijvraagjes (hoe worden residente ER eiwitten in ER gehouden (KDEL)**
* **Schema v DNA replicatie (hetzelfde schema ook id slides, ook daar zonder labeling) beschrijven + uitleggen**

Regulatoreiwitten binden op ORI = origin of replication → 1 ORI in mtDNA en 1000n ORI in humaan DNA

DNA replicatie is semiconservatief en bidirectioneel

Helicasen openen de dubbele helix → 2 replicatievorken en replicatiecomplex

SSBP (single stranded binding protein) stabiliseren esDNA→ verhinderen opnieuw opwinden van ontwonden DNA, beschermen esDNA tegen afbraak door nuclease

Elongatie van 5’-3’ => 2 antiparallelle strengen → 1 continu (leading strand) + 1 discontinu (lagging strand)

Primase thv lagging strand → synthese van RNA primers die zorgen voor synthese van Okazakifragmenten. Okazakifragmenten worden aan elkaar gekleefd door DNA ligase.

Mechanisme van DNA polymerase:

Nucleofiele aanval van 3’OH terminus op α-fosfaat groep van vrij nucleotide → er ontstaat een fosfodiësterbinding en pyrofosfaat wordt afgesplitst → pyrofosfaat wordt gehydrolyseerd, waarbij energie vrijkomt waardoor de polymerisatiereactie spontaan verloopt.

DNA polymerase bevat ook 3’ – 5’ exonuclease activiteit → proof reading

* **Schema met histon modificaties (Hat/Hdac, methylatie, fosforylatie) alle uitleggen + wat blijft over?**

HAT = histon acetyltransferase, HDAC = histon deactylasen

* **hoeveel basen in een mRNA, en elongatie uitleggen.**

1-5 % van totaal RNA is mRNA, 80-85% van totaal RNA is rRNA, 15-20% van totaal RNA is tRNA;

* **Translocatie eiwitten naar ER**

Signal Recognizing Particle (SRP) bindt hydrofoob. N-terminaal Signaal Peptide (SP) zodra het uit ribosoom komt.

SRP = 7SL-RNA met aantal eiwittten.

7SL-RNA maakt contact met mRNA → 1 SRP eiwit bindt met SP → 2 samen binden met 7SL-RNA op A-site van ribosoom

=> eiwitsynthese wordt geremd tot ribosoom bindt op membraan ER

Complex (mRNA + ribosoom + tRNA + peptide + SRP-SP) bindt op SRPreceptor op ER

Ribosoom bindt op ribosoomreceptor (translocon): translocatie kanaal door ER membraan waar eiwit verder groeit wanneer SRP loslaat

Voor translocatie is er energie nodig → hydrolyse van GRP

Zodra polypeptide langer wordt en in ER lumen komt → klieving signaalpeptide door peptidase

Eiwit komt vrij in ER lumen en ribosoom komt vrij en translocatie kanaal sluit

*Indien eiwitten naar het ER-lumen moeten getransporteerd worden gaan deze eiwitten een specifieke singaalsequentie bevatten. Deze singaalsequentie zorgt ervoor dat eiwitten herkent worden door SRP (=signal reconizing particle) . SRP bindt ook met het mRNA ter hoogte van de A-site van de ribosomen, hierdoor heeft het een remmende werking op de eiwitsynthese. Het SRP zorgt voor het transport van het volledige ribosoom + mRNA + t RNA + polypeptide + singaalpeptide naar het endoplasmatisch reticulum waar het bindt op de SRP- receptor. Het ribosoom bindt ook op een specifieke ribosoom receptor (= translocon.) Door binding van het ribosoom op het ER valt de SRP weg, waardoor de translatie opnieuw door kan gaan. Vanaf het moment dat de polypeptideketen gegroeid is tot in het ER- lumen wordt ook de singaalpeptide weg geklievd door een peptidase.*

* **Helix-loop-helix eiwitten**

Belangrijk ruimtelijk motief voor DNA binding = helix-turn-helix

Deze transcriptiefactoren vormen dimeren en binden op DNA mbv 2 parallelle α helixen die 1 dsDNA winding van elkaar verwijderd zijn

=> transcriptiefactor past in 2 opeenvolgende brede groeven op doelwitsequentie

=> specifieke, niet-covalente interacties tussen basenparen en aminozuren

Helix-turn-helix motief → DNA bindende α helix (herkenningshelix), β bocht, structurele α helix

Helix-turn-helix eiwitten = tryptofaan repressor, lamba cro, CAP

* **Manieren om gensegmenten te zien (southorn,…-**

MKV moleculaire

* Waar vindt de Wobble plaats
	+ Derde letter van codon, voornamelijk eerste 2 letters bepalen het AZ, mutatie op wobble positie leidt meestal tot silent mutatie (geen effect)
* Primase enzym: wat voor activiteit
	+ **DNA afhankelijke RNA polymerase**
	+ Exonuclease
	+ RNA afhankelijke RNA polymerase
	+ DNA afhankelijke DNA polymerase
* Xeroderma pigmentosum
	+ Mutaties in verschillende genen die coderen voor eiwitten ivm herstel DNA-schade
	+ Geen herstel van pyrimidine-dimeren door ontbreken excisie-herstel
* Wat bepaalt de specificiteit van PCR
	+ temperatuur, Mg, Taq ofzo, 5' en 3' primer...
* Functie van RNA polymerase III:
	+ **Transcriptie tRNA**
	+ RNA polymerase I → transcriptie rRNA
	+ RNA polymerase II → transcriptie mRNA
* vraag met eIF2, welke mechanisme
	+ Methionine tRNA bindt thv ribosoom
* co-translationele translatie
	+ Lysosomale enzymen, secretie en integrale eiwitten ER- en plasmamembraan
* Welke methoden voor genexpressie te bestuderen -> expirimentele mutagenese? Complementatie analyse?
* Wat is laatste stap in vorming basaal transcriptie-complex?
	+ Binding van TFIIH vervolledigt het assemblage van basaal transcriptie-initiatiecomplex
	+ TFIIH = multimeer met helicase en proteïne kinase activiteit
	+ Fosforyleert RNA polymerase II thv carboxyterminus op verschillende plaatsen
	+ Basale TF dissociëren van TBP-promoter complex en transcriptie start door RNPII
* template-streng
	+ gelezen in 3' -> 5' richting
* op welke sequentie bindt restrictie-enzym meest waarschijnlijk
	+ ik dacht de pallindroom-sequentie die er tussen stond
* HINDIII
* dan veel type II over: 5' cap, glycosydasen, transacting factor, co-translationele translocatie....