**H1: CELBIOLOGIE - OVERZICHT**

1. Historiek

Doelen celbio

* basismechanismen van het leven & het organisme begrijpen
* oorzaak van ziektes begrijpen
* nieuwe therapieën ontwikkelen
* nieuwe toepassingen in biotechnologie

Historisch

* Hooke 1665 → “cellulae” = cellose holtes (geen echte cellen)
* A. Van Leeuwenhoek → spermatozoyten, RBC, bacteriën
* R. Brown → celkern & browniaanse beweging (stochastisch, at random, afhankelijk van moleculair gewicht)
* Celtheorie → Schleiden - Schwann - Virchow → cel = elementaire bouwsteen leven
  + alle organismen bestaan uit cellen → unicellulair of multicellulair
  + nieuwe cellen ontstaan uit andere cellen door celdeling
  + energie-omzetting binnen de cel (metabolisme)
  + cel bevat erfelijk materiaal dat wordt overgedragen
  + gelijke essentiële biochemische samenstelling
  + activiteit organisme afhankelijk van totale activiteit onafhankelijke cellen
* Celbio = cytologie + moleculaire biologie + biochemie + genetica

Ontstaan & evolutie cel

* protocel met fosofolipidenmembraan & zelf-replicerend DNA → spontane assemblage
  + ondervinden osmotische stress → transfer van membraancomponenten van niet delende cellen → delende cellen overleven (darwiniaanse selectie)
  + genomic/membraan fitness → cellulaire fitness RNA replicatie + membraangroei
  + transmembranaire pH gradient door membraangroei → energie
* Prokartyoten
  + geen nucleus; 1μm; geen organelen; circulair DNA; soms pathogeen (treponema pallidum, vibrio cholerae); fotosynthese mogelijk
  + mycoplasma genitalium (kleinste) → 477 genen → parasitair
  + DNA inbrengen in andere lege cel → replicatie & kolonie vorming
* Eukaryoten
  + intracellulaire organellen door endosymbiose prokaryoten (mitochondrie = aerobe eubacterie; chloroplast = fotosynthetische eubacterie)
* Impact fotosynthese op atmosfeer

Cellen als experimentele modellen

* procaryoten → unicellulaire eukaryoten → saccharomyces cervisiae (gistcel)
  + seksuele voorplanting + indeling genoom per functie = evolutionair voordeel → meer genetische variatie
* unicellulaire eukaryoten → multicellulaire eukaryoten (diermodellen)
  + mens: 25.000 genen met 3 miljard basenparen → gelijkenissen mens muis
  + geïsoleerde cellen zijn anders dan cellen in organisme → in vivo + in vitro
* evolutie theorie Darwin → natuurlijke selectie → genetische variatie
  + selectiedruk → universele eigenschappen cellen vroeg in evolutie onststaan

Universele celeigenschappen

* Cel = replicatieve entiteit  → consumptie van vrije energie
* Multicellulaire organismen afgeleid van 1 cel (celdeling)
* Genetische informatie in zelfde chemische code (DNA)
* DNA replicatie = kopiëren van genetische informatie
* Genetische informatie wordt overgeschreven via RNA
* Eiwitten zijn katalysatoren
* Zelf-replicerend potentieel is gebaseerd op een autokatalytische feedbackloop
  + proteine katalyseren eigen replicatie + DNA aanmaak (en andersom)
* RNA wordt op dezelfde manier vertaald
* Cel = biochemische fabriek met soortgelijke moleculaire basisbestandelen
* ATP = energiebron voor metabolisme (glycolyse → fotosynthese → oxidatief)
* Celmembranen bevaten transporteiwitten voor nutriënten en afvalstofen
  + pH gradiënt → energie (vb door bacteriorhodopsin dankzij licht)

1. Methodologie
2. *Lichtmicroscopie*

Uitdaging = contrast maken & structuren onderscheiden → kleur & microscoop technieken

Voordelen

* niet destructief & versatiel
* combinatie met fluoricente probes/eiwitten → celbeweging, interacties & dynamiek
* real-time analyses + 3D analyse mogelijk (meestal 2D)

Nadelen

* beperkte resolutie door golflengte licht (400-800nm) → electronenmicroscopie
* Probleem = dikke weefsel →  dunne coupes via fixatie & inbedding (histologie)

Werking

* focus parallelle lichtbundel via condensorlens & Köhler illuminatie = maximaal contrast (**p42**)
* Resolutie → beperking door golflengte
  + licht is geen recht pad → interactie met object = verandering fase-relatis → interferentie  → optische diffractie
  + = scheidend vermogen → vermogen 2 objecten te kunnen onderscheiden → theoretische grens = 0,2μm (opletten voor bias!)
* Numerische apertuur = maat voor wijdte pupil microscoop t.o.v. afstand tot het object (hoek α) → hoe groter N.A. (α) hoe scherper beeld (minder diffractie)
  + NA = n.sinα (n = brekingsindex medium-
  + oil-immersion lens → geen weerkaatsing licht (door vb lucht) → grotere lichtkegel bereidt objectief → beter scheidend vermogen

Contrast bekomen

* kleuring → absorbtie ↔ doorlaten bepaalde golflengtes
* donker-veld microscopie (=normale lichtmicroscoop + donkerveldcondensor)→ zijdelingse illumintatie → enkel scatter lichtstralen in lens
* fase verschuiving → passage door specimen = fase-verandering → interferentie zichtbaar maken door fase-contrast of differentiële interferentie contrast (verschil in fase vertaald naar verschil in amplitude)

Types

* Doorvallend licht ↔ fase-contrast ↔ donker veld ↔ differentiële interferentie contrast
* Polarisatie = 2 polarisatiefilters (loodrecht) →  oprische actieve structuren veranderen polarisatierichting →  oplichting beeld (licht verandert na contact met specimen)
* Omgekeerde (geïnverteerde) microscoop = objectief onder preparaat

Fluorescentie-microscopie

* Principe = excitatie electron via licht → warmte afgifte (lagere energie-toestand) → emissie licht met andere golflengte
  + golflengte emissie > golflengte excitatie
* Epi-illuminatie = bovenvallend licht ↔ dia-illuminatie = doorvallend licht → **p55**
  + eerste barrière filter filtert licht tot monochromatisch licht
  + licht valt vanbovenaf op specimen → weerkaatsing → beam-splitting mirror laat enkel bepaalde golflengtes door
  + tweede barrière filter filtert ongewenste signalen weg → enkel licht tussen bepaalde golflengtes bereiken oog
* Merkers → fluorochromen
  + vb. fluoresceine, rhodamine, DAPI (voor DNA)
    - organische = instabiel & excitatie enkel bij specifiek golflengte
    - anorganisch = stabieler & breder spectrum
  + Fluorochromen + antilichamen → Ab + FITC (groen), Ab + Texas red (rood)
  + Quantum dots = nanopartikels van half-geleiders (anorganisch fluorochroom)
    - **p58** → eigenschappen
  + vb. RNA probes met verschillende chromoforen (=uitzender van licht na excitatie) → weefselspecifieke expressie aantonen
* Merkers → fluorescente eiwitten
  + vb. DsRed (rood), GFP (groen) = B-barrel met centraal chromofoor
  + cellulaire componenten visualiseren in levende cellen → in vivo door genetische manipulatie → transgene organisme
  + excitatie/emissie spectrum van chromoforen afhankelijk van moleculaire omgeving → mutanten maken die interactie chromofoor met licht beïnvloeden → wijziging in excitatie/emissie spectrum

Toepassingen fluorescentie-microscopie

* Interacties tussen molecules bestuderen → fluorescence resonance energy tranfer (FRET) imaging
  + eiwit 1 zet paars licht om in blauw ligt & eiwit 2 zet blauw ligt om in groen ligt → overlap emissie 1 en absorptie 2
  + wanneer bij mengels groen gedetecteerd wordt is er interactie (→**p73**)
* Laser fotoactievatie → temporale & spaciale controle
  + excitatie van inactieve fotosensitieve percursor (caged molecule) → actieve fluorochroom
  + doelgericht in cel bepaalde processen bestuderen (moleculen in actie visualiseren)
* Fluorescence recovery afther photobleaching (FRAP)
  + signaal verdwijnt eerst, maar komt terug door herstel van fluorescente regio
* AEQUORIN = luminescent eiwit na contact met Ca2+→ Ca2+ sensitieve indicator
* Substanties in cel brengen → glazen micropipet of optical tweezers; poriën maken & elektrische shock; endocytose vesikels; via goudpartikels

Immunocytochemie

* Directe immunofluorescentie = covalente conjugatie fluorochromen/quantum dots met antilichamen → 1 speciefiek gericht primair gemerkt antlilichaam
* Indirecte immunofluorescentie = covalente conjugatie vluorochromen/quantum dots met antilichamen → amplificatie signaal door herkenning specifiek antilichaam via meerdere secundaire gemerkte antilichaam
  + indirect via niet-fluorescente merkers maar via enzymatische signaal-amplificatie → HRP (horseradisch peroxidase) → diffusie product (beperking spatiale resolutie)
* Polyclonale antilichamen = antlichamen die speciefieke delen (epitopen) antigen herkennen → isolatie vanuit proefdieren (mengels van antilachamen, niet zuiver)
* Monoclonale antilichaam = antlichaam dat 1 epitoop herkent (zuiver, gen background)
  + injectie proefdier met antigen → aanmaak antlichamen in B-lymfocyten → fuseren met kankercel (onbeperkte deling) = hybrydoma (in mengels B-cel - hybrydoma - kankercel)
  + isolatie hybrydoma → B-cel sterft sws → kankercel verwijderen via specifiek groeimedium waarin kankercellen niet overleven & hybrydoma’s wel
  + ! binding aan epitoop kan beïnvloedt zijn door accessibiliteit epitoop
* Antilichamen
  + 2 Zware en 2 lichte ketens verbonden met sulfide-bruggen
  + Variabel deel (bind antigen) en constant deel

Fluorescentie-microscopen

* Computationele deconvolutie → scherp maken 3D beeld via computationele superpositie van optische secties van eenzelfde focaal vlak op verschillende dieptes
* Confocale laser scanning microscoop → **p65**
  + confocaal = selectieve belichting op bepaalde diepte
  + laser licht door pinhole → focusering op bepaald deel specimen via spiegel →   preparaat weerkaatst licht → pinhole → detector
  + enkel stralen door pinhole bereiken detector = punt niet in focus (ander focaal vlak) wordt uitgesloten → scherper beeld
  + informatie boven/onder vlak wordt geëlimineerd
  + 3D reconstructie mogelijk door herhaling op verschillende golflengtes
* Multi-foton laser confocal microscope
  + 2 foton excitatie = grotere golflengtes (lagere energie) die elkaar versterken → fluoriscerend (uitgezonden) licht beperkt tot bepaalde ruimte in specimen (waar beide golflengtes in specimen kwamen) → zuiver beeld (**p68**)
  + fluorischentie verminderd in functie van 1/z² → lokalisatie fluoriscentie in bepaald confocaal vlak
  + rood licht → diep penetrerend vermogen (dikke structuren bestuderen) + minder energetisch = minder schadelijk

Atomic force microscoop

* hefboom & probe → scannen oppervlakte specimen → interactie met specimen zorgt voor bewegen hefboom → beweging laserlicht
* besturen van verplaatsing & manipulatie van individuele moleculen (vb. titin molecule)
  1. *Electronenmicroscopie*

Voordelen

* visualisatie organllen, structuren & macromoleculaire complexen
* anatomaire resolutie + 3D analyse mogelijk

Nadelen

* geen levende celen of real-time analyse
* complexe preparatie specimen met groter risico op artefacten
  + fixatie met cross-linking peptides (glutaraldehyde) & osmium tetroxide (stabilisatie membranen + eiwitten) → dehydratatie + invriezen + water vervangen door organisch solvent → inbedding
  + snijden met ultramicrotoom (50-100nm) → belang door beperkt penetratie-vermogen elektronen
  + specimen op koper rooster bekleed met plastic/koolstof (3mm)
  + impregnatie met zware metalen/ zouten → contrast vergroten

Principe tranmissie EM → lijkt op lichtmicroscoop maar elektronen bundels i.p.v. licht

Werking transmissie EM

* spanningsverschil van 80000V → creëert golflengte = h/m.v met resolutie = 0,1 nm (1A)
  + resolutie wordt niet groter doordat abberraties moeilijk te corrigeren zijn + enkel centrum EM lenzen kunnen benut worden + inherente beperking preparaten
* hoe hoger snelheid elektron hoe kleiner golflengte hoe beter scheidend vermogen
* vacuüm tube om absorbtie elektronen te beletten
* colloidaal goud gekoppeld aan antilichaam → densere structuur rond antigen
* 3D recontructie mogelijk
* metal-shadowing → zijdelingse projectie van partikels maakt 3D recontructie mogelijk
* negatieve kleuring met zware metaal zouten (uranyl acetaat) → negatief beeld

3D reconstructie met transmissie EM

* Cryo-EM + single particle reconstruction → intergratie & combinatie van multipele beelden → digitale reconstructie van gemiddeld beeld (mathematische modellen)
* EM tomogroafie = specimen bekijken in verschillende oriëntaties → digitaal 3D informatie verwerken → 3D model
* Single particle reconstruction + molecular model fitting
  + X-straal diffractie is niet altijd mogelijk
  + oplossing = EM in combinatie met X-straal diffractie → hoge resolutie via X-straal & lage resolutie via EM → mathematische 3D structuur met resolutie van 1 nm

SEM = scanning elektronen microscopie

* geeft altijd 3D beeld van preparaat
* Werking
  + elektronenbundel gaat niet door preparaat, maar wordt afgeketst aan oppervlak (**p91**) → beamdeflector buigt stralen af → diffractie stralen wordt gemeten op detector → beeld
  + 20000V; vacuüm; condersorlens convergeert stralen tussen deflectorplaten (divergeren daarna); convergentie door objectie;
  + primaire elektronen = reflecterende ↔ secundaire = losgeslagen uit specimen → fluorescentie mogelijk
  + detectoren meten primaire & secundair e- of fluorescentie
* chemische fixatie → punt of vriesdrogen → bedekken met goudlaag om elektronen af te leiden naar specimen (anders barst specimen door elektrostatische oplading)
* High resolution SEM → alternatieve elektronen bron

**H2: MEMBRANEN**

Belang

* essentieel voor leven
* omsluiting cel → scheiden cytosol & extracellulaire omgeving
* omsluiting intracellulaire organellen → andere samenstelling cytosol mogelijk
* vorming ionengradiënten dankzij membraan-eiwitten → ATPsynthese & transport & signaaltransductie
* receptoren voor externe signalen → controle cellulaire respons op signalen van andere cellen

Principes

* dunne lipiden laag (fosoflipiden, cholesterol, glycolipden) → amfifiel (hydrofiel+foob)
* 30% van de eiwitten in de cel is membranair (essentieel voor celfysiologie)
* ook glycolipiden aanwezig (suiker + lipide)
  + vb. ganglioside → bind cholera → dehydratatie door uitstoting water en Na+ in darmepitheel
* dynamisch → intrinsieke fluiditeit
* lipide bilyer =5nm
* impermeabel voor water
* functie gemedieerd door trans-membranaire eiwitten
* sturcturele & functionele interacties met cytoskelet en intra-cellulaire moleculen

Functies

* trans-membranair molecule transport
* signaaltransductie
* cel-cel interactie & adhesie
* intra-cellulaire trafficking van eiwitten
* ATP synthese
* endocytose & exocytose

Membraanfluiditeit

* laterale diffusie (binnen 1 vlak bilayer) & rotatie
* flip-flop is zeldzaam → probleem voor synthese = cytosolische monolaag (synthese in slecht 1 monolaag → fosfolipide translocator catalyseert flip-flop
* meer onverzadigde vetten → meer fluide
* meer cholesterol → minder fluide (verminderde permeabiliteit)
* afhankelijk van chemische samenstelling en temperatuur
* onderzadigde vetten leiden tot een dunnere bilayer dan verzadigde vetten
* bewijs
  + fusie mens-muis met verschillende fluoriscente merkers → heterocaryon vertoont menging membraaneiwitten (niet gescheiden) (**p153**)
  + fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) → bleaching bepaald deel verdwijnt  → gebeurt dit niet dan is eiwit vastgeankerd (vb. in lipid raft) (**p154**)
  + fluorescence loss in photobleaching (FLIP) → continue bleaching → alle moleculen raken gebleached omdat ze allemaal in de bleaching zone terecht komen (**p154**)

Eigenschappen

* Lipiden vormen spontaan een micel of een vesikel met bilayer → energetisch gunstig door buitensluiten water
* Membranen vertonen domeinen met verschillende chemische samenstellingen & dikte (ondanks fluiditeit)
* Lipid raft = incorporatie of exclusie van bepaalde eiwitten → concentratie eiwitten voor transport in vesicels + vorming eiwit-complexen (signaaltransductie)
  + dikker dan lipide bilayer
* Lipide druppels/droplets
  + intra-cellulair organel → depot voor neutrale lipiden (TAG, cholesterol)
  + dik zijn is hoeveelheid vetrdruppeltjes, niet hoeveelheid vetcellen

Membraan assymetrie

* functieverschil tussen binnen- en buitenlaag
  + binnenlaag is negatief geladen
  + buitenlaag bevat eiwitten die covalente bindingen kunnen aangaan
* signaaltransductie → van extracellulair naar intracellulair
  + modificatie van lipide polaire hoofdgroepen creëert bindingsplaatsen voor eiwitten
  + vb. fosforylatie fosfatidyl-inositol door foso-inositide 3 kinase (lipide kinase)
    - activatie receptor → activatie IP3-kinase → fosforylatie fosfatidyl-inositol → afgave intracellulair orgaan → recruteiring intracellulaire eiwitten naar cytosolische kant membraan
  + vb. fosfolipase C
    - activatie receptor → fosfolipase C → knipt IP3 af van membraan → 2 signalen → vrijmaken Ca2+ uit ER (**p143**)

Membraaneiwitten

* 25% eiwit in membranen zenuwcellen - 75% eiwit mitochondriale membranen
  + gemiddeld 50% eiwitten → 50 lipiden voor 1 eiwit
* laterale diffusie eiwitten wordt beperkt
  + aggregatie tot eiwitcomplexen
  + interactie met extracellulaire moleculen = tethering
  + interactie met intracellulaire moleculen = tethering
  + intercellulaire interacties (vb. tight junction)
  + ankyrine - spectrine - adducine - band 4.1 in RBC verminderen mobiliteit
    - genetisch defect ankyrine → spheocytosis (ronde RBC) → anemie
  + membraanskelet verdeelt membraan in domeinen → eiwitten blijven meestal binnen hun eigen domein (slecht occasioneel naar een ander domein) (**p159**)
* Membraanassociaties (**p145**)
  + single pass → 1 α-helix (met vetzuur)
  + multi pass → 3 α-helix
    - alle transport-eiwitten voor ionen & water-oplosbare moleculen
  + β-barrel
  + amfiele α-helix
  + éénzijdig covalent
  + GPI-anker (glycosylfosfatidyl inositol)
  + niet covalent → interactie met een ander transmembranair eiwit extra- of intracellulair
* Trans-membranair meestal α-helix → energetisch gunstig
  + hydrofobe AZ in bilayer
  + peptide binding zelf is polair met interactie met H-bruggen → maximaal dus meest stabiel in α-helix
  + vb. retinal: licht → H+gradiënt → ATP
* Trans-membranaire α-helix interacties
  + eiwit kan geknipt worden door protease → 2 losse delen → komen samen in de bilayer (energetisch gunstiger) (**p150**) → mogelijk 2 delen gecodeerd door aparte genen
  + pas gesynthetiseerd membraan → helices uit elkaar → opvouwen en dichter bij elkaar
* Trans-membranaire β-barrel
  + meestal in bacteriele, chloroplast, mitochondrien → rigide, minder flexibel
  + kunnen als porie functioneren
  + worden groter met aantal strengen
* Extracellulair deel (→ sacharidenlaag)
  + extracellulaire signalen opvangen (mogelijk conformatieverandering)
  + vaak koppeling oligo-sachariden met S-S
    - rechtstreeks aan lipide → glycolipide
    - aan peptide → glycoproteine of proteoglycaan
* Intracellulair deel → cytosol reduceerd S-S bruggen → vrije sulfhydryl groepen

Cellen kunnen localisatie van lipiden en eiwitten beperken tot specifieke domeinen op het celmembraan → tight junctions bij epitheel (**p155**) & fencing bij spermacel (≈ virtuele omheining)

**H3: MEMBRAANTRANSPORT**

Probleem → membraan is niet permeabel → transport van moleculen noodzakelijk

* Diffusie van hoge naar lage concentratie
  + hoge diffusiesnelheid → laag moleculair gewicht - hoge vetoplosbaarheid - lage polariteit (lading)
* **p162** → relatieve permeabiliteit → bij ionen en grote polaire moleculen is diffusie te traag → membraan transport eiwitten (specifiek per molecule)

Membraantransport-eiwitten

* Defecten leiden tot ziektes
  + cystinuria → defect in cystine transport vanuit urine in bloed
  + mucoviscidose → defect in chloride transport
* Multi-pass eiwitten → verhindering contact met hydrofobe bilayer
  + Transporters/permeasen → actief & passief transport via conformationele wijziging om molecule te transporteren door het membraan
  + Kanalen → enkel passief transport via watergevulde porie die beperkte interactie aangaat met de transportmolecule
    - gap junctions, porines, ionen-kanalen (zie verder)

Membraantransport van geladen moleculen

* beïnvloedt door concentratiegradiën & membraan-potentiaal (elektrisch potentiaal verschil) → elektro-chemische gradiënt → **p168**: versterking of tegenwerking

→ Overzicht **p168**

Passief transport → moleculen met hun electro-chemische gradiënt mee

* Conformationele wijziging in transporter
  + transitie at rondom & reversibel → niet afhankelijk van molecule op bindingsplaats
  + statistisch meer kans dat transportmolecule bindt wanneer transporter opent langs kant met grootste concentratie aan transportmolecule
* Simpele diffusie vs. transporter diffusie **p170**
  + transporter heeft maximale snelheidsbeperking wanneer bindingssites zijn bezet
  + Vmax = maat voor de snelheid waarmee de conformationele toestanden in elkaar overgaan → bindingsconstante transporter is Km=½ Vmax

Actief transport → moleculen tegen hun elektro-chemische gradiënt in pompen

* Types transporters (geëvolueerd uit passieve transporters)
  + gekoppelde transport → 2 moleculen tegelijk → symport ↔ antiport
  + ATP-aangedreven pomp
  + licht-aangedreven pomp
* Aangedreven door ionen-gradiënt → energetisch gunstig transport van molecule X levert nodige energie voor transport tegen molecule Y tegen elektro-chemische gradiënt → Na+-gradiënt in plasmamembraan (H+-gradiënt bij bacteriën, organellen)
  + meer Na+ buiten dan binnen cel → Na+ van buiten naar binnen → energie voor andere moleculen (suiker, aminozuren)
  + ATP-afhankelijk Na+ pomp pomp Na+ terug uit de cel = opbouw Na+-gradiënt → levert indirect energie voor transport andere moleculen = secundair actief transport ↔ primair actief transport = direct via ATP transporters (zonder tussenkomst ionengradiënt)
  + hoe steiler Na-gradiënt hoe sneller het transport
  + **p174** transitie van A naar B is waarschijnlijker + glucose bindt meer in A
  + Coöperatieve binding van Na+ & glucose → binding ene verhoogt affiniteit voor andere & enkel switch wanneer (geen van) beide gebonden zijn
  + **p179** tran-cellulair transport t.h.v. het epitheel → tight junctions verhinderen lekkage zodat opbouwen gradiënten mogelijk is & verzekeren asymmetrische transporter distributie doordat het diffusie-barrières zijn (verschillende transporters bassaal & apicaal)

Regeling van pH waarden → contole door plasmamembraan transporters

* Na+/H+ exchanger → pompt H+ uit de cel (afkomstig van intra-cellulaire reacties of van lek van buitenuit) en Na+ in de cel
* Na+-afhankelijke Cl--HCO3- exchanger → pompt H+en Cl- uit de cel en Na+ en HCO3- in de cel → HCO3- neutraliseert H+ tot H2O en CO2
* Na+-onafhankelijke Cl--HCO3- exchanger (band 3 exhanger) → pompt HCO3- uit de cel en Cl- in de cel → daling pH & HCO3- → afgifte CO2 in capillairen
* ATP-afhankelijke H+-pomp → controle pH intracellulaire organellen (lysosomen, endosomen, secretische vesikels)

Types ATP-afhankelijke pompen = transport ATPasen (secundair actief transport)

* P-type pompen
  + multipass transmembraan eiwitten; rechtstreeks gefosforyleerd; meeste pompen (vb. opbouw Na+, K+, H+, Ca2+ gradiënt)
  + vb. Ca2+pomp → opbouw Ca2+gradiënt (belang bij signaaltransductie)
  + vb. SERCA Ca2+/ATPase = Ca2+pomp in edoplasmatisch reticulum → spiercontractie = Ca2+ naar cytosol ↔ spierrelaxtie = Ca2+ naar ER (**p184**)
  + plasmamembraan NA+K+ATPase (antiporter) → Na+-gradiënt = drijfkracht transport essentiële nutriënten & pH regulatie (verbruikt 30% cellulaire energie)
    - kan ook gebruikt worden om ATP te synthetiseren (**p185**)
    - osmolariteit controleren zodat ionconcentratie & celvolume (niet openbarsten) gecontroleerd wordt vb. bij RBC → ouabaine = inhibitor van deze pomp → cardiotoxine (RBC barsten open) & digoxine = cardiotoxine (daling hartslagfrequentie + vergroting contractie-kracht door ↑Na+ ↑Ca2+)
* F-type pompen
  + turbine-achtig met verschillende subeenheden; plamamenbraan bacteriën, mitochondrien
  + gebruiken H+ gradiënt (opgebouwd tijdens elektronentransportketen) om ATP te synthetiseren → ATP synthase
* V-type pompen
  + gerelateerd aan F-type
  + gebruiken ATP om H+gradiënt op te bouwen in intracellulaire organellen
* ABC transporters
  + bevatten ATP-Binding-Cassetes → pompen kleine moleculen door membraan
  + ATP binding leidt tot dimerisatie → ATP hydrolyse → dissociatie (**p189**)
  + eukaryoten → meestal export ↔ bacteriën → import & export
  + gram-negatieve bacteriën (5% genen ABC) → transporters in binnenste membraan = nutriënten eerst naar periplamatische ruimte via porines in buitenste membraan (**p190**)

Defecten & ziektes ABC transporters

* mucoviscidoe → defect CFTR transporter = ABC transporter → passief transport Cl- maar ATP hydrolyse nodig voor openen/sluiten kanaal
* plasmodium falciparum (malaria) → chloroquine is toxische voor deze parasiet → chloroquine wordt door ABC transporter uit cel gepompt (zit in p.falciparum, maar niet genoeg) → er bestaan p.falciparum die wel genoeg hebben en overleven chloroquine4
* multidrug resistentie p glycoproteine (MDR) pompt hydrofobe anti-kanker drugs uit cellen → kankerbestrijding werkt niet meer

Ionenkanalen

* 100 verschillende; nauwe selectieve porie; opening begrensd door polaire aminozuren; hydrofobe aminozuren in lipide bilayer; fluctuatie open-toe (gated kanaal); passief ionentransport; sneller dan transporter; selectiviteitsfilter = kleinste opening
* continue chemische/elektrische stimulatie zorgt voor inactivatie = desensitisate → activatie wanneer stimulus(ligand, elektsich, mechanisch) verdwijnd
* in neuronen, zenuwen; vb. K+-kanaal → sommige altijd open = K+ leak channels → essentieel voor in stand houden van membraan potentieel plasmamembraan
  + membraan potentieel = verschil lading tussen beide zijden → actief via Na+/K+pomp en passief via K+ leak channel
  + **p196**: efflux K+ stopt wanneer aantrekkingskracht negatieve moleculen het effect van de concentratie-gradiënt compenseerd → rust membraanpotentieel = negatief (analoog voor Cl- maar tegenovergesteld → lekt in cel)
* Kanalen openen door verschuiven van helices

K+-kanaal

* **p199**: vestibule waar K+ binnentreden, aangetrokken door carbonylgroepen (O) aanwezig in selectiviteitsfilter → repulsie in selectieviteitsfilter → K+ verder naar binnen geduwd
* Na+ van K+ onderscheiden → moleculen zijn volledig gehydrateerd → verlies energie door dehydratatie wordt bij K+ gecompenseerd door carbonyl interactie → bij Na+ is dit niet voldoende doordat Na+ te klein is (p199)

Aquaporine

* transport water (109 moleculen/s/kanaal) → verhinderen ionentransport
* porie te nauw voor transport gehydrateerde ionen & dehydratatie eist te veel energie (geen compensatie doordat porie niet kan interageren met ion)

Neuronen

* singaal-ontvangst -conductie -transmissie → signaal = verandering in membraanpotentiaal van plasmamembraan neuron → verspreiding naar andere delen → afzwakking in functie van afstand tot oorspronkelijke begin → amplificatie! (automatisch) = voortbeweging signaal
* golf van elektrische excitatie = actie-potentiaal (100m/s) → ontstaat doordat stimulus een bepaalde threshold (drempelwaarde) overschreidt → explosie van elektrische activiteit die zich voorzet over plasma-membraan
* depolarisatie = initiatie actie-potentiaal
  + = instroom Na+ in zenuwcel (normaal meer buiten cel)
  + voltage-gated kanalen openen wanneer elektrische stimulatie drempelwaarde overschreidt → shift naar minder negatief worden
  + influx Na+ leidt tot verdere depolarisatie → meer open kanalen → meer influx
* **p204**: wanneer repolarisatie start worden voltage gated Na+ kanalen geïnactiveerd (elektrochemische drijfkracht ≈ 0) & voltage gated K+ kanalen openen zich en K+ stroomt cel uit → cel wordt steeds meer negatief (repolarisatie)
  + Na+ kanalen kunnen enkel opnieuw openen wanneer het membraan potentieel terug zijn initiële negatieve waarde heeft
  + **p206**: ene kanaal opent volgende kanaal → verplaatsing signaal

**H4: INTRACELLULAIRE COMPARTIMENTEN & EIWIT-SORTERING**

Prokaryoten = 1 compartiment → eukaryoten = meer compartimenten(functioneel verschil)

Eiwitten bepalen structuur & functie cel → enzymen, selectief transport, organel-specifieke oppervlakte merkers (juiste molecule op juiste plaats)

Organellen (50% celvolume)

* Eigenschappen: specifieke transport eiwitten in membranen voor transport metabolieten; transport organel-specifieke eiwitten noodzakelijk; karakteristieke positie in cel (interactie met cytoskelet nodig); vaak geen de-novo synthese
* Nucleus → DNA & RNA synthese
* Cytosol
  + eiwitsyntese/degeneratie & intermediair metabolisme (= synthese bouwsteenmoleculen + degradatie kleine moleculen)
* Cytoplasma = cytosol + cytoplasmatische organellen
* Endoplasmatisch retculum
  + ruw met ribosomen ↔ glad zonder ribosomen
  + synthele solubele & integrale membraaneiwitten; transport eiwitten in ER lumen; lipidensynthese; opslag Ca2+ (ook SERCA van belang)
* Golgi apparaat
  + ontvangt eiwitten & lipiden van ER → verzending naar specifieke locaties + modificaties in gogli cisternae
* Mitochondriën/chloroplasten
  + ATP aanmaak + energieconversie
  + chloroplasten ≈ plastide met andere functies in plantcellen (voorraad, pigment)
* Lysosomen → digestieve enzymes + degradatie dysfunctionele organellen/ macromoleculen
* Endosomen → transport ge-endocyteerd matriaal naar lysosomen
* Peroxisomen → enzymen voor oxidatie-reacties (vb. detoxificatie alcohol)
* Medisch belang → dysfunctie organellen
  + adrenoleukodystrofie → defect ABC transporter ABCD1 (biogenese peroxisomen) → defect myelinisatie → genezing via gentherapie met hemapoëtische stamcellen (leiden tot microgliacellen voor aanmaak myeline)
* Organellen verschillen in aantal/volume & functie → cel-type specifieke functies
* Evolutie → eukaryoten hebben interne membranen om vitale functies te garanderen = adaptatie voor kleiner opp/vol ratio i.v.m. prokaryoten → evolutie gaat samen met specialisatie van membraan functies
* plasma membraan is miniem i.v.m. totale massa/oppervalk organelmembranen

Ontwikkeling plastides

* pro-plastides → immature precursor organel aanwezig in plantcellen → ontwikkeling tijdens differentiatie naargelang functie cel (opslagplasmide, chromoplast, chloroplast)
* chloroplast → fotosynthese
  + invaginatie interne membranen → worden afgeknepen = thylakoide (eigen membraan; verschillend rest van chloroplast; autonome groei/deling) → thylakoide bevat fotosynthetische eigenschappen

Oorsprong organellen

* hypothetisch → enodsymbiose ↔ membraan invaginatie + afknijpen
* nucleus = topologisch equivalent met cytosol & lumen ER = topologisch equivalent met extracellulair milieu → invaginatie & dissociatie → dubbele membraan structuren
* Secretorische & endocytotische pathways verbinden verschillende organellen via communicatie door transportvesikels → mitochondrien & chloroplasten uitgesloten
* Mitochondriën (& chloroplasten) → eigen genoom; uniek intern membraan (≈bacterie); unieke functie; geïsoleerd van vesiculair verkeer → waarschijnlijk endosymbiose

Eiwit sortering (schema **p222**)

* Gericht transport naar specieieke compartimenten vereist specifieke sorteer signalen → sorteer principes
* Geen sorteersignaal → eiwit blijft in cytosol
* Gated transport
  + tussen cytosol en nucleus (topologisch equivalent) → nucleaire porie complexen in nucleair membraan → selectieve werking
  + actief transport macromoleculen/complexen; ook diffusie kleine moleculen
* Transmembranair transport
  + door membranen cytosol in topologisch verschillend compartiment → translocator eiwitten → transport door translocator vergt ontvouwd eiwit
  + van cytosol in ER of in mitochondriën
* Vesiculair transport
  + transport sferische compartimenten in groter irregulier organel → opgeladen met cargo afkomstig van lumen ene organel → onladen in ander organdel door fusie met membraan
  + enkel tussen topologisch equivalenten → geen transmembranair transport
  + budding & fusie concept → budding = afsnoering vesikel → fusie = cargo in lumen doelwitorganel + versmelting membraan met doelwitcel (bewaren oorspronkelijke oriëntatie membraaneiwitten) (**p222**)
* Sorteersignaal = specifieke aminozuursequenties → bepaalt of eiwit in organel blijft of naar ander wordt doorgegeven = signaalpeptides
  + N-terminale signaalpeptides → afgeknipt door signaal peptidase wanneer bestemming is bereikt
  + kunnen ook intern in het eiwit ingebed zijn
  + soms samengesteld uit multipele interne sequenties die bepaalde 3D configuratie aannemen = signal patch
  + medisch belang → moleculair aanpassen signaalpeptides (vb. genetisch) → schadelijke enzymen in een organel uit een organel halen (vb. naar een ander organel sturen)
* Sorting receptoren
  + herkennen signaalpeptides → gidsen eiwitten naar juiste bestemming
  + katalystische werking + keren terug naar oorspronkelijk organel (recyclage)
  + herkennen bepaalde klasse eiwitten (geen individuele)

Nucleus

* dubbel membraan; nucleaire porie complexen (NPC); nucleaire lamina (netwerk onder binnenste membraan) = steun voor nucleair membraan; bidirectioneel selectief transport → mRNA, tRNA export & import histonen, DNA polymerase; RNA polymerase
* functies membranen
  + binnenmembraan = ankersites voor chromatine & nucleaire lamina
  + buitenmembraan = continu met ER & bedekt met ribosomen (eiwitsynthese)
  + perinucleaire ruimter ertussen → eiwit transport
* nucleaire porie complexes (NPC)
  + transport macromoleculen mogelijk zonder dat deze moeten ontvouwen
  + nucleoporines = NPC eiwit
  + symmetrisch 8-voudig rotationeel 2-voudig transversaal; 30 eiwitten maken een NPC; 500 macromelculen/s/richting
  + vrije diffusie voor kleine moleculen → hoe groter MW hoe trager → >60kDa bijna geen passief transport
  + 4 subeenheden **p229** → kolom (wand) + annulaire (centraal) + lumenale (transmembranaire verankering aan plasmamembraan) + ring (nucleaire begrenzing cytosol)
  + fibrillen → cystolisch & nucleair → korfstructuur aan nucleaire zijde → verschillend langs binnen & buiten
* Gated diffusie barrière
  + gedesorganiseerde domeinen core NPC eiwitten in centrale porie → verhindering passiefe diffusie grote macromoleculen = zorgt dat kern en cytosol verschillende samenstelling behouden → actief transport noodzakelijk
* Nucleaire localisatie signalen (NLS) → nucleaire eiwitten naar nucleus
  + selectief & actief nucleaire import
  + bevatten veel Lys & Arg → positief geladen
  + verschillende samenstelling; kunnen overal op eiwit voorkomen → vormen loops of patches op eiwitoppervlak; kunnen via linkers gekoppeld worden aan cystosole eiwitten
  + verandering 1 AZ in NLS → NLS kan niet meer normaal functioneren → eiwit blijft in cytosol
* Nucleair import
  + binding aan externe fibrillen nucleaire porie → centrum NPC → transport
  + nucleaire import receptoren (NIR) (aanverwante genen) herkennen NLS & NPC om nucleair transport te verzekeren → elk NIR bepaalde subset cargo eiwitten; sommigen binden indirect via nucleaire import adaptor (verwant aan NIR) met interacties via NLS sequenties **p231**
  + NIR bindt fibrillen op NPC centrale porie eiwiten rijk aan fenylalanine en glycine = FG-repeats
* Nucleaire export
  + actief transport door NPC via nucleaire export receptoren & nucleaire export signalen op cargo → receptoren binden op NPC
  + receptoren verwant aan NR → zelfde nucleaire transport receptoren familie = karyoferines
* Intra-nucleair transport
  + dankzij Ran GTPase → bepaling directionaliteit van het transport
  + transport door NPC vergt energie → hydrolyse GTP via Ran GTPase → Ran-GDP & Ran-GTP → gradiënt hiervan bepaalt juiste richtingdoor verschillende lokalisatie (**p233-234**)
  + Cytosol → GRPase activating protein (Ran-GAP) zet Ran-GTP om in Ran-GDP
  + Nucleus: guanine exchange factor (Ran-GEF; op chromatine gebonden) → zet Ran-GDP om in Ran-GTP
* Regulatie transport door NPC
  + door modulaties van interacties met het transport systeem
  + shuttle eiwitten hebben zowel nucleaire localisatie signalen als nucleaire export signalen → continue transport in en uit nucleus
  + verandering van export/import verhouding verandert locatie van eiwit → meer import dan export = eiwit in nucleus (en omgekeerd)
* Controle nucleaire import
  + regulatie van nucleaire lokalisatie export signalen (vb. fosforylatie)
    - defosforylatie = blootstelling NLS
    - immunosuppressiva inhiberen calcineurine zodat NF-AT niet gedefosforyleerd word → geen T-cel activatie (**p236**)
  + binding met eiwitten die transport signalen maskeren
  + binding op eiwitten die proteine verankeren aan cytoskelet
* Mitose = nucleaire membraan dissociatie **p238**
  + nucleaire lamina (netwerk lamines = intermediair filamenten van het cytoskelet) → stabiliteit/vorm nucleair membraan dat verankerd is via NPC en integrale eiwitten van binnenmembraan + interactie met chromatine (dat ook met integrale eiwitten aan binnenmembraan hangt)
  + celdeling = fosforylatie lamines door Cdk (cycline-afhankelijk proteine kinase; geactiveerd tijdens mitose) + fosforylatie nucleaire membraan eiwitten
  + NPC bindt NIR & dyneine motor eiwitten dissociëren membraan van chromatine → geen nucleus-cytosol barrière
  + Ran-GEF = positionele merker voor chromatine tijdens mitose
    - gebonden aan chromatine  → GTP bij chromatine
    - NLS worden niet weggeknipt bij mitose → nucleaire eiwitten moeten telkens opnieuw geïmporteerd worden
  + defosforylatie lamines = heropbouw nucleus

Mitochondrie

* eigen DNA/ribosomen/componenten-eiwitsynthese; eigen samenstelling; groei uit voorgaande organellen = afhankelijk van eiwit-import (eiwit translocatie));
* eiwit-translocatie → cytosol naar mitochondrie
  + eiwitsynthese in cytosol als mitochondriale precursor
  + transport naar mitochondrie via post-tranlationeel mechanisme
  + N-terminale signaalsequentie voor matrix eiwitten afgeknipt door peptidase
  + signaalsequentie voor eiwitten membranen/inter-membranaire ruimte wordt niet afgeknipt
  + signaalsequentie : amififiele α-helix; positieve AZ aan ene kant & hydrofobe aan andere kant
* Eiwit translocatoren mitochondriale membranen
  + TOM → buitenmembraan (Translocator Outer Membrane)
  + TIM → binnenmembraan (Translocator Inner Membrane)
  + SAM → translocatie van β-barrel eiwit & incorperatie in buitenmembraan
  + OXA → insertie binnenmembraan eiwitten vanuit matrix of in mitochondrie gesynthetiseerd
* Eiwit import
  + Precursoren geïmporteerd als ontvouwen ketens → binding aan chaperones (Hsp70) → specifiek voor bepaalde signaalsequentie
  + deze eiwitten worden weggedreven na binding signaalpeptide op importreceptor TOM → precursor door kanaal → tegelijk penetratie binnen & buitenmembraan
  + **p242**: binding aan receptor → door buiten membraan door TOM & door binnenmembraan door TIL → afsplitsing signaalpeptide in matrix
  + ATP hydrolyse & membraan potentiaal drijven eiwit-transport in de mitochondriale matrix aan (**p242**)
    - ATP hydrolyse voor afsplitsen Hsp70 & mitochondriaal Hsp70 (TIM)
    - H+-gradiënt (minder in matrix, meer in intermembranaire ruimte) = energiebron voor TIM-translocatie
* Integratie porines in buitenmembraan
  + naar intermembranaire ruimte via TOM → binding aan chaperones
  + SAM incorporeert eiwit als β-barrel in buitenmembraan (verwant aan bacterieel eiwit

Peroxisomen

* oxidatie reactie → peroxidatie-rectie & catalase detoxificatie (van alcoholen)
  + RH2 + O2 → R + H2O2
  + H2O2 + R’H2 → 2H2O + R’
* biosynthese plasmalogens (myeline bestandeel)
* **p245**: afsnoeirng peroxisomale precursor vesikeles met peroxines (transporteiwit) → C-terminale signaalsequentie & receptor eiwitten translocator in cytosol of docking eiwitten aan cystolische kant → ATP afhankelijk transport
* ≈ cytosol-nucleus transport → geen ontvouwen eiwitten
* Zellweger syndroom → lege peroxisomen → hersen/lever/nier-dysfuncite & demyelinatie (verstoorde biosynthese plamalogen = myeline-bestanddeel)

Endoplasmatisch reticulum

* >50% alle organellen; contine met nucleaire membraan; ER lumen = ER cisternae
* Functies
  + eiwit/lipide-synthese; intracellulaire CA2+-voorraad (SER! bij spiercontractie); aanmaak transmembraaneiwitten van organellen; aanmaak membranaire lipide mitochondriën & peroxisomen
* Ruw ER bevat membraangebonden ribosomen → essentieel eiwitsynthese
* Glad ER zonder ribosomen → synthese lipiden, lipoproteine partikels, detoxificatie enzymen, cholesterol (!hormonen); intracellulaire Ca2+-voorraad → SER met SERCA pomp
  + cytochroom P450 (detoxificatie enzym) = katalyse omzetting wateronoplasbare drugs/metabolieten in wateroplosbare derivaten → uitscheiding mogelijk maken
  + vb. ER-steroidhormoon producerende cel = testosteron in Leydig cel testes
* Glad ER is meestal beperkt → meestal deels glad & deels ruw → ratio ruw/glad afhankelijk van celtype (functie) cel
  + Transitioneel ER = glad ER waaruit transport vesikels worden afgesplitst → golgi
  + microsomen = isolatie van pure ER fragmenten → glad moeilijk te onderscheiden van andere vesikels (veel aanwezig in hepatocyten & spiercellen) → scheiden a.d.h.v. centrifugatie in sucrose-gradiënt (densiteit)
* ER lipide cholesterol & ceramide synthese
  + lipides (belang voor membranen) → synthese aan cytosolische zijde → transport naar binnenkant ER nodig → scramblase katalyseert flip flop → symmetrische groei (↔ assymetrisch plamamembraan met flippase) **p274**
  + cholesterol → steroidhormonen
  + ceramide → precursor voor glycosphingolipiden/sphingomyeline in golgi
  + geen de novo lipide synthese in mitochondriën → import vanuit ER
  + fosoflipide exchange proteine nodig voor fosfolipide transport tussen membranen
* Eiwit-transport ER → co-translationeel
  + import nog voor synthese polypeptide is beëindigt → ribosoom gebonden aan ER-membraan
  + ↔ post-translationeel transport mitochondrie, nucleus, peroxisoom, chloroplast
* Signaal hypothese
  + transmembranaire eiwitten → partiële translocatie + inbedding in ER-membraan
  + wateroplosbare eiwitten → volledige translocatie (in ER lumen)
* Wateroplosbare eiwitten (eiwitten ER lumen)
  + ER signaalsequentie = targetting naar ER & translocatie door ER-membraan → gevormd door ribosoom
  + Signal recognition particle (SRP = eiwitten + RNA) herkent signaalsequentie aan ribosoom→ pauze translatie door elongatie factor binding op ribosoom te verhinderen
    - ! geen chaperones nodig (↔ mitochondriën)
    - verhindert pre-matuur opvouwen eiwit (wat ER translocatie verhindert)
    - verhindert dat eiwit in cytosol komt
  + Ribosoom-SRP-complex bindt aan SRP receptor op ER membraan via signaalsequentie = star-transfer signaal → translatie doorheen membraan
    - receptor = gated porie → bevat α-helix prop om porie gesloten te houden wanneer er geen transport is → zodat Ca2+ niet uit ER stroomt
  + Peptidase knipt signaalsequentie af → eiwit in ER
  + **p256-257-258**
  + Soms is er ook post-translationele translocatie
    - binding op chaperones (opvouwen beletten) & sec-complexen
    - BiP = ATP afhankelijke chaperone dat enkel in ER voorkomt
    - ER transport eukaryoten ≈ plasmamembraan transport prokaryoten
* Single pass transmembranaire eiwitten
  + ER signaal bindt SRP in cytosol → bindt translocator → openen porie = start-transfer signaal
  + stop-transfer signaal = hydrofobe sequentie die translocatie wanneer ze door de translocator gaat → eiwitsynthese gaat verder in cytosol
  + conformationele wijziging translocator (opening groef) + laterale vrijgave van eiwit in bilayer
  + 2 conformatie → COOH buiten en NH2 binnen & andersom → afhankelijk van lating van de signaalsequentie
* Multi pass transmembranaier eiwit
  + zelfde principe single pass eiwitten → start & stop sequenties wisselen af
* Kenmerken
  + alle kopieën van een eiwitten hebben zelfde oriëntatie
  + ER-membraan = asymmetrisch → behouden door afsplitsing/fusie vesikels
  + asymmetrie is geen inherente eigenschap maar weerspiegeling ER translocatie proces → bewijs: membraaneiwitten in kunstmatige lipide vesikels hebben correcte & inverse oriëntatie (symmetrisch) → er is geen translocatie
  + meeste eiwitten ER hebben andere eindbestemming ↔ ER-residente eiwitten met ER-retentie signaal (meestal 4 AZ carboxyterminaal)
    - proteine disulfide isomerase (PDI) → maakt zwavelbruggen tussen 2 Cys (↔ SH bij cytosolische eiwitten)
    - BiP (chaperone) → eiwitten via energie vergend post-translationeel proces door ER membraan + binding op slecht opgevouwen eiwitten (voorkomt risicio op aggregatie vb. Alzheimer, prionen)
* Posttranslationele modificaties
  + sulfide bruggen door PDI
  + Asn-linked, N-linked glycosylatie (bij 90% van alle glycoproteines) → koppeling suikergroep aan proteine & processing = afknippen 3Glc+1Man → core regio wordt behouden tijdens maturatie in golgi & afk
    - werking **p265** → oligosaccahryl transferase zorgt voor overdragen donor-sacharide met energie geleverd door pyrofosfaat
    - Cystolishce eiwitten → simpele glycolysatie (NAG-Ser/Thr)
* Functie suikergroepen = moleculaire merker → controle correct opvouwen
  + Calnexine & calreticuline = chaperones die suikers binden → worden langer in ER gehouden → suiker afgeknipt (glucosidase) **p266**
  + oncorrecte eiwitten → export naar cytosol → degradatie
    - ER mannosidase knipt mannose uit core oligosacaride & vooral actief bij eiwitten die te lang in ER zijn
    - herkenning door retro-translocatie systeem → naar cytosol
    - markering door poly-ubiquitinylatie → afbraak door proteasoom
  + fractie eiwitten kan ontstappen aan correctie mechanismen voor foutieve eiwitten (chaperone of proteasoom) → leiden tot aggregatie → ziektes (vb. Alzheimer, Creuzfelt Jacob
* Unfolded protein response
  + accummulatie van incorrecte eiwitten stimuleert verhoogde transcriptie genen ER chaperones/ eiwitten retro-translocatie/eiwitten eiwit-degradatie
  + activatie IRE1-, PERK-, ATF6-gen = pathways om genen te activeren **p271-272**
* GPI ankers (glycosyl-fosfatidyl-inositol)→ verankeren eiwitten aan membraan → vorming lipid rafts (! signaaltransductie)
  + ER enzymen katalyseren GPI modificatie van membraaneiwitten
  + kunnen losgeknipt worden door fosfolipase → opnieuw vrij eiwit
  + Trypanosoma → VSG-coat vastgeankerd via GPI → immuunsysteem kan geen antigene epitopen detecteren
    - VSG kan van membraan worden afgeknipt → los VSG omzeilt immuunaanval

**H5: INTRACELLULAIR VESICULAIR TRANSPORT**

Exocytose = fusie transport vesikel met plasmamembraan (membranen zijn continu) → inhoud in extracellulaire ruimte

Endocytose = invaginatie plasmamembraan vromt vesikel → inhoud afkomstig van extracellulaire ruimte

Vesiculair transport

* = transport tussen compartimenten biosynthetische/secretorische & endocytische pathway → gemedieerd door transport vesikels → afsnoering van ene + fusie andere (cargo van lumen naar lumen)
* vesiculaire budding & fusie zijn assymmetrisch → afsnoering = eerst conctact tussen binnenlaag bilayer ↔ fusie = eerst contact tussen buitenlaag bilayer
* membraan behoudt zijn oorspronkelijke oriëntatie na fusie met ander organel
* kenmerken → zie vorig hoofdstuk
* **p279** endocytische - biosynthetische/secretorische - retrieval pathway

Probleem → vesikel met specifieke cargo moet naar specifiek compartiment → moleculaire merkers → vesiculaire diversiteit

* Vesiculaire coating = concentratie bepaalde eiwitten in vesiculair membraan → vervormt de membraan patch om een vesikel structuur te vormen (**p281**)
  + clathrine coating → plasma membraan & golgi endosoom
  + COPI coating → golgi
  + COPII → ER
* Incorporatie van adaptines wanneer zelfde coats voorkomen in verschillende locaties
  + clathrine + adaptine 1 → van golgi naar lysosoom
  + clathrine + adaptine 2 → van plamamembraan naar endosoom
* Clathrine coat
  + adaptor eiwit (specifiek voor cargo receptor) bindt clathrine  → cargo receptor herkent & incorporeert specifieke cargo moleculen → afnoering vesikel → clathrine & adaptor worden losgelaten en er ontstaat en ‘naakt’ vesikel (katalise door Hsp70 & uncoating ATPase) →**p283**
  + verschillende adaptoren bij verschillende membranen
* Retromeren → transport van endosomen naar golgi
  + belang = recyclage zure hydrolase receptoren (M6P)
  + = multi-proteine-complex dat coat vormt rond endosomale membranen wanneer het simultaan kan interageren met
    - cytoplamatische staart cargo receptor
    - gebogen fosfolipide bilayer
    - fosofo-inositide = gefosforyleerd fosfatidyl inositol lipde (PIP)
  + enkel wanneer deze 3 voorwaarden voldaan zijn wordt er een retromeer gevormd = coincidentie detector → bepaalt wanneer/waar transportvesikels gevormd worden
  + coöperatieve binding tussen retromeren
* PIP’s zijn merkers van compartiment identiteit
  + = suiker - fosfaat - inositol - vetzuur
  + nemen verschillende vormen aan naargelang hoeveelheid fosfaat binding → compartimentaliseerd door localisatie van PI kinase + PIP kinase + PIP fosfatase (verschillend in de organellen)
  + PI/PIP functioneren als moleculaire merkers dankzij vershillende samenstelling in organellen en membraandomeinen → PIP-bindende eiwitten herkennen specifieke PIP vorm door binding aan kopgroep
  + **p286-287** intra-cellulaire locatie van fosfo-inositiden
* Dynamine zorgt voor afsnoering clathrin-coated vesikels
  + herkent PIP2 & heeft GTPase domein → ankert zich vast op membraan en recruteert andere cellulaire eiwitten naar nek van afsnoering
  + recrutering lipide-modificerende enzymen → distortie bilayer & verandering lipide samenstelling
  + sommige mutanten kunnen geen vesikels afnoeren (vb. paralyse bij Drosophila → geen vrijgave neurotransmitters)
* GTPase controleert assemblage van vesikel coats
  + vorming COPII **p288**: Sar1-GDP wordt omgezet tot Sar1-GTP  & aan membraan gebonden door amfifatische helix van Sar-1 → Sec23 bindt Sar1-GTP → Sec24 bind Sec23 & cargoreceptor → sec23/24 (binnenstecoat) binden tweede coating

Vesiculaire targetting door interactie van Rab-effectoren en snares **p290**

* Tethering = Rab effector (verankelingseiwit) membraan bindt Rab-GTP-eiwit vesikel
  + sommige Rab-effectoren zijn motor eiwitten → voortstuwen vesikel op cytoskelet
* v-snare op oppervlak vesikel interageert met t-snares op oppervlak membraan → Fusie vesikel-membraan dankzij v-snare/t-snare interactie
  + fusie vereist water uitdrijving = energetisch ongunstig (vergt energie)
  + verschillende compartimenten hebben verschillende snares → bepalen specificiteit voor targetting
  + additionele controle door bepaalde Rab eiwitten → versnellen proces door dissociatie van inhibitorische eiwitten van de t-snare
* dissociatie van snare-complexen door NSF
  + geen dissociatie leidt tot ongecontroleerde & constitutieve membraan fusie
* vb. aids virus = membraan virus → gebruikt gelijkaardig mechanisme
  + glycoproteïne bind CD4 → gp bind chemokinereceptor → hiv fusie eiwit komt vrij en zort voor penetratie in membraan → waterexpulsie → fusie

Transport naar Golgi

* ER naar golgi → COPII coating
  + In ER exit sites (ribosoom vrij) herkennen COPII coat eiwitten de ext signalen van cargo receptoren (selectieve selectie)
  + lekkage van residente ER eiwitten doordat ook eiwitten zonder exit signalen in vesikels terecht komen
  + hoge concentratie aan secretorisch eiwit kunnen zonder cargo receptoren migreren
* sommige cargo receptoren zijn lectines → binden oligosacchariden
  + ERGIC53 bindt stollingsfactor VIII & V → defect leidt tot verhoogde kans op bloedingen
* slecht opgevouwen/onvolledige eiwitten blijven in ER totdat ze juist/volledig zijn → binden op chaperones (vb. calnexine & BiP blokkeert exit signaal totdat eiwit correct is)
* **p297** binding van antigenische peptides op MHC (major histocompatibility antigen complex) in ER
  + virale eiwitten worden geknipt door proteasoom = degradatie tot virale peptides → naar ER via ABC transporter → peptides binden klasse I MHC → transport naar golgi → blootgesteld aan buitenkant cel → immuunrespons (herkenning door T-cel receptoren)
* Uncoating
  + homotopische fusie = fusie membranen van hetzelfde compartiment → gemedieerd door t-snare/v-snare & Rab interacties
  + vesiculaire tubulaire cluster (VTC) migreert naar cis-golgi via microtubuli
* Retrievel pathway
  + Afsnoering vesikel van VTC & cis-golgi → COPI - coating
  + Voor retrograad transport gelekte ER eiwitten
  + ER retrievel signalen binden COPI coats = verhoging efficiëntie
    - directe COPI binding → trans-membranaire eiwitten
    - indirecte COPI binding → solubele eiwitten → KDEL receptor
  + sommige eiwitten hebben geen retrievel signalen → naar ER door toevallige opname (trage retrievel → netto voorwaarts)
  + kin recognition → residente eiwitten aggregeren (moeilijk te transporteren) waardoor ze in het compartiment blijven

Golgi apparaat

* synthese polysacchariden & glycosaminoglycanen; glycosylatie van eiwitten & lipiden (oligosacchariden als moleculaire merkers); meeste cargo in transit
* cis golgi netwerk; cisterna (cis - mediale - trans); trans golgi netwerk (TGN) → structureel & functioneel (samenstelling) verschillend
* functie = processing van oligoscaccharide (maturatie) **p303**
  + CGN → katalyse vroegere reactiestappen → sortering & fosforylatie oligosaccharide van lysosomale proteine
  + cis cisterna → afknippen mannose
  + mediale cisterna → afknippen mannose & toevoegen GlcNAc
  + trans cisterna → toevoegen Gal & NANA
  + trans → katalyse latere reactiestappen → sulfatie tyrosines & sachariden & sortering
* eiwit komt golgi binnen met enkel core regio (2GlcNAc +3man) → substraat voor glycosidaties
* alle reacties op membraan → membraangebonden enzymes → glycosidase, glycosyl tranferases (single pass multi-enzym complexen)
* O-gekoppelde glycosylatie in golgi ↔ N-gekoppelde glycosylatie in ER
* belang glycosylatie
  + verhoogde solubiliteit
  + glyco-code → markeert progressie van het opvouwen van eiwitten en medieert binding eiwitten op chaperonen & lectienne
  + suikermoleculen vormen coat → verhindert interacties met andere eiwitten
  + beschermende laag in vorm van mucus
  + suiker-lectine interactie belangrijk voor cel-cel interactie (ontwikkeling, immuunrespons, receptor activatie)
* combinatie vesiculair transport model en cisternaal maturatie model in golgi

Moleculaire identiteit compartiment bepaald door

* PIP’s
* Rab-eiwitten
* snares

Lysosomen

* zure hydrolasen → pH 5 in vesikel (geglycosyleerde membraaneiwitten als bescherming) → H+-gradiënt door ATP-afhankelijke pomp → energiebron voor transport afbraakproducten
* membraan en cytosol beschermt tegen zure hydrolases
* funtie → intracellulaire digestie = afbraak macromolecule, intra/extracellulaire debris, gefagocyteerde organismen → productie nutriënten
* maturastie-cyclus: late endosoom → endolysosoom → lysosoom
  + fusie tot enkel resistent materiaal overblijft
* **p309**: degradatie pathways → fagocytose, endocytose, autofagie
  + autofagie = degradatie dysfuncionele organellen + recuperatie bouwstenen → vb. mitochondrie (10dagen levensduur), flad ER na drug-geïnduceerde expansie, niet-selectieve digestie bij tekort aan nutriënten

Transport lysosomale eiwitten van TGN naar lysosomen

* CGN → modificatie met mannose-6-fosfaat
  + M6P wordt gekoppeld door herkennen van patch op zure hydrolase **p311** → GlcNAc fosfotransferase bindt UDP-GlcNAc en mannose gelinkte enzym  → afgifte UMP → GlcNAc afsplitsen → gefosforyleerd lysosomaal enzym
* TGN → M6P receptoren die M6P adaptor eiwitten binden tijdens vorming clathrine-gecoate vesikels
* Early endosome → zure pH → P wordt verwijdert (terugkeer naar golgi niet meer mogelijk) & dissociatie van receptor
  + M6P eiwitten die gesecreteerd zijn kunnen via plasmamembraan terug getransporteerd worden via endosomen naar lysosomen
* Genetisch defect in lysosomaal hydrolase → lysosomale stapelings ziekte
  + opstapeling niet-verteerde substraten in lysosomen door ontbreken van specifiek hydrolase (vb. Hurler syndroom)
  + meestal door defect in GlcNAc-fosfotransferase (I-cell disease = inclusion-cell disease) → geen fosforylatie → geen M6P → geen normale sortering → secretie i.p.v. transport
* Ook andere sorting pathways van TGN naar endosomen → vb. lysosomale secretie niet-verteerde productie
* Sommige celtypes hebben gespecialiseerde lysosomale secretie pathway → melanocyt bevat melanosoom (=gespecialyseerd lysosoom)
  + secretie pigment (exocytose) → opname door keratinocyten (huidpigmentatie)
  + defecti melanosoom → hypo-pygmentatie

Endocytose

* invaginatie plamamembraan → vesikel met inhoud uit extracellulaire ruimte → transport naar lysosomen
* Vorming van clathrine coated pits & vesikels vanaf plasmamembraan (ook opname van fluid phase = extracellulaire vloeistof)
* fagocytose = ingestie grote partikels (micro-organismen, dode cellen) → fagosomen (>250nm)
  + vereist activatie → receptor-ligand binding → inductie fagocytische respons via signaaltransductie
    - antilichaam binding op Fc-receptoren
    - complement binding op complement receptoren
    - lectines die oligosachariden van micro-organismen herkennen
    - receptoren apoptotische cellen → apoptotische cellen verliezen assymmetrisch plasmamembraan (binnenste-buiten) → receptoren herkennen cytosolische zijde (↔ levende cellen binden inhiberende receptoren die tyrosine fosfatase recruteren = blok fagocytose)
  + pseudopodale extensie & fagosoom vorming → vereist ThoGTPase → actievatie PI3 → PI wordt PIP2 & PIP3 → actine polymerisatie/depolymerisatie → invaginatie/fagocytose (**p287**)
* pinocytose = ingestie vloeistoffen/opgeloste substanties → pinocytotische vesikels (100nm)
  + constitutief proces
  + internalisatie membraan componenten (vb. plamamembraan wordt geëndocyteerd door macrofaag) → compensatie = recyclage door exocytose
  + niet allemaal met clathrine gecoat → caveola opgebouwd uit caveoline hebben membraan micro-domeinen = lipid rafts (geen cytosolische coat) → afsnoering door dynamine → caveosoom (endosoom-achtig) → ontwijking endosomen & lysosomen (vb. papilloma virussen)
* meestal pinocytose bij eukaryoten → fagocytose deoor gespecialiseerde cellen (macrofagen, neutrofielen = fagocyten)
* Endocytische pathway = endocytisch vesikel → fusie met lysosoom → intracellulaire degradatie inhoud → residual bodies = niet-verteerde substanties → excretie door exocytose
* Selectieve import via receptor-gemedieerde endocytose
  + ligand binding op trans-membranaire membraan-eiwitten → accumulatie coated pits
  + mechanisme om concentratie liganden te verhogen → efficiëntere opname
  + receptoren ondergaan ubiquitinylatie → mono/multi (geen poly)
  + enkelvoudige ubiquitine-residus markeren receptoren voor targeting naar clathrin-coated pits
  + vb. cholesterol opname → LDL bind opt LDL-R → expressie verhoogt wanneer er nood is (migratie naar coated pits + internalisatie LDL-R) → lage pH in endosoom maakt LDL vrij → vrij cholesterol door hydrolyse in lysosoom **p322**
    - wanneer er geen opname is stijgt de concenratie in het bloed → atherosclerotische plaques → bloedvatvernauwing/hartinfarct
    - LDL-R defecten → geen LDL-R; defecte extracellulaire binding; defecte internalisatie (verhindering interactie met coated pit) → heterozygoten hebben verhoogd risico → homozygoten hebben hoge mortaliteit
    - LDL-R wordt gerecyleerd **p325**: fusie met endosoom (na ont-coating) → vorming recycling endosoom = fusie vesikels met receptoren → fusie met plamamembraan
* pH vroege endosmen > pH late endosomen → geen optmale activatie hydrolases
  + verschillende eiwit-samenstelling + hydrolasas als inactieve pro-enzymen → activatie wanneer late endosomen converteren in endolysosomen na fusie met lysosomen → lagere pH → activatie lysosomale hydrolases
  + vroeg endosoom = sorteer-station endocytische pathway
* receptoren → recyclage (vb. receptor transferinne, LDL), trancytose (transport van basaal naar apicaal) of degradatie (vb. opioide receptor) **p324**
  + TfR (transferrine receptor) → vindt ijzer via transferrine → conformationele wijziging in zure pH (endosomen) → vrij Fe2+ + apo-transferrine (blijft op receptor) → recyclage naar plasmamembraan → receptor in membraan & apo-Tf in EXM
  + Opiode receptoren (voor morfine, heroine, endorfine) → degradagtie in endosomen → receptor down regulation (minder expressie op plasmamembraan) → desensitisatie
  + Transcytose vb. opname antilichamen via moedermelk → passieve opname via Fc-receptoren (dissoieren bij pH 7) **p328**
  + recycling endosoom → regulatie exit van membraan eiwitten **p329** → signaal leidt tot aanpassing hoeveelheid receptoren op het plasmamembraan
* Vesikels bewegen langs microtubuli → fusie vormt multivesiculair body (→ endosoom)
  + **p327** proces van invaginatie is voordeliger dan geen invaginatie
* Epitheel celen hebben 2 verschillend eendosomale compartimenten → basolateraal vroeg endosoom + apicaal vroeg endosoom
  + recyclage geëndocyteerde receptoren naar respectievelijke membraan (behalve bij transcytose
  + geen trancytose of recyclage → gemeenschappelijk compartiment

Exocytose

* fusie transportvesikel met plasmamembraan (continue membranen) → inhoud in extracellulaire ruimte
* eiwitsortering in TGN
  + (naar lysosomen via M6P signaal)
  + constitutieve secretie → geen selectieve signalen → default patway
  + signaal gemedieerde secretie → gereguleerde secretie met niet-gepolariseerde cellen
    - leidt tot vergroting plasmamembraan
* secretorische vesikels → rijping via immatuur vesikel naar matuur vesikel = aggregatie/condensatie (verlaging pH) → ook retrievel pathway voor recyclage
* eiwitten ondergaan proteolytische processing tijdens vorming secretorische vesikels
  + pre-pro-proteine → pro-proteine → matuur proteine (via post-translationele modificaties)
  + fysiologische relevantie → inactief houden hydrolases die anders cel verteren
* vorming synaptische vesikels (neuronen, endocriene cellen) **p335** →
  + afsnoering van TGN met carrier eiwit + exocytose membraan
  + lokale recyclage (omdat enkel van TGN te weinig is) → endocytose vormt direct nieuwe vesikels OF endosytose levert componenten → endosoom → vesikels ontstaat uit endosoom → vesikel wordt opgeladen met neurotransmitters → secretie van neurotransmitter door exocytose
  + protonenpomp zorgt voor hogere H+ concentratie in vesikel & H+ uit vesikel door ruil met glutamaat → opladen met glutamaat

**H6: ENERGIE CONVERSIE: MITOCHONDRIEN**

Mitochondrie = matrix + binnen-membraan + buiten-membraan + inter-membranaire ruimte

* Matrix → enzymen voor oxidatie pyruvaat/vetzuren & Krebscyclus; mitochondriaal DNA/ribosomen/tRNA …
* Binnen-membraan → oppervlakte vergroting via cristae; eiwitten elektronentransportketen; ATP synthase; transport-eiwitten import/export uit matrix; impermeabel voor ionen (cardiolipine); essentieel voor elektronische H+-gradiënt
* Buiten-membraan → porine; doorlaatbaar voor <5000Da; enzymen voor mitochondriale lipide synthese & fusie/fissie van mitochondriën; import receptoren
* Inter-membranaire ruimte → fosforylatie nucleotiden
* Beweeglijk/plastisch + geassocieerd met microtubuli → fusie & fissie
  + in functie van noden van cel
  + replicatie mt-genoom niet synchroon met nucleaire DNA synthese → mtDNA repliceert de hele celcyclus
* Gelokaliseerd waar hoog energie-verbruik is (vb. hartspier, flagelair axonem (spermacel)
* Biochemische fractionatie
  + lage osmolariteit (water influx) → barsten buitenste membraan → centrifugatie = inter-membranaire ruimte + rest (krimpen door in hoge osmolariteit)
  + densiteitscentrifugatie → buiten-membraan + rest
  + disruptie+centrifugate → binnen-membraan + matrix

Energie-conversie door chemi-osmotische koppeling

* Schakeling tussen vorming chemische verbindingen om ATP te generen & membraan-transport processen
  + energie van elektronentransfer → creeëren H+-gradiënt
  + energie H+-gradiënt → ATP synthese/actief membraan trasnport/ flagellaire rotatie
* Energie uit zonlicht/voeding wordt omgezet in hoge energie elektronen → elektronen transport van hoge naar lage energie toestand  → H+-gradiënt (3 pompen nodig)
  + citroenzuurcyclus → vrijgave elektronen via NADH (+CO2)→ H+ pomp → H+ pomp → H+ pomp → elektronen transfer op O2 → H2O
  + CO2 & H2O zijn afbraakproducten
  + Krebs & glycolyse generen elektrondonoren → NADH/FADH2 → NADH heeft 2 hoge energie elektronen → H+ + 2e- + NAD+ → **p346!**
  + Elektrontransfer leidt tot energie-conversie → H+-gradiënt (∆pH) mogelijk door membraanpotentiaal (∆V) → opslag energie als elektrochemische H+-gradiënt
  + H+-gradiënt levert ook energie voor transport geladen moleculen & aandrijven flagel (bacteriën) (**p350**)
    - ATP-ADP co-transporter → uitwisseling ATP/ADP waarbij ATP naar buiten en ADP naar binnen wordt gepompt
* Oxidatieve fosforylatie = netto energie conversie
  + NADH + ADP + Pi + ½ O2 → NAD+ + H2O + ATP
  + minder elektron-donor & meer elektron-acceptor
  + respiratorische eiwit complexen transfereren elektronen + e-/H+ aan O2 gebonden + niet gestokeerde energie als warmte ↔ verbranding (explosieve warmte)
  + ATPsynthese via ATPsynthase (structuur **p348**) → kan ook andersom  = ATP hydrolyse om H+-gradiënt op te bouwen (vb. in lysosomen)
  + meeste ATP aangemaakt in mitochondriën (28 ATP) → efficiënter dan glycolyse in cytosol (2 ATP)
* Elektrontransport
  + **p352**: e- (oxidator) reduceert elektroncarrier → elektroncarrier (reductor) donneert e- = oxidatie
  + aaneenschakeling e--doneren & accpetoren → e--transport gekoppeld aan H+-transport
* Elektronen transport vergt specifieke e--transport eiwitten in binnen-membraan → sequentiële redox reacties → 3 membraancomplexen + 2 mobiele carriers → elk complex heeft grotere affiniteit voor e- dan vorige
  + reductie NADH → NADH dehydrogenase complex → ubiquinone → cytochroom b-c1 complex → cytochroom c → cytochrome oxidase complex → 2H+ + ½ O2 = H2O
    - cytochroom oxidase → inhibitie door cyanyde
    - zuurstof is ultieme oxidator (acceptor) & NADH is ultime reductor (donor)
  + transfer elektronen leidt tot conformationele verandering complexen → mogelijk om H+ te pompen (**p357**)
    - opname H+ = energetisch gunstig (naar lagere energie toestand) → pompen H+ = energie nodig (afkomstig van e--transport) → cyclus
  + transport e- vergt ijzerhoudende groepen  → Fe3+ wordt gereduceert tot Fe2+ door e--transfer
    - heem-groep in cytocroom, Fe-S-eiwitten
* Superoxide O2-  inactivatie
  + blijft gebonden aan cytochrrom oxidase totdat 4 e- gebonden zijn → protonatie → H2O
  + onstappen vrije e- is zeldzaam (1O2- per 2000 transfers) → reducering dor mitochondriaad superoxide dusmutase → mitochondriaal catalase of mitochondriaal glutathione reductase
    - O2- + O2- + 2H+ → H2O2 + O2
    - H2O2 + H2O2 → 2H2O + O2
    - H2O2 + 2GSH → 2H2O + GSSG

Functies mitochondriën

* ATP-synthese
  + gebruik aminozuren bij starvatie (vb. suiker tekort)
* overmaat NADH uit cytosol verwijderen bij cellen die glycolyse gebruiken voor snelle ATP productie
* Bij overmaat aan nutriënten → synthese vetzuren & sterolen + NADPH naar cytosol als reductor voor biosynthese
* Apoptose **p358**
  + afgeven cytochroom c in cytosol → activatie Apaf1 & hydrolyse ATP → vorming apoptosoom samen met caspase recrutment domein (CARD) → CARD trekt CARD domein aan met procaspase  gebonden → activatie caspase → apoptose
  + cel keert binnenste buiten → cystolische kant (met fosfatidylserine) langs buiten → herkenning voor vertering door macrofaag

Eigenschappen

* Eigen circulair genoom → mt-eiwitten toch vooral door kerngenoom gecodeerd
  + endosymbiose hypothese → transfer van mt-genen naar nucleair genoom → nucleaire genen voor mt-eiwiten zijn homoloog aan bacteriële genen
  + mtDNA → geen histonen; geen introns; ≈ prokaryoten; organisatie als cluster (nucleoide); beperkt aantal genen; eigen genetische code (verschilt tussen soorten); minder tRNA; 2 strengen coderen voor eigen RNA (daarn post-transcriptioneel geknipt)
  + eiwitsynthe **p361** → polycystronische transcript (1 lange RNA streng van circulair DNA) wordt pas na transcriptie geknipt
* Mitotische segregatie na samensmelting **p361** → dochtercel erft mutant of wild-type mt-DNA (50-50 kans) → niet-Mendeliaanse overerving = cytoplasmatische overerving
  + mens → zygote heeft 2000 kopieën van moeder en 1-2 van vader
  + mitochondriale ziektes → defect gen in mtDNA van moeder → vooral effect op cellen die veel energie vergen (spiercel, hersencel → vb. myoclonische epilepsie) → variabele fenotypes in functie van aantal defectieve mitochondriën

**H7: CYTOSKELET**

Functies

* ontwikkeling & behoud celvorm
* intracelleulair transport (chromosomen, vesikels, organellen)
* mechanische weerstand
* celbeweging → ciliën & flagellen
* celdeling
* cel-cel en cel-matrex adhesie

Onderdelen

* Intermediaire filamenten → mechanische sterkte & ontwikkeling/behoud celvorm & cel-cel/cel-matrix adhesie
  + niet rigide & niet stijf; touwachtig; 10nm diameter; heterogene eiwitfamilie; nucleaire lamina door specifiek intermediair filament; mechanische weerstand in cytoplasma
* Microtubuli → positie intracellulaire organellen & intracellulair transport
  + holle cylinders; tubuline; 25nm diameter; niet-flexivel; meestal recht; organisatie vanuit centrosoom (MTOC = microtubule-organazing center)
  + vorming cilia & flagella; axonaal transport
* Actine filamenten (micro-filamenten) → celvorm (versterking plasmamembraan) & beweging & contractiele ring tijdens celdeling
  + 2 strengen helicaal verwoven; flexibel; 5-9nm diameter; lineaire bundels; overal maar veel in cortex (juist onder plasmamembraan)
  + membraanprojectes → lamellipodie, filopodia, stereocilia, microvilli
  + celmotiliteit - celmigratie - celcontractie - cel-cel/cel-matrix adhesie - cytokinese

Cytoskeletale elementen zijn dynamisch & adapteerbaar

* voortbeweging → polarisatie actine & ondersteunign microtubuli
* celdeling → bipolaire spoelfiguur & alignering chromosomen door microtubuli + contractiele actine ring (onderstuend door microtubulie vanuit MTOC
* vorming dens actine netwerk door polymerisatie aan voorzijde cel

Belang voor vorming stabiele structuren

* protrusies (microvilli) in epitheel → haarcellen & oor (sterocillia)
* **p369** → structuren zijn stabiel, maar toch turn-over van de filamenten → belang behoudt polariteit cel (apicaal/lateraal/basaal)
* desmosoom → contact met buurcel → intermediaire filamenten verbinden desmosomen
* adherens junction → actine

Cytoskeletale filamenten zijn opgebouwd uit individuele eiwit eenheden

* oplosbare subeenheden → snelle diffusie → snelle structurele reorganisatie door op/afbouwen van filamenten
  + vb. aantrekking door stimulus → polymerisate in richting van stimulus + afbouw aan andere kant
* **p371**: proto-filamenten = lange cytoskeletale polymeerketens → laterale/longituniale interacties → vergroting thermo-stabiliteit
* polymerisatie snel, maar beperk tot uiteinde van filamenten → niet-covalente/hydrofobe interacties
* **p371**: Nucleatie = snelheidsbepalende stap in vorming polymeer
  + korte polymeren zijn onstabiel door beperkt aantal inter-subeenheid interacties
  + nucleus (aggregaat) gevormd door meerde inter-subeenheid interacties
  + nucleus vorming vergt tijd → controle beïnvloedt beweging en vorm cel
    - concentratie vrije subeenheden bij evenwicht = snelheid van subeenheid additie/dissociatie

Microtubuli

* = α-tubuline bindt GTP + β-tubuline bindt GTP of GDP
* Polariteit → verschillende uiteindes (ofwel α-tubuline ofwel β-tubuline) → additie/dissociatie enkel aan uiteinde → sneller aan ‘+’zijde dan aan ‘-’zijde
* **p373**: β-tubuline komt voor in T-vorm (GTP gebonden) & D-vorm (GDP gebonden) → polymerisatie wordt gevolgd door hydrolyse → hydrolyse aan ‘-’ zijde = D-vorm & geen hydrolyse aan ‘+’ zijde = T-vorm
  + snelle additie aan ‘+’ zijde omdat er nog geen hydrolyse is gebeurd & trage additie aan ‘-’ zijde omdat er wel al hydrolyse is gebeurd
  + bij evenwicht (geen groei) → treadmilling (tussen kritische concentratie van T & D tubuline) = lengte blijft zelfde, maar voortbeweging
  + zelfde principe voor actine maar met ATP i.p.v. GTP
* Dynamische instabiliteit = snelle interconversie tussen groei & regressie
  + uiteinde (cap) kan verlorgen gaan → enkel D-vorm → volledige inkrimping (hydrolyse sneller dan additie) → restabilisatie door herwinning van GTP-cap (terug groei)
  + **p375**: GDP configutratie vertoont een kromming → snellere afbraak
  + controle door eiwitten die op cap binden
    - stabilisatie door MAP → groei
    - destabilisatie door catastrofe factoren (vb. kinesine 13) → afbraak
* Initiatie vorming microtubuli → γ-tubuline vormt een γ-tubuline ring complex (γ-TuRC) → zorgt voor nucleatie microtubuli in MTOC
* MTOC (centrosoom)
  + centriolen → ondergaan duplicatie tijdens celdeling
  + dicht bij nucleus → centrale positionering na interactie microtubuli met membranaire organllen → hulp voor juiste positionering organellen in de cel
    - bewijs → **p379** stukje cel afsplitsen → nieuw centrosoom ontstaat
  + centrosoom zoekt centrum van de cel → doordat filamenten langs alle kanten tegen de wanden duwen → duwen centrosoom naar midden
  + centriool = gespecialiseerd microtubuli in centrosoommatrix
* Essentiële aspecten i.v.m. celdeling **p383**
  + Profase → microtubili gaan uit elkaar & centrosoom naar tegenovergestelde pool
  + Prometafase → centrosoom in tegenovergestelde pool + microtubili binden aan kinetochoor op chromosoom
  + Metafase → alliniering chromosomen in equatoriaal vlak
  + Anafase → microtubuli trekken chromatiden uit elkaar & microtubuli die geen kinetochoor binden worden langer (duwen elkaar weg)
  + Telofase → seggregatie chromosomen tegen centrosoom aan (kernmembraan vormt zich) + start opbouw conatractiele actine ring
  + Cytokinese → contractiele actine ring splitst cellen af
* Motoreiwitten → dynamische eiwitten
  + kinesine (+ATP hydrolyse) → beweging langs microtubuli (stap per stap)
  + taxol (van taxus plant) → bind microtubuli → stabilisatie
    - anti-kanker → maar ook andere delende cellen worden gestabiliseerd & stilgelegd (nadeel)
* Ciliën en flagellen
  + = motiele uitloper bedekt met celmembraan & kern van sterk georganiseerd microtubuli
  + cilia → 2-10μm, meerdere per cel (vb. bronchiaal epitheel, eileiders)
  + flagel → tot 100μm, 1 per cel (vb. spermatozoa)
  + microtubuli die axonema vormen ontspringen uit perifere centriolen
  + doorsnede **p389** → 9 doublet + 2 singlet structuur → koppeling via nexine brug + binding dyneine aan elk doublet & singleten omgeven door schede
  + dyneine (motor-eiwit) → dyneine bind microtubuli doubletten → +ATP = schuiven/plooien naargelang aanwezigheid linker-proteine
    - Kartagener syndroom  onbeweeglijke ciliën
    - ontbreken dyneine in ciliën & flagellen → onbeweeglijke spermatozoiden (mannelijke onvruchtbaarheid) & chronische respiratorische infecties

Actine filamenten

* helix van 2 parallele proto-filamenten; polariteit (‘+’/’-’ zijde) → snellere polymerisatie aan ‘+’ zijde; flexibeler dan microtubuli; sterk geconserveerd → α-isovormen bij spieren & β/γ-isovormen bij niet-spieren;stabilisatie door cross-linking en accessorische eiwitten
* 6 actine isovormen → universeel of cel-specifiek
* kunnen verschillende organisatie vormen aannemen
  + parakristallijne array met dikkere myosine filmenten
  + microfilamenten onder celmembraan = celcortex → endocytose, exocytose, celmigratie
  + contractiele ring tijdens cytokinese
  + stress fibers
* Myosine (motor-eiwit) → beweegt langs actine filament met ATP hydrolyse (**filmpje les 14 1:19**)
  + voortbeweging cel **p393** → actine polymerisatie aan ‘+’ zijde zorgt voor portrusie → cel kruipt verder
  + focale contacten (integrines) zorgen dat cel op substraat vastblijft
  + contractie aan einde cel door myosine
* Myofibrillen in skeletspieren **p393-394**
  + spiercontractie → myosine interageerd met actine
  + myosine via titine (veerachtig) aan Z disc gebonden
  + tropomoduline bindt op einde van actine
* Palloidine (in paddenstoelen)→ bindt en stabiliseert actine filamenten → abnormaal functioneren cellen (vb. geen spiercontractie meer mogelijk)

Intermediaire filamenten **p396**

* α-helix coiled coil ≈ koordachtig; geen structurele polariteit; niet in alle celtypes; (de)polarysatie gecontroleerd dor fosforylatie
* gestaggerde conformatie → elk filament wat verschoven t.o.v. een ander → sterke & flexibele structuur
* geëvolueerd uit nucleaire lamine
* vb. keratine (in epitheel)
* interactie met desmosomen (cel-cel contact) of hemi-desmosmen (cel-matrix contact)
* medische relevantie → keratine mutaties → epidermolysis bullosa = disruptie keratine filamenten → cellen scheuren los → pijnlijke blaren op huid
* neurofilamenten → axonen (NF-L, NF,M, NF,H)
  + medische relevantie → accumulatie & abnormale assemblage NF → amyotrofe laterale sclerose (ALS) → degeneratie axonen → spierzwakte & mortaliteit
  + over-expressie NF-L of NF-M in muizen → ALS-achtig ziektebeeld