

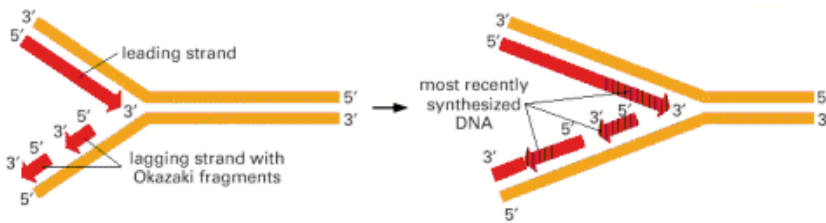
Noter- Biokemi 2. semester



Noter- Biokemi 2. semester	1
DNA Replikation	4
Proof-reading mekanismer (i kronologisk orden).....	4
Proteiner der indgår i Replikations-gaffel.....	4
Mærkning af nydannet DNA	5
DNA Topoisomeraser	5
Initiering og færdiggørelse af DNA-replikation	6
DNA-Repair	6
Celler kan respondere hensigtsmæssigt på miljøændringer	7
Fra DNA til RNA (transkription).....	8
Transkriptionsinitiering i PROKARYOTER.....	8
Transkriptionsinitiering i EUKARYOTER	8
Kobling af transkriptionselongering og RNA-processing i Eukaryoter	10
Capping	10
Splicing	10
Poly-A hale	11
Maturt eukaryotisk mRNA	11
Non-coding RNA	11
Kontrol af Gen-ekspression	11
Genregulering, RNA syntese og processing	12
Lidt Terminologi.....	12
Transkriptions-regulering i Eukaryoter.....	12
Translation (Proteinsyntese)	13
tRNA	13
Ribosom	13
Elongeringsfaktorer.....	13
Proteinsyntese initiering.....	13
Terminering af translation.....	14
Forskellige former for antibiotikas indvirkning.....	15
Foldning af proteiner:.....	16
Nedbrydning af proteiner	16
Membranstruktur.....	17
Membraner i dyreceller.....	17
• Forskel på membraner i Pro og Eu	17
• Glykolipider	18
Celle-signalerig	19
Cellesignalerig kan foregå på følgende måder.....	19
Celleoverflade receptorer	21
G-protein koblede receptorer	21
G _s -protein, cAMP og PKA pathway:	23
G _q -protein, phospholipase C pathway:	24
Calcium som en second messenger.....	25
G-proteiner kan direkte regulere ion-kanaler.....	25
Enzym-koblede receptorer	25
Receptor Tyrosin Kinase (en af 6 typer af enzym koblede receptorer)	26
RAS-protein	26
PI-3 kinase pathway	28

Oversigt over signaleringsveje aktiveret gennem G-protein koblede receptorer og Receptor Tyrosin Kinaser.....	28
Cellecyklus.....	29
Komponenter i kontrol af cellecyklus.....	29
Intracellulær kontrol af cellecyklus:	30
Initiering af S-fase.....	30
Initiering af M-fase	30
M-fase	31
G1-fasen.....	32
DNA-damage checkpoints	33
Apoptose:	33
Kontrol af cellevækst, deling og apoptose.....	34
Proto-oncogener & Tumor supressor gener:.....	35

DNA Replikation



Figur 1 Leading strand syntetiseres lidt hurtigere end lagging strand, da template for lagging skal frigøres først til dannelse af Okazaki-fragmenter.

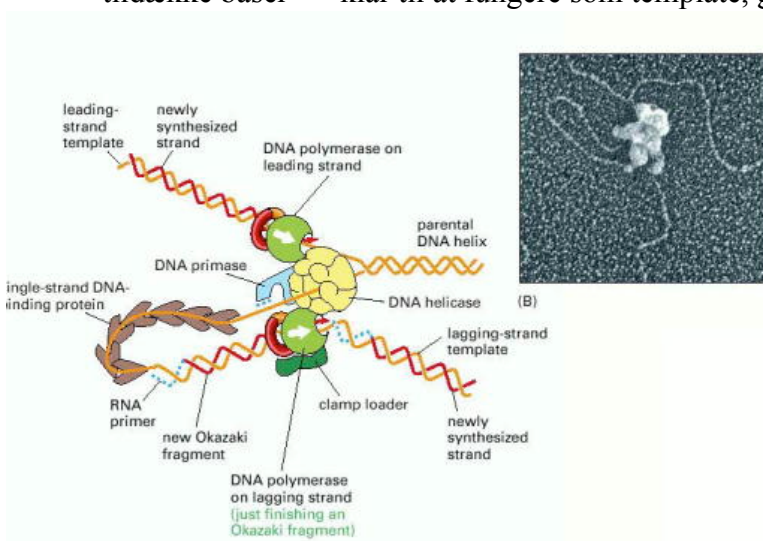
- Okazaki-fragmenter i prokaryoter: 1000-2000 nukleotider, i eukaryoter: 100-200 nukleotider.
- Ved 5'-3' polymerisering medbringer nukleosid trifosfatet selv energien til at blive hæftet på den voksende streng, mens ved 3'-5' polymerisering sidder energien på det sidst påsatte nukleosid trifosfat.

Proof-reading mekanismer (i kronologisk orden):

- Korrekt nukleotid har højere affinitet pga. baseparring for DNA polymerase
- DNA-polymerase skal undergå konformationsændring før kovalent binding af nukleotid finder sted >> forkert nukleotid vil dissociere
- 3'-5' proof-reading exonuclease (v. uparret 3'-OH ende på primer)

Proteiner der indgår i Replikations-gaffel:

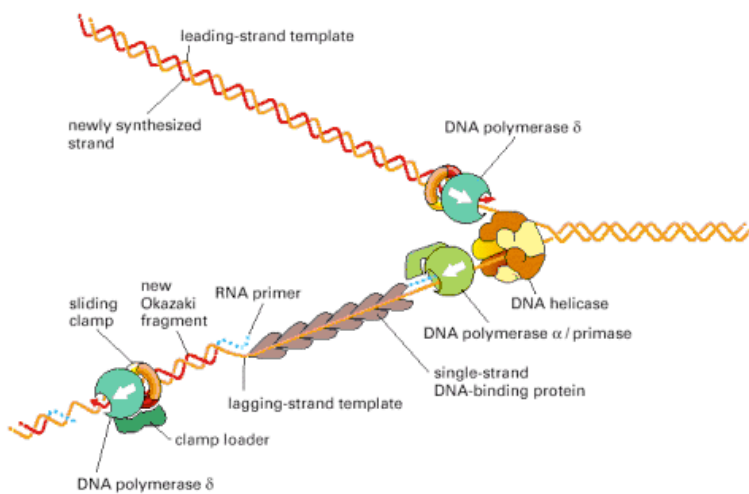
- DNA-Primase: Danner RNA primere ud fra nukleosid trifosfater på lagging strand (i euk- cirka 10 nukleotider lange per 100-200 nukleotid). Når DNA-polymerase når forrige RNA- primer udskiftes denne med DNA, og **DNA-ligase** limer DNA-stykker sammen.
- **DNA-helicase**; spalter dobbeltstrengt DNA under forbrug af ATP- op til 1000 nukleotid-par pr. sekund. **Single-strand binding proteins**; Binder til enkeltstrengt DNA, uden at tildække baser >> klar til at fungere som template, glatter desuden også enkeltstrengen ud >> % hairpins.



Figur 2 Replikationsgaffel hos prokaryoter. DNA-primase og helicase danner tilsammen et primosom. På lagging strand, bliver Okazaki-fragmenter først sat sammen af ligase der opererer efter gafflen.

- **Clamp + Clamploader**;
Binder DNA-polymerase

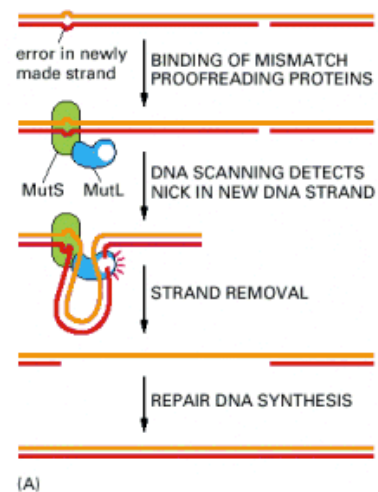
under ATP forbrug til enkeltstreng >> sørger for at denne ikke dissocierer (let dissociering er nødvendig ifbm. Syntese af Okazaki-fragmenter).



Figur 3 Replikationsgaffel hos pattedyr; Adskiller sig primært på 2 områder fra den prokaryote- 1) Der findes 2 DNA-polymeraser på lagging strand, 2) DNA-primase er en subunit af en af lagging strand DNA-polymeraserne (alfa polymerasen). alfa-polymerase begynder Okazaki-fragment på lagging strand med RNA-primær + kort DNA-stykker. Herefter overtager delta-polymerase færdiggørelse af Okazaki-fragment. Primosom mangler hos euk. ifht. hos prokaryoter.

Mærkning af nydannet DNA (især vigtigt ifbm Strand direct mismatch repair):

- Hos prokaryoter methyleres A'er i GATC sekvenser. Methylering finder dog først sted nogen tid efter syntese >> nydannet streng er IKKE methyleret
- Hos eukaryoter- Nydannet DNA "nickes" >> genkendelse for mismatch repair.



Figur 4 Strand-direct mismatch i eukaryoter; Samme mekanisme i prokaryoter, men ekstra protein (Muth) "nicker" umethylerede GATC sekvenser >> starter samme proces som vist

DNA Topoisomeraser:

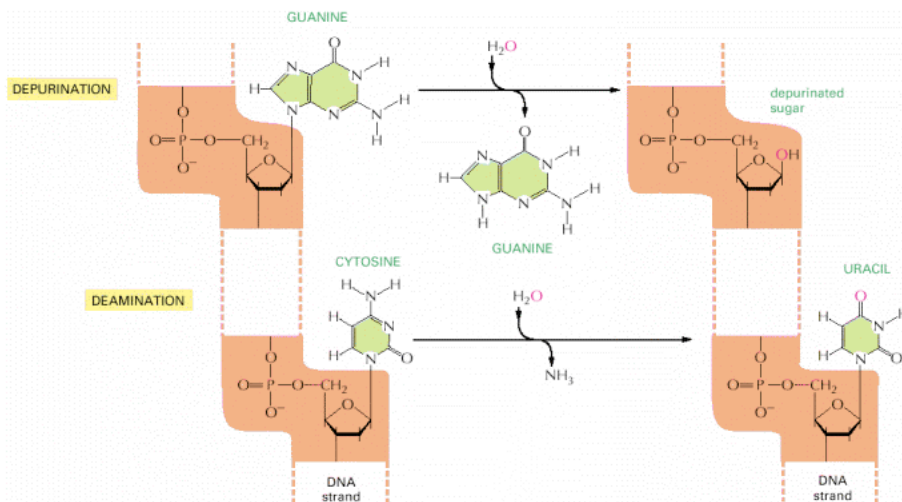
- Afhjælper "the winding problem" ved DNA-replikation.
- Bryder en fosfordiester binding i DNA-backbone >> tillader fri rotation (reversibel proces da binding gendannes når topoisomerase forlader DNA-backbone).
- Topoisomerase I; Bryder enkelt binding (binder kovalent) >> rotation af kort helix-længde lige foran replikationsgaffel.
- Topoisomerase II; Bryder binding på begge strenge >> kortvarigt dobbelt-strand break. Nødvendig ex. når 2 dobbelthelix'er krydser hinanden. Forbruger ATP

Initiering og færdiggørelse af DNA-replikation:

- Replikationsorigin = Sted hvor DNA-helix åbnes først. I simple celler; Replikationsorigin er specificeret ved base-sekvenser af flere 100 basers længde. Desuden er origins rige på A-T basepar (2 H-bindinger) der holdes sammen af færre hydrogenbindinger end C-G (3 stks).
- **Bakterie-kromosom** har 1 enkelt replikationsorigin (og dermed dannes initialt i replikation 2 replikationsgaffler). Replikation reguleres nøje, både af initiatorproteiners interaktion med replikationsorigin, samt af refraktær-periode efter færdigend replikation hvor A'er methyleres før næste replikation kan finde sted. Replikationshastighed pr. "gaffel" = 500-1000 nukleotider pr. sek.
- **Eukaryot kromosom** inderholder multiple replikationsorigin, replikationshastighed pr. "gaffel" = ca. 50 pr. sek. (kan skyldes at DNA er pakket i kromatin i eukaryoter). Replikationsorigins er samlet i replikationsenheder (op til 80 origins samlet). Replikationsenheder aktiveres på forskellige tidspunkter i celle cyklus.

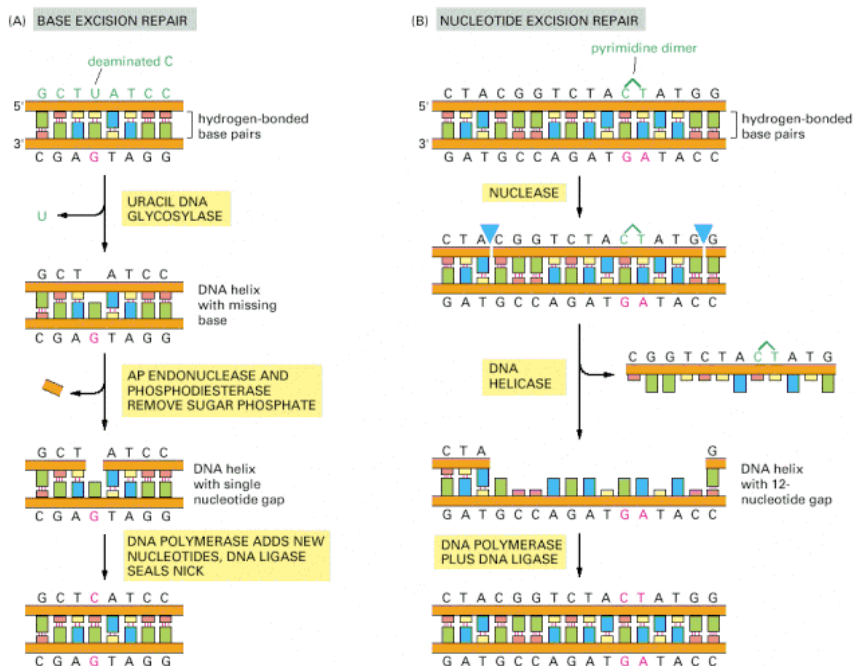
DNA-Repair

- DNA ændringer kan ske som følge af eksponering til ex varme, kemiske stoffer eller radioaktivitet >> DNA repair systemer retter disse fejl (kun 1 ud af 1000 baseændringer fører til egentlig mutation).



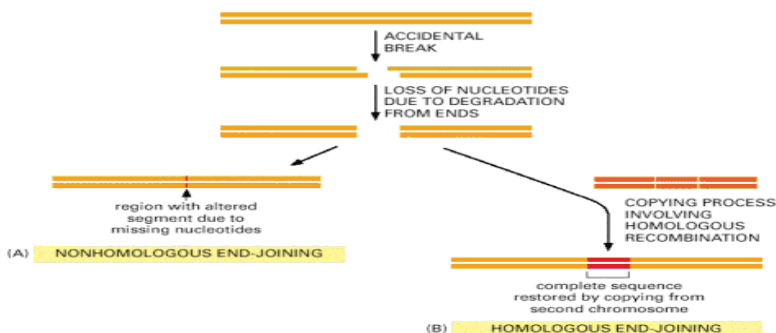
Figur 5 Depurination og deaminering er de 2 mest hyppige spontane reaktioner der gør skade på DNA (Puriner = Guanin og Adenin, purin = nitrogenholdig base).

- Fejl i DNA-streng rettes normalt ud fra komplementær strengen.



Figur 6 De 2 største DNA repair pathways- base excision og nukleotid excision repair: Ved base repair scanner glycosylaser DNA-streng for "base-flipping" (forkerte baser flippes ud af den normale DNA struktur), herefter skæres der med AP endonuclease i fosfatbackbone, fosfordiesterase fjerner fosfat og DNA polymerase + ligase påsætter nyt korrekt nukleotid. \ \ Ved nukleotid excision (større fejl i DNA ex. thymin dimere) scannes DNA for uregelmæssigheder >> nuclease klipper på begge sider af fejl, og

dette oligonukleotid fjernes af en helicase. Til slut gendannes DNA streng af polymerase og ligase limer sammen.



Figur 7 Non-homolog end-joining ses ofte i pattedyr, mens homolog oftere ses hos simple arter (gær, bakterier etc...). Enkelte baser går tabt ved non-homolog (ikke så vigtig da kun lille del af humane genom er protein-kodende. Homolog end joining kræver tilstedeværelse af specifikke rekombinationsproteiner der

genkender matchende base-sekvenser i tvilling-kromosomer.

Celler kan respondere hensigtsmæssigt på miljøændringer:

- Høj temperatur i celle-miljø >> heat-shock respons >> syntese af heat-shock proteiner >> stabiliserer og reparerer delvist denaturerede celle-proteiner.
- Fejl i DNA der hæmmer replikation >> SOS Respons gener induceres. Protein produkt fra disse har 2 virkninger: 1) Hæver rate for celle-overlevelse (v. øget DNA-repair system aktivering) 2) Hæver mutationsraten, grundet "low-fidelity" DNA polymeraser aktiveres. Disse kan genkende specifikke fejl i DNA og rette disse til oprindelig base-sekvens (altså ud fra fejlen). Disse er dog skadelige hvis de skulle replikere et helt genom.
- Aktivering af SOS-respons virker hæmmende på progression af celle cyklus før DNA-repair er færdig.

Fra DNA til RNA (transkription)

Grundlæggende forskelle på RNA-polymerase og DNA-polymerase:

- RNA-polym. bruger nukleosid trifosfater som byggesten, samt kan starte RNA-streng uden brug af primer (det er ikke essentielt at der IKKE laves fejl i transkription, modsat replikation der videregives til kommende celle-generationer).
- RNA-polym. har også begrænset proof-reading system; kan "bakke tilbage" og fjerne forkert påsatte nukleotider. RNA-polym. er længere tid om at inkorporere forkerte baser >> favoriserer excision af forkert base frem for rigtige.

Det meste anvendte DNA koder for proteiner (og danner altså mRNA der translateres), men RNA kan også selv være slutprodukt og fungere som enzymatiske og strukturelle komponenter (ex. ved telomerase).

Transkriptionsinitiering i PROKARYOTER (kun 1 enkelt RNA-polymerase i pro.):

- Sigma-faktor binder til RNA-polym. og søger efter PROMOTOR-sekvens på DNA. Når denne er fundet, og de første ca. 10 nukleotider er sat sammen i RNA dissocierer Sigma-factor fra polymerasen.
- Når RNA-polym. når TERMINATOR-sekvens dissocierer RNA-streng fra polymerasen, og denne forlader DNA-strengen og binder til ny sigma-factor andensteds >> ny transkription.
- Bakterier har normalt kun 1 enkelt promotor-sekvens >> denne bestemmer retning og valg af template-streng. Både promotor og terminator-sekvenser i prokaryoter er konsensus-sekvenser (gør det muligt at regulere hvor tæt og ofte RNA-polym. binder til specifik promotor).

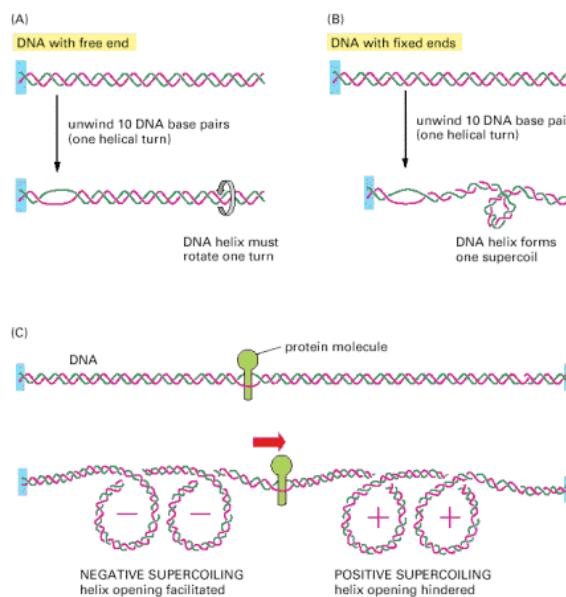
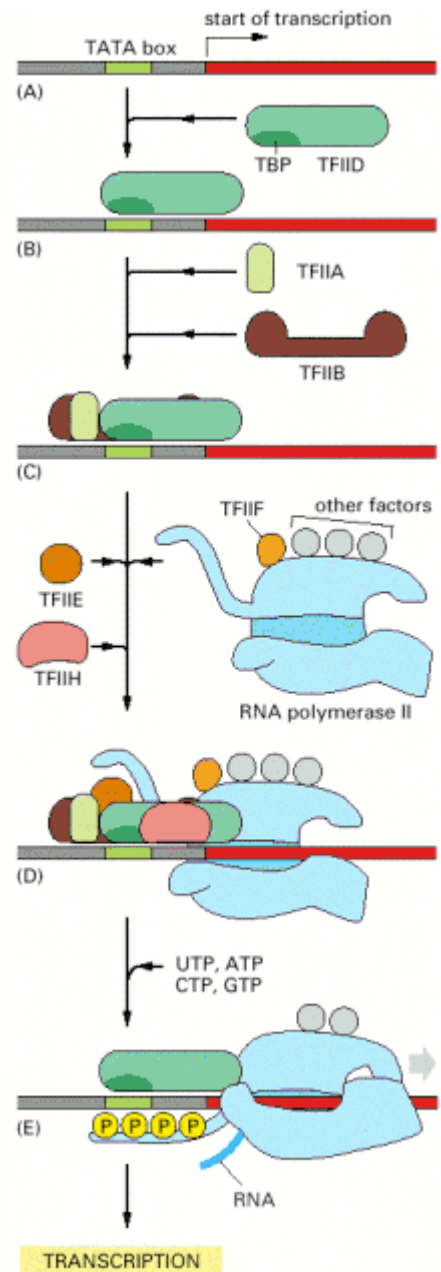
Transkriptionsinitiering i EUKARYOTER:

TYPE OF POLYMERASE	GENES TRANSCRIBED
RNA polymerase I	5.8S, 18S, and 28S rRNA genes (dannes alle 3 fra EN rRNA-precursor)
RNA polymerase II	all protein-coding genes, plus snoRNA genes and some snRNA genes
RNA polymerase III	tRNA genes, 5S rRNA genes, some snRNA genes and genes for other small RNAs

- RNA-polymerase II i eukaryoter kræver GENERELLE TRANSKRIPTIONSFAKTORER (TFII'ere) for at igangsætte transkription. TFII'ere er generelle da de samles ved alle promotorer som RNA-polym. II benytter.
- TFII'ere svarer til sigma-faktor i prokaryoter.

Figur 8 TFIID binder til TATA-box vha. TBP (TATA-binding protein). TATA-box ligger normalt 25 nukleotider upstream for transcriptions-start. TFIID indeholder helicase til brydning af DNA-dobbelstreng, samt en kinase der fosforylerer halen på RNA-polymerase II. Når RNA-elongering begynder slipper de fleste TFII'ere DNA'et, og er klar til at binde et nyt sted.

- Transkriptionsinitiering i eukaryoter kræver også tilstedeværelse af henholdsvis **aktivatorer** (hjælper TFII'ere og RNA-polym. II til at binde til DNA det korrekte sted), **mediatorer** (tillader kommunikation ml. activator og RNA-polym. II), og **kromationmodificerende proteiner** (ex. histon acetylase) der giver større/bedre tilgang til DNA for transkriptions-komplex.
- Når **eloneringsprocessen** starter binder elongeringsfaktorer (både hos pro- og eukaryoter) og medvirker til at RNA-polym. II ikke dissocierer fra DNA template streng.
- Ved elongeringsprocessen dannes der supercoils i DNA, når RNA-polym. bevæger sig langs den ene DNA-streng. I eukaryoter benyttes energi i supercoils til at tvinge DNA fri fra nukleosomer. I prokaryoter danner DNA-gyrase såkaldte negative supercoils, der fjernes når dobbelthelix åbnes af RNA-polym. >> favoriserer åbning af helix der er supercoilet.

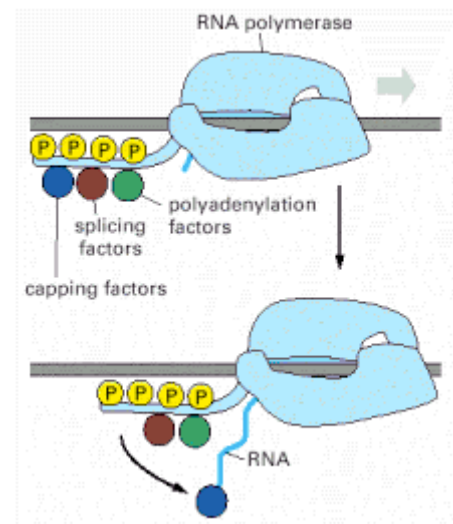


Kobling af transkriptionselongering og RNA-processing i Eukaryoter:

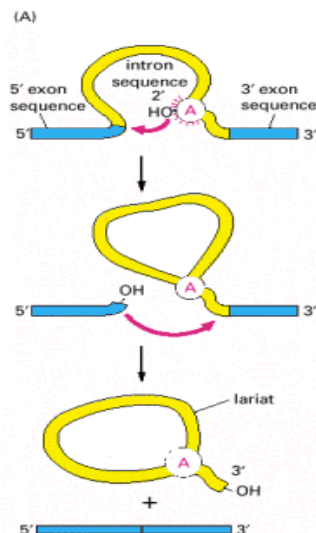
- RNA-processing; Især **splicing** og modifikation af 5' enden (**Capping**) og 3' enden (**Poly-A-hale**).
- Efter fosforylering (af TFIIH) i initieringsprocessen kan bestemte proteiner binde til RNA-polym. II's hale. Disse proteiner udgør NOGLE af de proteiner der modificerer det dannede RNA-molekyle.
- Defosforylering af RNA-polym II's hale er nødvendig før ny transkription af gener kan finde sted.

Capping:

- Påsættelse af methyleret guanin nukleotid i 5'-enden af RNA dannet af RNA-polym. II.
- 3 enzymer er involveret i capping, de sidder alle på fosforyleret RNA-polym. hale >> så snart 5'-enden kommer frem modificeres denne.
- RNA-polym I og III danner ikke 5'-caps, da disse mangler hale.
- Cap er vigtig til adskillelse af mRNA fra andre RNA'er samt ved translationsprocessen.



Splicing:

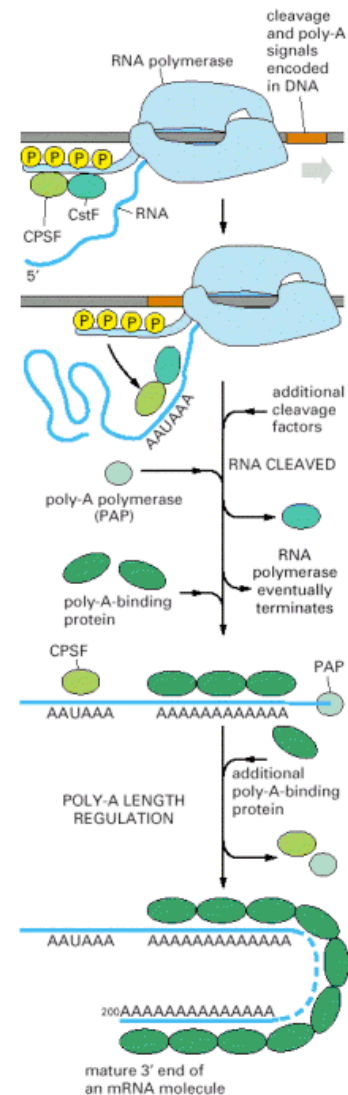


Figur 9 1) Adenin-nukleotid angriber fosfat-backbone i 3'-ende af exon 1. 2) 5'-enden af intron binder kovalent til adenin. 3) frie 3'-OH ende af exon 1 reagerer med 5' ende af exon 2 og disse sættes sammen, under dannelse af en "intron-lasso".

- Transesterifications proces
- Splicing foretages af spliceosom (opbygget af snRNA (small nuclear RNA) + protein = snRNP (small nuclear ribonukleo proteiner))

Poly-A hale:

Figur 10 CstF og CPSF (Cleavage stimulerende factor F & Cleavage and Polyadenylation Specifitetsfaktor) sidder på RNA-polym. II's hale og overføres til fremkommende RNA-streng. Efter binding af CstF og CPSF binder flere proteiner til RNA-streng. Herefter kløves denne, og enzymet Poly-A polymerase påsætter A-nukleotider på RNA-strengens 3'ende (dette gøres uden brug af Template). PolyA binding proteins bestemmer længden af polyA-halen (omkring 200 stks.).



Maturt eukaryotisk mRNA:

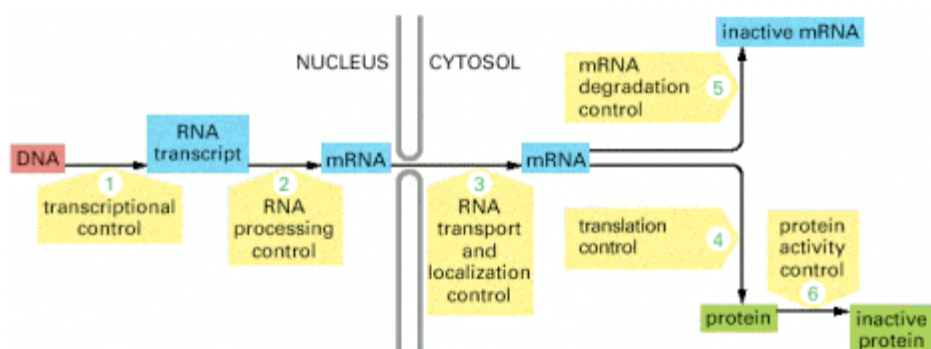
- Import og eksport mellem nucleoplasma og cytoplasma sker gennem såkaldte "nuklear pore complexes" (import til kerne ex. polymeraser, og eksport ex. maturt mRNA).
- Specielle bundne proteiner til ex. mRNA tillader transport gennem kerne-porer (især proteiner der markerer korrekt udført splicing er vigtige).
- Introns bærer også signaler, der mærker den til destruktion (ex. hnRNP'er [heterogene nukleære ribonukleo proteiner]). hnRNP er sammen med nukleosomer de hyppigst forekommende proteiner i kernen.

Non-coding RNA:

- rRNA udgør cirka 80 % af alt RNA i cellen
- Et mRNA kan give ophav til mange proteiner (amplifikation), mens et rRNA er et færdigt produkt. Der kræves derfor mange gener der koder for forskellige rRNA'er for at få dannet alle cellens 10 millioner ribosomer.
- Non-coding RNA bearbejdes i nucleolus (ex. rRNA, tRNA, U1-U6 snRNA (aktive ved splicing af præ-mRNA), RNA-protein komplekser (ex. telomerase) etc...

Kontrol af Gen-ekspression

- Normalt udtrykkes 10.000 til 20.000 ud af en menneske-celles 30.000 gener, i hver celle.
- Kontrol af gen-



regulation kan ske på flere niveauer (se figur).

- Især transkriptional kontrol er vigtig (hvor ofte et gen transkriberes), da man ved regulering her undgår halvfærdige produkter.

Genregulering, RNA syntese og processing

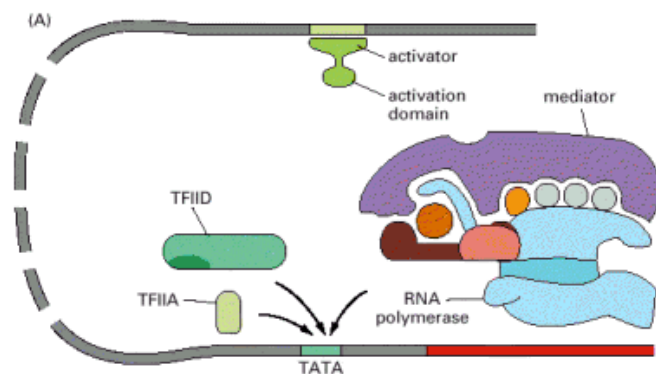
Lidt Terminologi:

- Operator= DNA sekvens der interagerer med en repressor >> hæmmer binding af ex. RNA-polymerase til promotor-region
- Operon= Genetisk funktionel enhed, der kontrollerer produktion af mRNA. Består af operator gen og 2 eller flere efterfølgende gener. Gener i operon transkriberes som et langt mRNA.
- Transkriptional aktivator / repressor= gen-regulatorisk protein der binder til promotor sekvens og fremmer / hæmmer binding af RNA-polymerase >> positiv / negativ gen-regulering.
- Både transkriptionelle aktivatorer og repressorer kræver som regel binding af mindre co-factorer, før de kan binde til specifik DNA-sekvens og dermed regulere gen-ekspression.

Transkriptions-regulering i Eukaryoter:

- Regulering af transkription i eukaryoter adskiller sig fra i bakterier på 3 væsentlige punkter: 1) Eukaryoter benytter genregulatoriske proteiner der kan placeres 1000' vis af nukleotider væk fra promotoren, og stadig indvirke på denne. 2) Generelle transkriptions faktorer er nødvendige for transkriptionsinitiering i eukaryoter. 3) Pakning af DNA til kromatin i eukaryoter tillader transkriptions-regulering der ikke er mulig for prokaryoter.

Figur 11 DNA-sekvensen hvor aktivatorer sidder (enhancer) kommer i kontakt med transkriptions-komplekset ved at DNA foldes. Enhancer kan både sidde opstrøms og nedstrøms for promotor-område. Gen-aktivator proteiner har normalt 2 domæner- et DNA bindings- og et aktiveringsdomæne. Aktivator's primære formål er at tiltrække, positionere og modificere generelle TF'ere og RNA-polymerase.



Holoenzym= RNA-polymerase, mediator samt NOGLE generelle transkriptionsfaktorer (Nogle generelle TF'ere binder direkte til promotor- ex. TFIIID).

- Genaktivator proteiner ændrer også kromatin-struktur i GEN KONTROL REGIONEN >> kovalent histon modificering og nukleosom remodellering. Histon-acetylering >> Gør DNA mere tilgængeligt for Generelle TF'ere (nogle Generelle TF'ere binder direkte til acetylerede histoner. Hvis promotor er pakket ind omkring nukleosomer forhindrer det binding af generelle TF'ere.

Translation (Proteinsyntese)

tRNA:

- Består af omkring 80 nukleotider, og indeholder binding-site for både codon (anti-codon) & aminosyre (i 3'-enden af tRNA).
- Nogle aminosyrer har flere tRNA'er tilknyttet, mens andre tRNA'er kan passe på flere forskellige codons (v. "wobble" på 3. nukleotid i codon).
- Aminoacyl-tRNA-syntetaser binder kovalent aminosyrer til korrekte tRNA'er (I eukaryoter findes der en syntetase for hver aminosyrer, mens der i prokaryoter findes færre).

Ribosom:

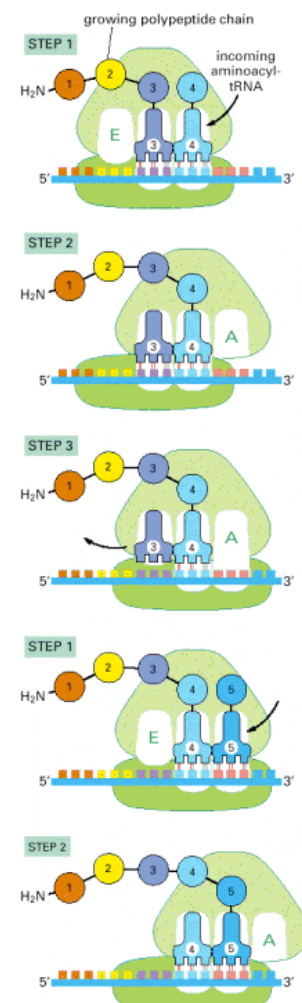
- Lille underenhed danner skelet hvorpå tRNA kan matche til korrekt codon på mRNA
- Store underenhed katalyserer dannelsen af peptid-bindinger mellem aminosyrer >> polypeptider.
- I eukaryoter tilføjer ribosomer ca. 2 aminosyrer til peptid-kæde pr. sek, i prokaryoter ca. 20 aminosyrer pr. sek,

Figur 12 Efter initiering af proteinsyntese er der 3 "major steps" der gentages ved elongering. 1) tRNA med aminosyrer binder til A-site ved matchning af anticodon til codon. 2)

Carboxylgruppe på aminosyre på P-site frigøres fra tRNA, og binder til aminogruppe på aminosyren i A-site i stedet (en proces katalyseret af peptidyl transferase). 3) Konformationsændringer flytter de to tRNA fra A og P-sites til henholdsvis P og E-sites. Yderligere konformationsændringer flytter mRNA PRÆCIS 3 nukleotider, så ny tRNA kan binde til A-site.

Elongeringsfaktorer:

- EF-Tu og EF-G (EF-I og EF-II i eukaryoter). Hydrolyserer begge GTP til GDP + P_i, samtidig med at de undergår konformationsændringer, der "speeder" proteinsyntese-hastigheden op.
- EF-Tu: Øger nøjagtigheden at elongering ved at introducere 2 korte "delay-perioder", hvor forkerte bundne tRNA'er kan dissociere og forlade ribosom igen, før irreversibel kæde-elongering finder sted (dannelse af peptid-binding). De 2 delays er: 1) Tid for GTP hydrolyse. 2) Tid mellem EF-Tu dissociering fra ribosom og til tRNA er fuldt akkommoderet på A-site.
- EF-G: "Speeder" hastigheden op ved bevægelse fra A+P-sites til P+E-sites (også under GTP hydrolyse).



Proteinsyntese initiering:

- Translationsinitiering af mRNA starter med codon AUG, til hvilken INITIATOR-tRNA binder, medbringende aminosyren methionin (Initiator tRNA har anden nukleotid-sekvens end "normale" tRNA der bærer methionin).
- Initiator tRNA "loades" ind i lille underenhed af ribosom, sammen med adskillige eIF'ere (**eukaryote** initierings faktorer).
- Lille ribosom underenhed binder til mRNA, og aflæser denne i 5'-til 3'-retning. Underenheden genkender 5'-enden pga. "cappen" (methyleret guanin nukleotid) samt ved hjælp af 2 ekstra eIF'ere der er bundet til 5'-enden på mRNA.
- **NORMALT** begynder translation ved første AUG-codon, hvorefter eIF'ere dissocierer fra lille underenhed og gør plads til den store ribosomale underenhed. tRNA er nu bundet til P-site, og A-site er ledigt for binding af tRNA medbringende aminosyre "nr. 2".
- Den lille ribosomale underenhed kan til tider ignorere den 1. AUG-codon (og måske også 2. og 3.) før den binder. Dette fænomen = Leaky Scanning >> Tillader at der dannes protein med forskellig signal-sekvens i N-terminale ende >> proteiner kan dirigeres til forskellige compartments i cellen.
- **I Prokaryoter**- % 5'-cap >> lille ribosom-underenhed kan ikke finde translations-start. Shine-Delgano-sekvens: Sidder lidt opstrøms for første AUG-codon hvor translation skal starte >> Tillader at prokaryoter kan translaterer forskellige proteiner fra samme mRNA-streng (polycistrony)

Terminering af translation:

- UAA/UAG/UGA-codon indtager A-site >> release-factors binder til ribosom >> Et vandmolekyle adderes til C-enden på polypeptid kæden >> denne dissocierer.
- Polyribosomer (polysomer) tillader multipel translation af mRNA-streng. Så snart 5'-enden af mRNA er tilpas fri af første ribosom, kan et nyt ribosom binde (op til et ribosom pr. 80 nukleotider) >> Amplifikation af protein produkt ifht. antal af mRNA.
- I eukaryoter er intakt 5'- og 3'- enden nødvendige før translation initieres (halvfærdige protein kan være skadelige for cellen). I **PROKARYOTER** sker translation simultant med transkription >> ufuldstændig mRNA >> tmRNA indtager A-site i ribosom >> tilføjer et "tag" på 11 aminosyrer på ufuldstændige protein der markerer polypeptidet til degradering.

Forskellige former for antibiotikas indvirkning:

INHIBITOR SPECIFIC EFFECT

Acting only on bacteria

Tetracycline	blocks binding of aminoacyl-tRNA to A-site of ribosome
Streptomycin	prevents the transition from initiation complex to chain-elongating ribosome and also causes miscoding
Chloramphenicol	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6-65)
Erythromycin	blocks the translocation reaction on ribosomes (step 3 in Figure 6-65)
Rifamycin	blocks initiation of RNA chains by binding to RNA polymerase (prevents RNA synthesis)

Acting on bacteria and eucaryotes

Puromycin	causes the premature release of nascent polypeptide chains by its addition to growing chain end
Actinomycin D	binds to DNA and blocks the movement of RNA polymerase (prevents RNA synthesis)

Acting on eucaryotes but not bacteria

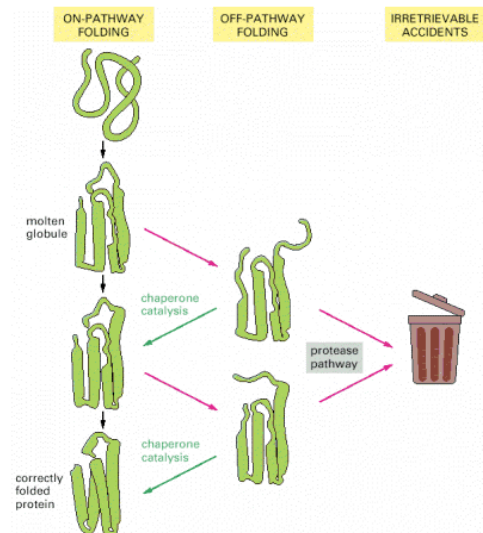
Cycloheximide	blocks the translocation reaction on ribosomes (step 3 in Figure 6-65)
Anisomycin	blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6-65)
α -Amanitin	blocks mRNA synthesis by binding preferentially to RNA polymerase II

The ribosomes of eucaryotic mitochondria (and chloroplasts) often resemble those of bacteria in their sensitivity to inhibitors. Therefore, some of these antibiotics can have a deleterious effect on human mitochondria.

Foldning af proteiner:

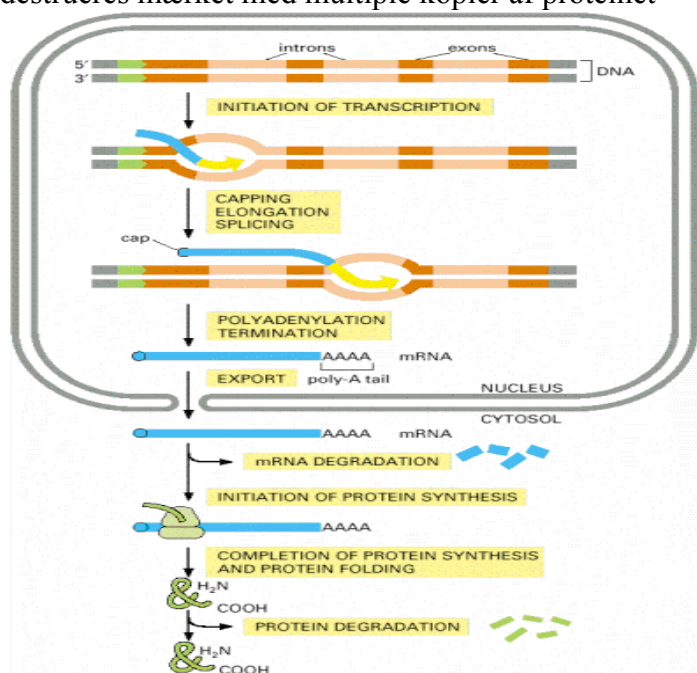
- Et domæne af et multi-domæne protein folder sig op i løbet af få sekunder, efter det er færdig-syntetiseret i ribosomet, til dets (næsten) endelige sekundære struktur (alfa-helix eller beta-sheet). Denne protein-struktur = Molten globule >> herefter sker der ved en relativ langsom foldning af tertiære struktur.
- Molekylære chaperoner: Hjælper proteiner på "molten globule" form til at blive færdig-foldet til endelig (og korrekt) struktur. Chaperoner = Heat shock proteiner >> hjælper misdannede proteiner ved opvarmning med at blive foldet rigtig.

- Især proteiner med "exposed" hydrofob del er sandsynligvis fejlfoldet, og er både ubrugelige for cellen, samt potentielt farlige hvis de danner aggregater.



Nedbrydning af proteiner:

- Nedbrydning af ubrugelige / skadelige proteiner varetager af proteasomet = ATP afhængig protease (hydrolyserer polypeptid kæder).
- Proteasom= 20S kerne, samt 2 19S caps. Kerne indeholder proteolytiske enheder, mens caps er ATP-spaltende. Proteasom adskiller sig fra andre proteaser ved at det klipper peptid kæder FLERE end 1 sted.
- Sædvanligvis er proteiner der skal destrueres mærket med multiple kopier af proteinet ubiquitin.
- Ophobning af fejlfoldede proteiner kan være skadeligt både for celler og hele væv. Protein-aggregater der giver problemer ved ophobning er særligt modstandsdygtige overfor proteaser (disse aggregater danner fibriller-så kaldte cross-beta filamenter-der er meget modstandsdygtige for proteolyse).



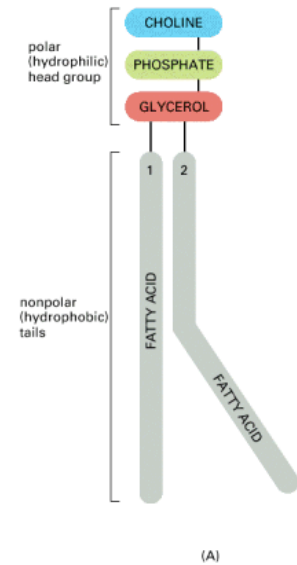
Figur 13 Oversigt fra præ-mRNA til færdigt protein

Membranstruktur

Membraner i dyreceller:

- Cirka 50/50 lipider og proteiner (kan variere meget).
- Lipider er AMFIFATISKE >> Har hydrofilt "hoved" og hydrofob "hale". De fleste membranlipider = fosforlipider (består af hoved + 2 haler).

Figur 14 Fosforlipid; Den ene hale har normalt en eller flere cis-dobbelt bindinger >> vigtige i forhold til pakning af lipider.



- Lipider vil enten danne MICELLER eller DOBBELTLAG for at "beskytte" hydrofob del. Fosforlipider = cylindriske >> danner dobbeltlag.
- Lipider i dobbetlaget membran kan bevæge sig frit ved lateral diffusion (indenfor bestemte domæner i membranen). Flip-flopping af lipider i membran kan også forekomme (dog sjældent). Membranbundne enzymer "fosforlipid translocatorer" katalyserer flip-flop fra inderste membran til yderste.
- Cholesterol og glykolipider er også vigtige komponenter i membraner. Kolesterol har en afstivende effekt (mindsker permeabilitet for mindre vandopløselige molekyler), samt modvirker fase-transition i membranen.
- **Forskel på membraner i Pro og Eu:** Prokaryoters membran består af et primært fosforlipid, og intet kolesterol (Har desuden cellevæg der virker beskyttende). Eukrayoters består af varierende fosforlipider samt kolesterol.

PERCENTAGE OF TOTAL LIPID BY WEIGHT

LIPID	LIVER CELL PLASMA MEMBRAN E	RED BLOOD CELL PLASMA MEMBRAN E	MYELIN (INNER AND OUTER MEMBRANES)	MITOCHONDRIUM (INNER AND OUTER MEMBRANES)	ENDOPLASMIC RETICULUM	<i>E. COLI</i> BACTERIUM
-------	-----------------------------	---------------------------------	------------------------------------	---	-----------------------	--------------------------

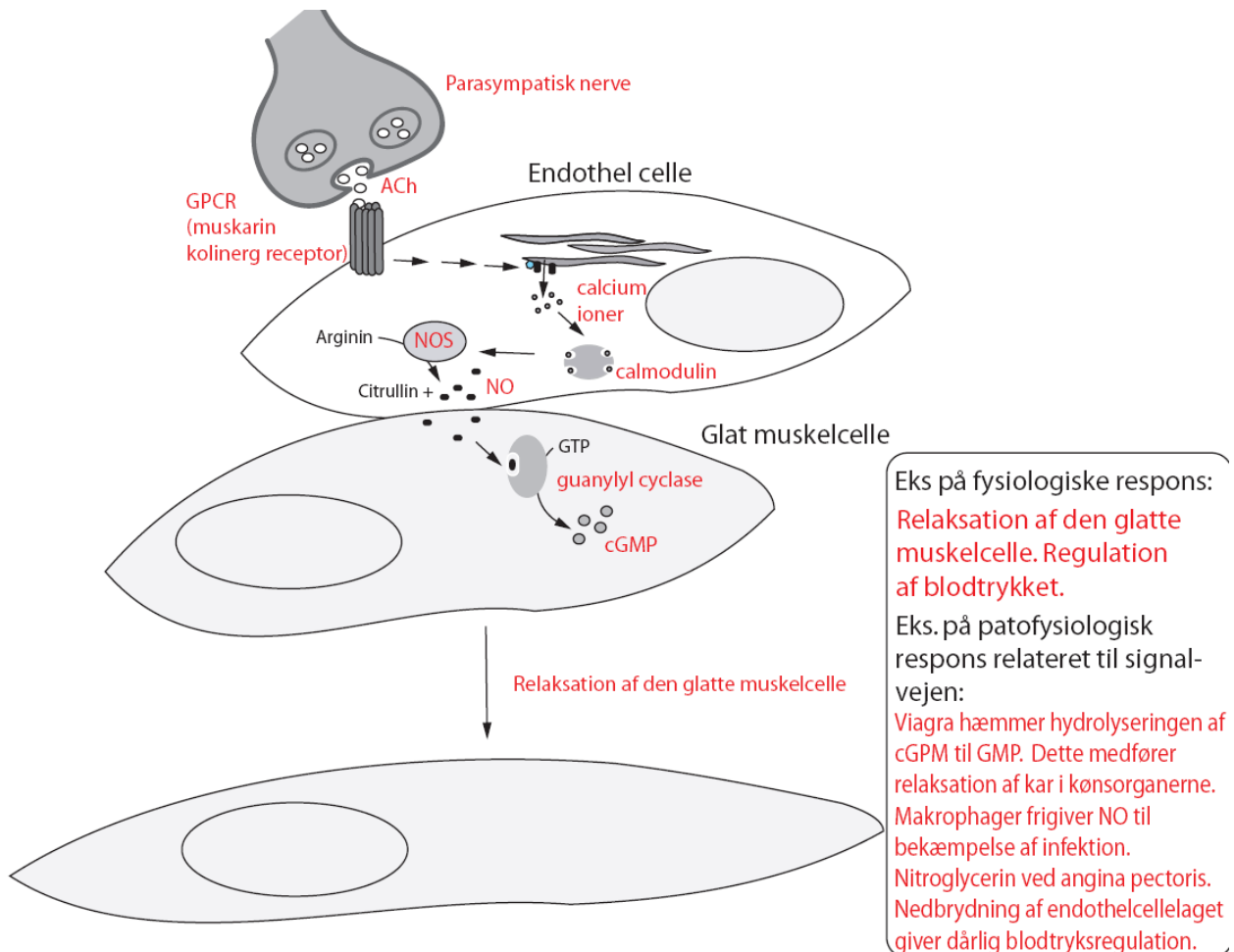
Cholesterol	17	23	22	3	6	0
Phosphatidylethanolamine	7	18	15	25	17	70
Phosphatidylserine	4	7	9	2	5	trace
Phosphatidylcholine	24	17	10	39	40	0
Sphingomyelin	19	18	8	0	5	0
Glycolipids	7	3	28	trace	trace	0
Others	22	13	8	21	27	30

- Lipidrafts = områder hvor sphingolipider opkoncentreres (da disse har lange karbon-haler samt er mættede). Membranproteiner er ofte også opkoncentreret i lipidrafts.
- Asymmetri af dobbeltlaget lipider er vigtig, især ifm. ekstra/intra cellulær signalering. Asymmetri er desuden vigtig ifm. apoptose >> ex. phosphatidylserin transloceres fra cytosoliske overflade til EC-overflade >> aktiverer makrofager til af fagocytære celle.
- **Glykolipider:** Dannes i Golgi, og transporteres herefter til non-cytosoliske del af membran (udgør normalt 5 % af lipider her). Glykolipider holdes sammen af hydrogenbindinger (mellem sukker molekyler) og Van der Waals kræfter (ml. deres lange mættede carbon-kæder). Vigtige ved, cellekommunikation, celleadhæsion, celle-beskyttelse (ex. epithelceller der udsættes for meget stress) etc.

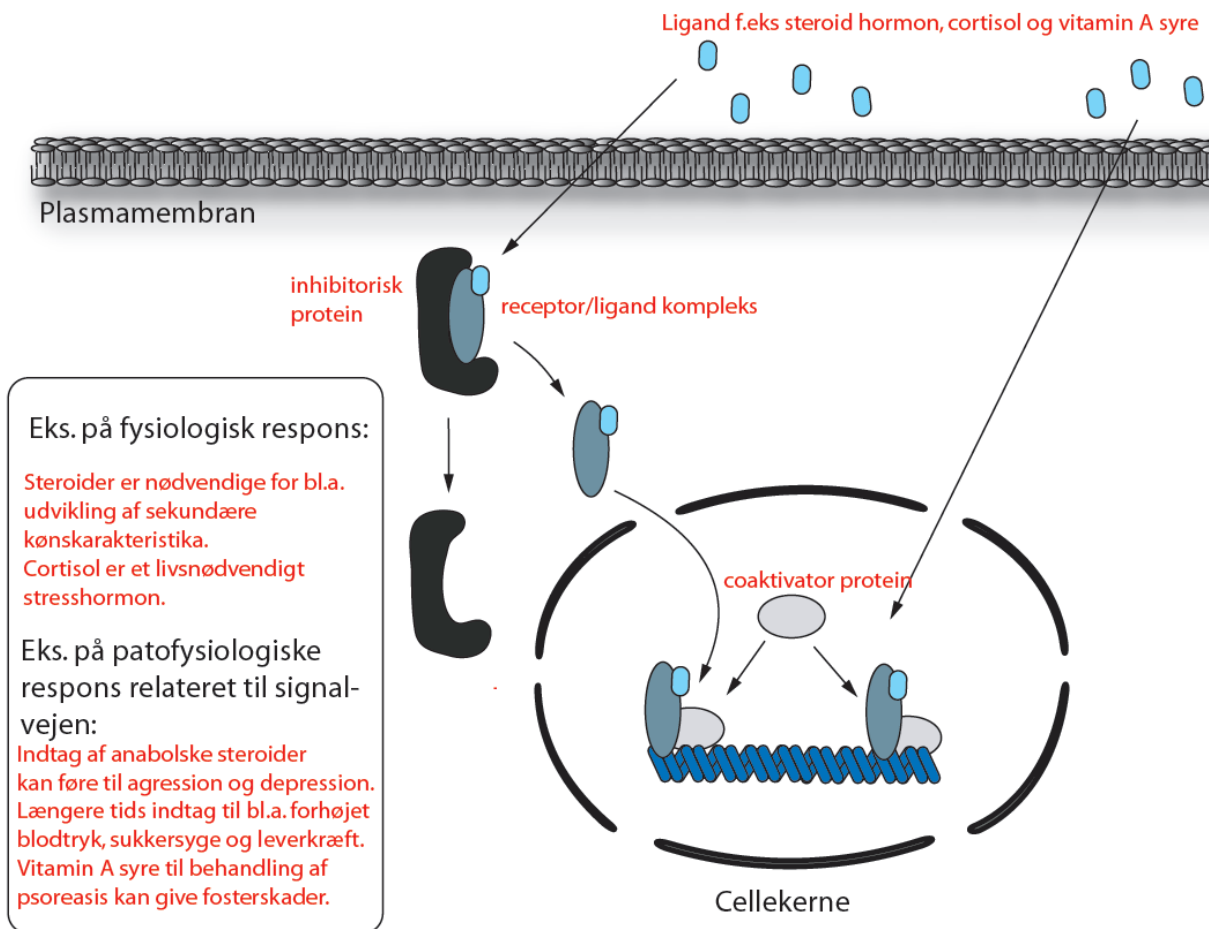
Celle-signalering

Cellesignalering kan foregå på følgende måder:

- Kontakt-afhængig; hvor ligand på én celle passer til receptor på anden celle
- Parakrin- Naboliggende celler påvirkes, og signal-molekyle enten fjernes hurtigt igen, eller ødelægges af enzymer
- Synaptisk- Hurtigt og præcis, postsynaptisk celle har lav affinitet for neurotransmitter der udskilles >> Tillader hurtig terminering af respons ved fjernelse af neurotransmitter.
- Endokrin- Signalmolekyler secernerer til blodbanen >> påvirker target-celler rundt i kroppen. Langsom og upræcis signalvej.
- Autokrin- Celler stimulerer sig selv eller naboceller, der er identiske med signal-cellen >> vigtig ved tidlig foster udvikling, samt vigtig ifht. kræftceller der herved kan stimulere sig selv til vækst udenom kroppens egne sikkerhedssystemer.



Figur 15 Autonome nerver frigiver acetylcholin >> Calcium frigives fra ER >> binder til Calmodulin der aktiverer NO syntase enzym i endothel celler >> Arginin deamineres til NO >> diffusion over membran til glat muskulatur >> NO binder til guanylyl cyclase >> GTP -> cGMP >> dilation af kar. (phosphodiesterase modvirker effekt af guanylyl cyclase- Ved brug af VIAGRA hæmmes phosphodiesterase >> længere dilation af kar i penis). (Phosphodiesteraser kløver ex. bindinger i cykliske nuklotider (cNMP), mens phosphataser kløver andre fosfatbindinger ex. i proteiner).



Figur 16 Ligand kan diffundere over plasmamembran, da dette er fedtopløseligt >> Binder til receptor og aktiverer denne >> aktiveret receptor binder til genregulatorisk DNA sekvens og regulerer transkription. Cortisol binder normalt til receptor i cytoplasma >> aktiveret kompleks transporteres ind i kernen. Thyroidea-hormon og retinoid receptorer er allerede bundet til DNA og aktiveres ved binding af ligand. Respons på transkriptionsregulering deles op i primær og sekundær.

Celleoverflade receptorer:

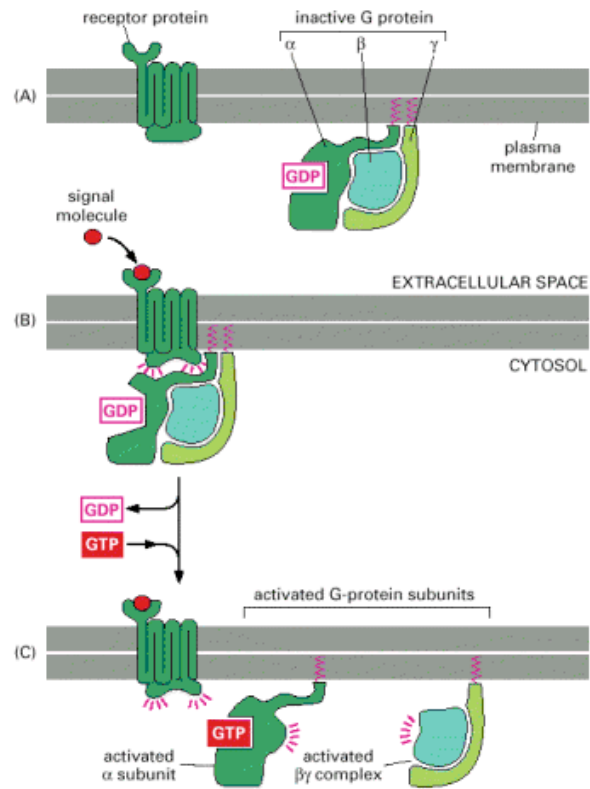
- 3 store typer af Celleoverflade receptorer: 1) Ion-kanal koblede receptorer (Ligand-gatede ionkanaler eller ionotrope receptorer); 2) G-protein koblede receptorer; 3) enzymkoblede receptorer.
- Intracellulære signalerings proteiner kan indeles i: Relay, Messenger, Adaptor, Amplifier, Transducer, Bifurkation, Integrator og Latent gen regulatorisk (sidsstnævnte aktiveres ved celleoverflade og migrerer herefter til nucleus og stimulerer gen-transkription) (RMAATBIL=huskeremse for 8 intracellulære signalerings proteiner)
- De fleste intracellulære signalerings proteiner skifter mellem aktiv/inaktiv tilstand- forårsaget af enten: 1) fosfoylering (kinase) og defosfoylering (fosfatase). To store typer af kinaser i celler- Serin/Threonin kinaser og tyrosin kinaser. 2) GTP-bindende proteiner, skifter også mellem aktiv/inaktiv tilstand ved henholdsvis binding af GTP (aktiv) og GDP (inaktiv). 2 typer af GTP-bindende proteiner: G-proteiner (trimere) og monomere GTPaser.

G-protein koblede receptorer:

FAMILY	SOME FAMILY MEMBERS	ACTION MEDIATED BY	FUNCTIONS
I	G_s	α	activates adenylyl cyclase; activates Ca^{2+} channels
	G_{olf}	α	activates adenylyl cyclase in olfactory sensory neurons
II	G_i	α	inhibits adenylyl cyclase
		$\beta\gamma$	activates K^+ channels
	G_o	$\beta\gamma$	activates K^+ channels; inactivates Ca^{2+} channels
		α and $\beta\gamma$	activates phospholipase C- β
	G_t (transducin)	α	activates cyclic GMP phosphodiesterase in vertebrate rod photoreceptors
III	G_q	α	activates phospholipase C- β

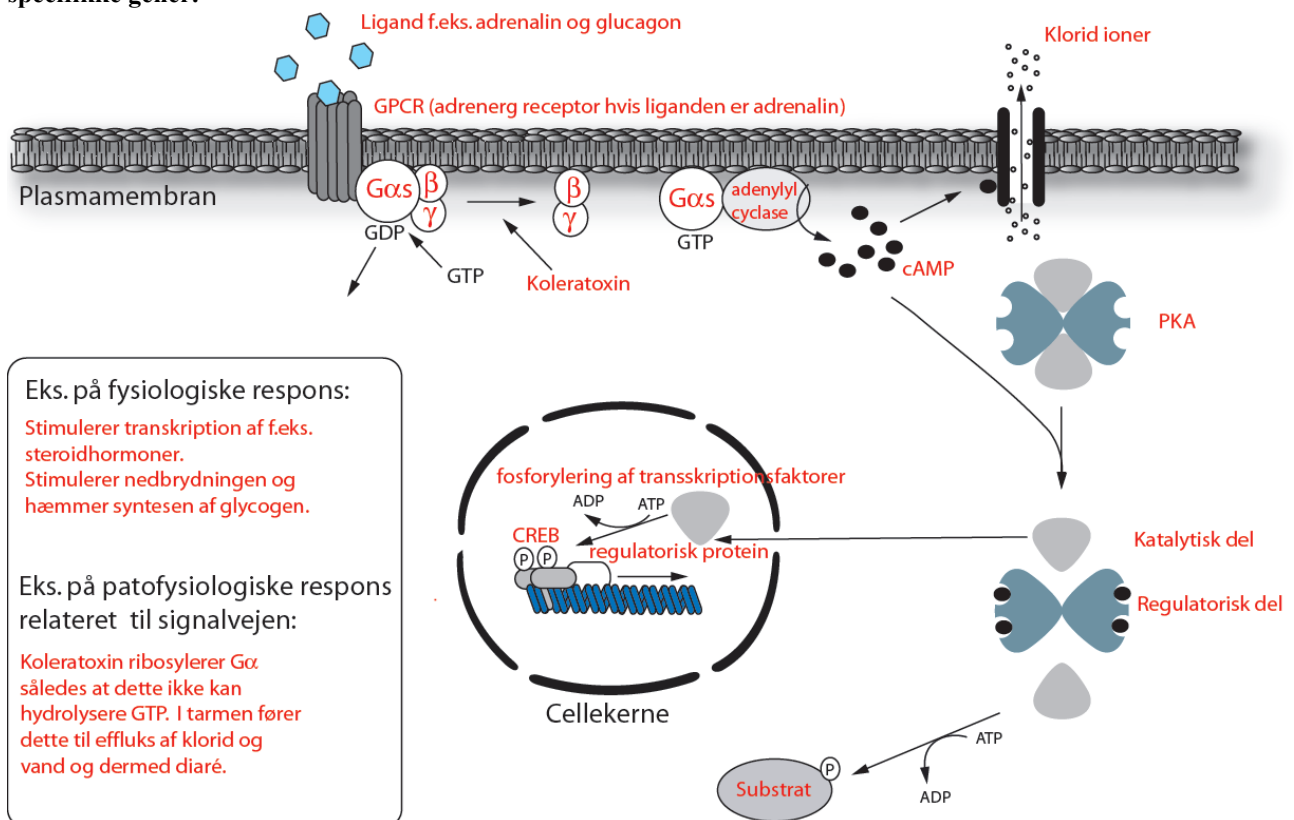
Figur 17 Fælles for G-proteiner: Består af alfa, beta og gamma- del. Ved aktivering gennem 7TM-receptor udbyttes GDP bundet til alfa-del med GTP, og alfa-del undergår konformationsændring og dissocierer fra beta-gamma kompleks. BG-kompleks undergår IKKE konformationsændring, men binding site før beskyttet af alfa-del kan nu reagere med ex. second messenger. alfa-subunit = GTP-ase der spalter bundet GTP til GDP + P (Når alfa associerer enten med target protein eller såkaldt RGS (regulator of G-protein signaling) protein. Når GTP på alfa del er spaltet associerer denne med BG-kompleks igen >> inaktivt G-protein.

- G-protein-koblede receptorer og deres pathways giver mange muligheder for amplifikation af det ekstracellulære signal der initierer processen.
- Adaption af G-protein-koblet receptor kan finde sted på 3 måder: 1) Receptor-inaktivering. 2) Sequestration (fjernes midlertidigt fra celleoverflade). 3) Receptor nedregulering, ødelægges ex. af lysosomer.

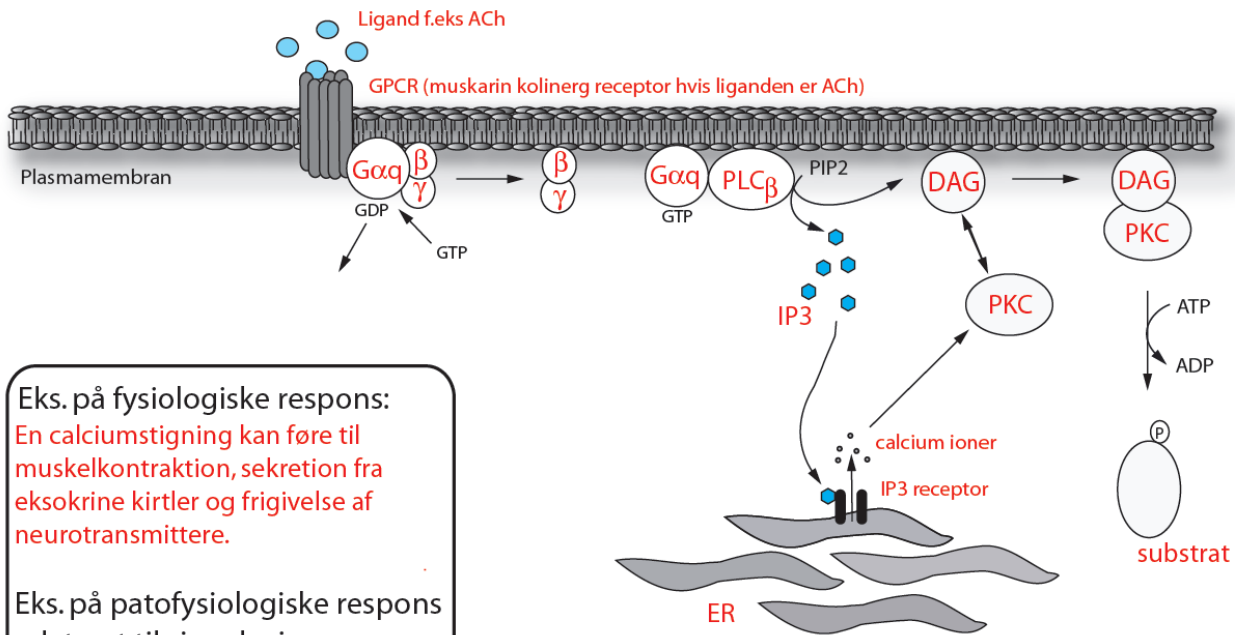


G_s-protein, cAMP og PKA pathway:

Figur 18 Binding af ekstracellulær ligand til 7 TM-receptor aktiverer G-protein >> dissocierer til alfa-subunit og BG-kompleks. Alfa-subunit aktiverer adenylyl cyclase >> ATP->cAMP. cAMP kan både virke ved at koble direkte til ion-kanal, men binder oftest til PKA's (cAMP dependent protein kinase) regulatoriske enheder. Dette aktiverer PKA's katalytiske enheder der enten kan virke gennem transkriptions regulering eller fosfoylerer endnu et substrat i signaleringsvejen. Ved transkriptions regulering fosfoylerer katalytisk aktiveret del af PKA ex. CREB (cAMP respons element) binding protein, der kan binde til CRE (cAMP respons element)-sekvens på DNA (CREB binder først til co-aktivator [CBP= CREB-binding protein]) og hermed regulere transkription af specifikke gener.



G_q-protein, phospholipase C pathway:



Eks. på fysiologiske respons:

En calciumstigning kan føre til muskelkontraktion, sekretion fra eksokrine kirtler og frigivelse af neurotransmittere.

Eks. på patofysiologiske respons relateret til signalvejen:

Et længerevarende forhøjet calcium-niveau er toksisk for cellen.

Figur 19 Signalmolekyle binder til 7 TM receptor og aktiverer G-protein q. Den aktiverede alfa-del aktiverer phospholipase C-beta, der spalter PIP₂ til IP₃ og DAG. IP₃ binder til IP₃-receptor på ER >> Calcium release. DAG aktiverer (sammen med calcium + phosphatidylserin) protein kinase C (PKC =calcium afhængig). PKC fungerer ligesom PKA, dog aktiverer den andre target-proteiner. Desuden er PKC tilknyttet plasmamembranen.

Calcium som en second messenger:

- Calcium kan bruges som signal-molekyle grundet den store gradient-forskel der findes mellem cytosolen (10^{-7}M) og EC/ER-miljøerne (10^{-3}M).
- Calmodulin = Calcium-bindende protein (virker som transducer). Har 4 binding-sites for Calcium, men der kræves dog kun 2 bindinger af Ca^{2+} før calmodulin aktiveres. Binding af flere Ca^{2+} -ioner >> kraftigere aktivering.
- Calmodulin-Calcium kompleks aktiverer (som oftest) andre proteiner. Har SOM OFTEST ikke selv nogen enzymatisk aktivitet (som ex. cAMP-PKA har). Calmodulin-Calcium kompleks aktivere ex. Calcium-kanaler i plasma-membran (PMCA'ere)>> Høj IC-koncentration af Calcium>> Calcium pumpes ud af cellen.
- Ofte fungerer calmodulin-calcium kompleks gennem såkaldte Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinaser (CaM-kinaser). Nogle CaM-kinaser er har enkle funktioner, mens andre ex. kan fosfoylere gen-regulatoriske proteiner (ligesom CREB-protein) >> Fremme/hæmme transkription.
- Nogle CaM-kinaser ex. CaM-kinase II kan autophosphorylere sig selv og derved fortsat være aktiv efter Ca^{2+} er fjernet fra cytosolen igen >> virker ved hukommelse.

G-proteiner kan direkte regulere ion-kanaler:

- Eksempelvis i hjerte-muskulatur: acetylcholin stimulerer 7TM-receptor >> aktivering af G-protein_i >> alfa-del hæmmer adenylyl cyclase mens BG-kompleks binder til og åbner Kalium-kanaler i membran >> hypo-polarisering (mindsker chance for depolarisering) (Ovenstående er et eksempel på en muskarin-cholinerg receptor, TIL FORSKEL FRA nicotin-cholinerg receptor der findes i skeletmuskulatur + nerveceller OG ER DIREKTE KOBLET TIL ION-KANALER i membranen).

Enzym-koblede receptorer:

- Funktion: Medierer ekstracellulære signaler der er vigtige for: Proliferation, vækst, differentiation og overlevelse (Growth Factors og mitogener), samt signaler der indvirker på cytoskelet, celle kravling + celleform.
- Modsat G-protein koblede receptorer har enzym koblede receptorer selv cytoplasmatiske enzym-aktivitet.

Receptor Tyrosin Kinase (en af 6 typer af enzym koblede receptorer):

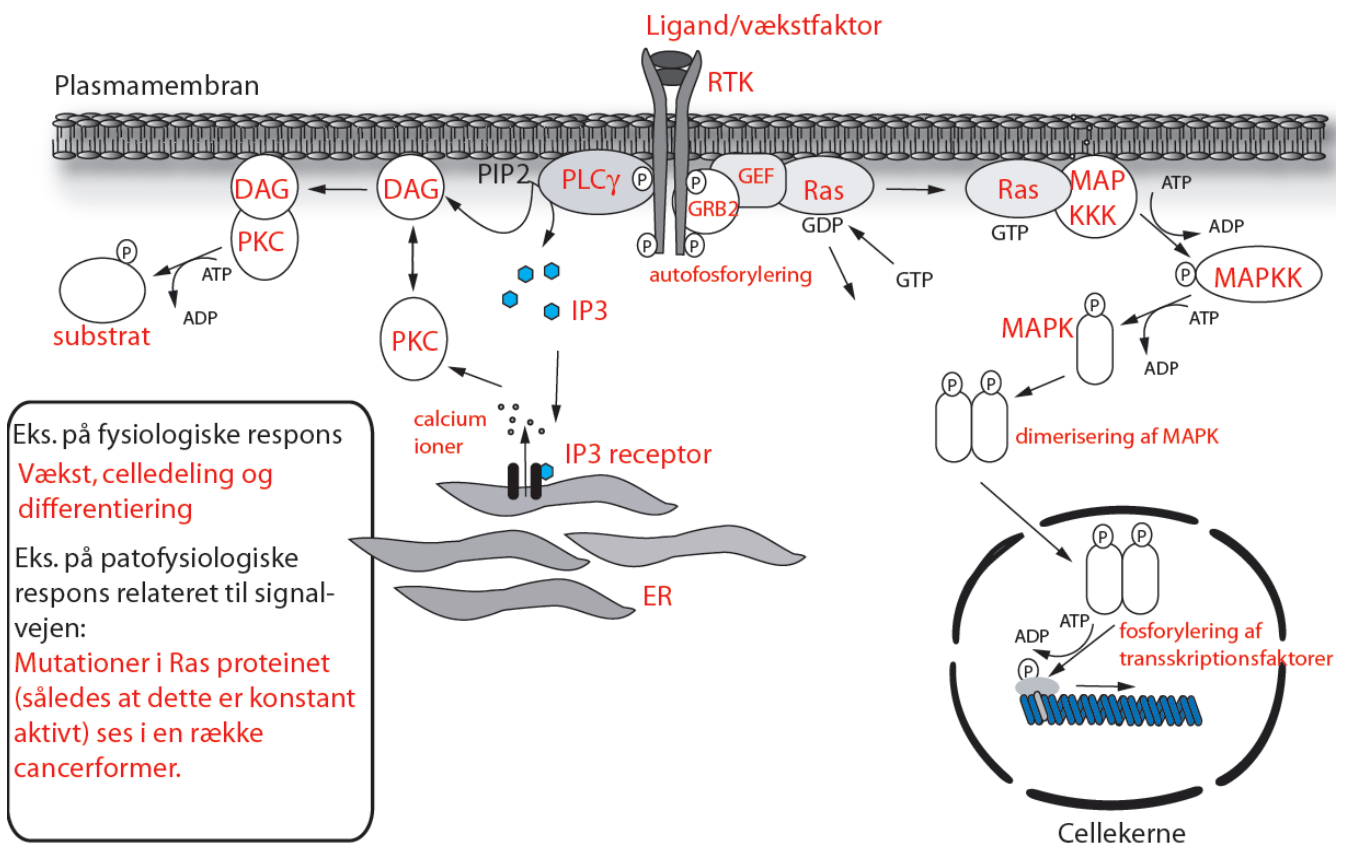
- Nogle signal proteiners interaktion med receptor tyrosin kinase:

SIGNALING LIGAND	RECEPTORS	SOME RESPONSES
Epidermal growth factor (EGF)	EGF receptor	stimulates proliferation of various cell types
Insulin	insulin receptor	stimulates carbohydrate utilization and protein synthesis
Insulin-like growth factors (IGF-1 and IGF-2)	IGF receptor-1	stimulate cell growth and survival
Nerve growth factor (NGF)	Trk A	stimulates survival and growth of some neurons
Platelet-derived growth factors (PDGF AA, BB, AB)	PDGF receptors (α and β)	stimulate survival, growth, and proliferation of various cell types
Macrophage-colony-stimulating (M-CSF)	M-CSF receptor factor	stimulates monocyte/macrophage proliferation and differentiation
Fibroblast growth factors (FGF-1 to FGF-24)	FGF receptors (FGF-R1-FGF-R4, plus multiple isoforms of each)	stimulate proliferation of various cell types; inhibit differentiation of some precursor cells; inductive signals in development
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	VEGF receptor	stimulates angiogenesis
Ephrins (A and B types)	Eph receptors (A and B types)	stimulate angiogenesis; guide cell and axon migration

- Binding af ligand til receptor tyrosin kinase >> 2 dimere af receptorer går sammen og phosphorylerer hinanden (autophosphorylering).
- Autophosphorylering virker på 2 måder: 1) phosphorylering af tyrosin i kinase-domæner øger ENZYMATISK AKTIVITET. 2) phosphorylering af tyrosin udenfor kinase-domæne øger AFFINITET for intracellulære signalerings proteiner. >> Autophosphorylering fører til kortvarig samling af stort intracellulært signalerings kompleks >> Sender signal af forskellige ruter i cellen.

RAS-protein:

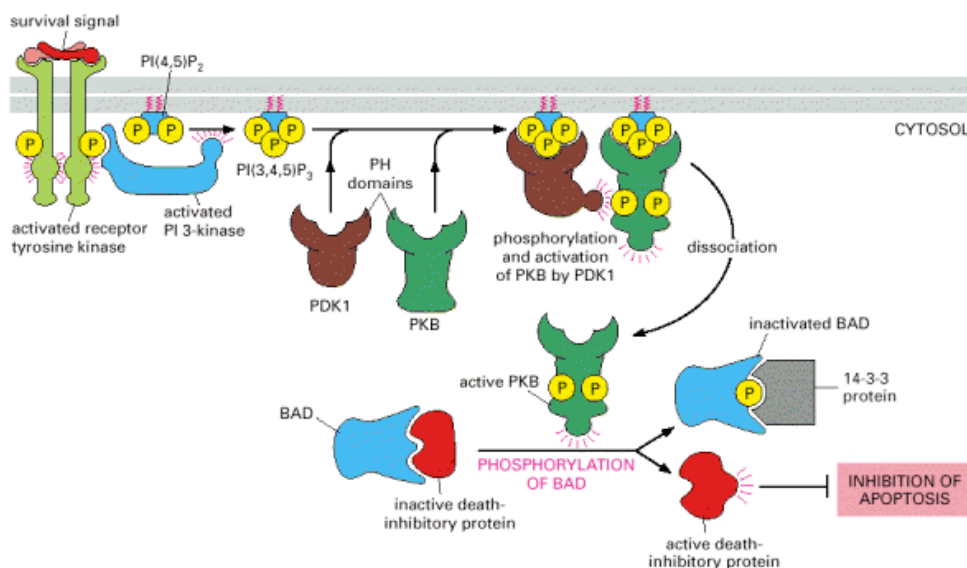
- Ras-protein = monomer GTPase. Vigtig i forhold til proliferation og differentiering af celler.
- Skifter mellem aktiv / inaktiv tilstand alt efter om henholdsvis GTP / GDP er bundet.
- 2 typer af proteiner regulerer RAS: 1) GEF (Guanin Exchange Factor- stimulerer GDP til dissociering og GTP til binding). 2) GAP's (GTPase aktiverende protein- fremmer nedbrydning af GTP bundet til RAS >> inaktivering af RAS-protein).
- RAS forbindes til Receptor Tyrosin Kinase via adaptor proteiner.



Figur 20 Binding af ligand/ vækstfaktor samler 2 monomere Tyrosin Receptor Kinaser der autophosphorylerer hinanden >> aktiverer hinanden fuldt. Der findes flere forskellige signaleringsveje der aktiveres af en aktiv receptor tyrosin kinase dimer: 1) Aktivering af Phospholipase C-gamma (Virker ligesom phospholipase C Beta). 2) Aktivering af RAS-protein. RAS protein aktiveres via Receptor Tyrosin Kinase gennem ADAPTOR-proteiner. 2 forskellige proteiner regulerer RAS-aktivitet, hhv. GEF's (Guanin Exchange Factors) der speeder processen hvor GDP udbyttes med GTP op >> aktivering af RAS. GAP's (GTP'ase aktiverende proteiner)-katalyserer GTP'ase aktiviteten af RAS >> GTP nedbrydes til GDP + P >> inaktivering af RAS. Aktivt RAS aktiverer MAP-kinase (mitogen-aktiverende protein) pathway >> MAP 3 x kinase >> MAP 2 x kinase >> MAP Kinase danner dimer udfra 2 monomere MAP kinaser. MAP kinase aktiverer hhv. genregulatoriske proteiner + andre kinaser (aktiverer eksempelvis transkription af gen for G1 cycliner til cellecyklus). Dephosphorylering >> inaktivering af MAP-kinase.

PI-3 kinase pathway:

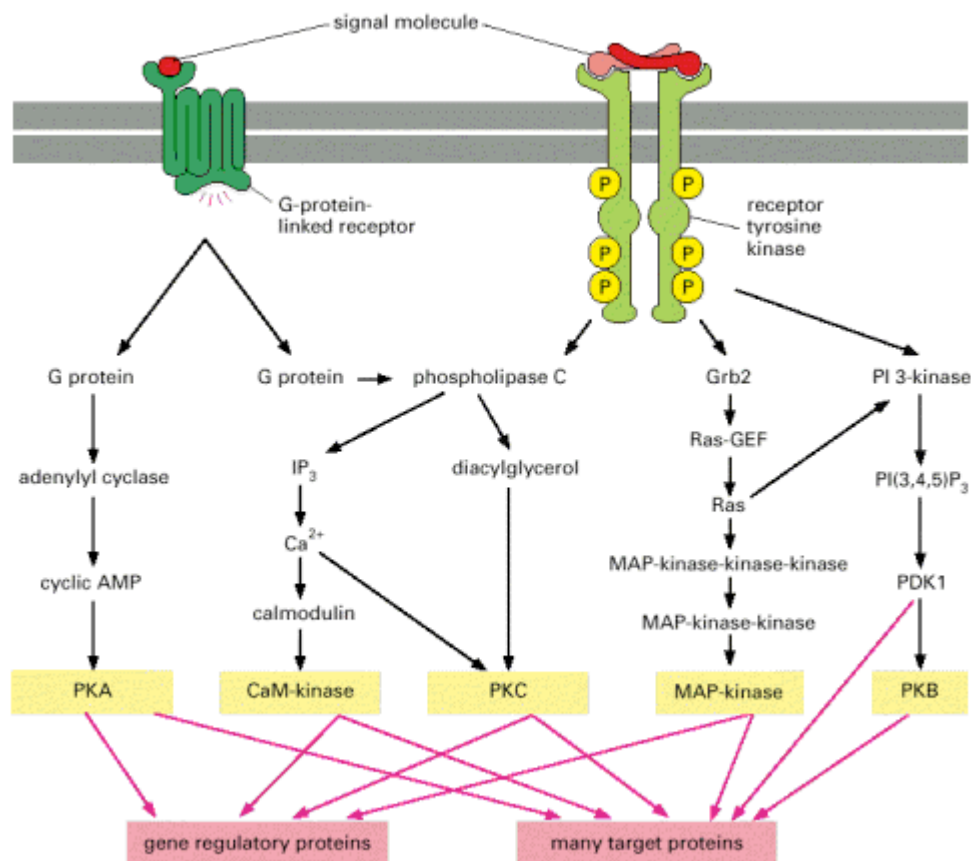
Figur 21 Receptor Tyrosin Kinase >> aktiverer PI-3 kinase der phosphorylerer PI til PIP2* (Ikke samme som substrat for phospholipase C beta). og PIP3. Disse phosphorylerede phosphatidylinositoler (PI'ere) sidder forankret i plasmamembranen, og fungerer her som



docking sites for ex. PDK1 og PKB. PDK1 aktiverer PKB hvorefter PKB returnerer til cytosol og fosforylerer

BAD proteiner. BAD proteiner der IKKE er fosforylerede "holder fast" på såkaldt DEATH INHIBITORY PROTEIN der frigives ved fosforylering af BAD >> Celler UNDGÅR at undergå apoptosis grundet det nu aktive døds-inhibitoriske protein >> Giver celle mulighed for VÆKST.

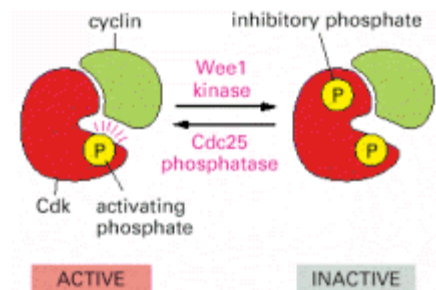
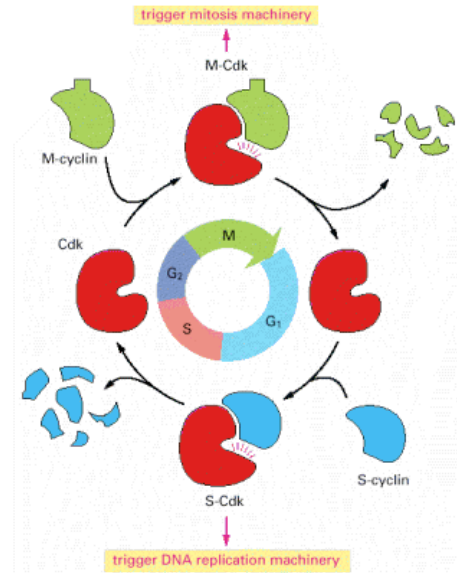
Oversigt over signaleringsveje aktiveret gennem G-protein koblede receptorer og Receptor Tyrosin Kinaser:



Cellecyklus

Komponenter i kontrol af cellecyklus:

- Checkpoints i cellecyklus sørger for at hindre eksempelvis, fejl i DNA replikation, giver tid for DNA-repair samt for korrekt ”spindle assembly” af kromosomer til tetradsapparatet.
- Checkpoints er IKKE essentielle for progression af cellecyklus.
- Checkpoints i cellecyklus virker gennem NEGATIV KONTROL; Altså når noget ikke er korrekt ifbm. cellecyklus sendes et negativt signal der informerer cellen om fejlen, frem for positive signaler der signalerer når noget er korrekt (Hvis cellen benyttede positiv kontrol ville mangel på eksempelvis et enkelt positivt signal ”drukne” i informationsmængden).
- Aktivitet af CDK’er (Cyclin dependent protein kinaser) er den primære reguleringsmekanisme af cellecyklus. CDK’er phosphorylerer proteiner der regulerer cellecyklus. Niveaue af CDK’er er nogenlunde konstant gennem cellecyklus, mens niveauerne af cycliner der aktiverer CDK’er stiger / falder i rytmiske svingninger.
- I de fleste **eukaryote** celler findes der 4 forskellige cycliner: 1) G1 cycliner der promoverer passager gennem restriktionspoint i sen G1-fase. 2) G1-S cycliner der er nødvendige for at ”comitte” cellen til S-fase. 3) S-cycliner der er nødvendige for initiering af replikation, og 4) M-cycliner der promoverer mitose.
- I **eukaryoter** findes der 4 CDK’er: 1) 2 styks der interagerer med G1-cycliner, 2) 1 styks der interagerer med både G1-S og S cycliner, og 3) et styks der interagerer med M-cycliner.
- Udover at aktivere CDK’er hjælper cycliner også med at målrette CDK’er til korrekte target-proteiner der skal phosphoryleres.
- Cycliner aktiverer kun delvist CDK’er. Full aktivering kræver phosphorylering af CDK’erne >> dette udføres af såkaldte CAK’er (CDK Activating kinaser) >> phosphorylerer aminosyre tæt ved aktive site på CDK.
- CDK aktivitet kan også reguleres af henholdsvis phosphorylering / dephosphorylering (se figur) samt ved binding af CKI-proteiner (CDK inhibitory proteins).



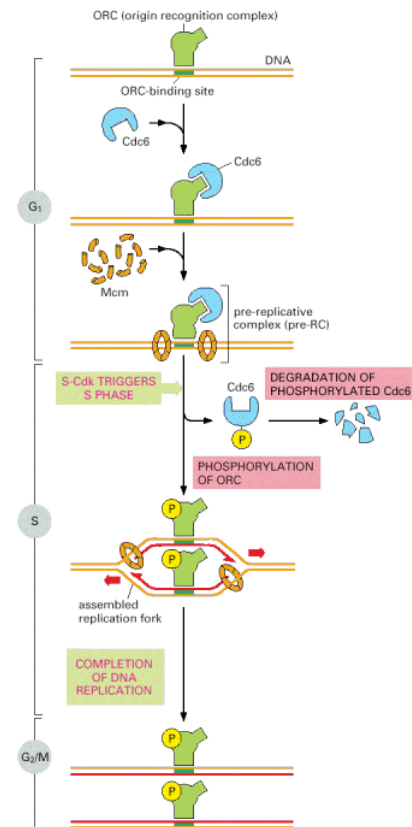
Figur 22 Wee1 kinase phosphorylerer CDK’er >> inaktivering af disse. Cdc25 = phosphatase der dephosphorylerer CDK’er >> fremmer aktivitet af disse

- Mærkning af cycliner med multiple ubikvitin molekyler er vigtig i forhold til regulering af cellecyklus kontrol systemet >> nedbrydning af disse i proteasomer.
- I de fleste celler reguleres cyclin-koncentrationen også ved transkriptional regulering, ved kontrol af henholdsvis gener der koder for cycliner (v. transkription), samt regulering af syntese (translation) af disse.

Intracellulær kontrol af cellecyklus:

Initiering af S-fase:

- I tidlig G1-fase samles protein kompleks på replikations origins. Dette kompleks (pre-replicative complex pre-RC) består af ORC (Origin recognition complex), samt andre proteiner >> kompleks aktiverer S-CDK til at fyre >> DNA-polymerase kompleks samles på DNA streng >> initiering af replikation
- S-CDK hæmmer re-replikation ved at påvirke proteiner der indgår i pre-RC. Får både proteiner til at dissociere, samt mærker dem med ubikvitin til nedbrydning, så de ikke kan deltage i andre pre-RC'ere.
- M-CDK og G1-CDK hjælper til med at hindre, at der dannes nye pre-RC'ere både i mitosen, samt når replikation er igangsat.
- Ved slutningen af mitosen reduceres alt CDK-aktivitet til 0 >> mulighed for ny cellecyklus hvor proteiner igen kan danne komplekser der aktiverer S-CDK >> initiering af replikation.

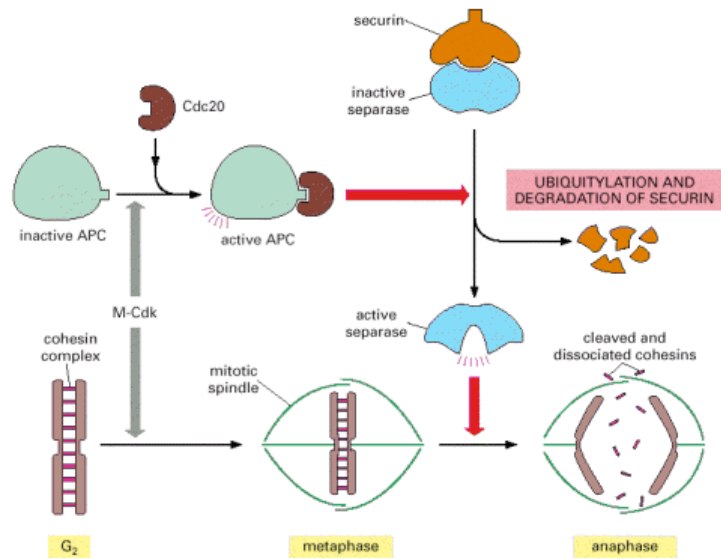


Initiering af M-fase:

- Gennem hele G₂-fasen opbygges der et "lager" af M-CDK'er der dog holdes inaktive ved fosforylering af Wee1 kinasen.
- In sen G₂-fase aktiveres Cdc25 fosfatase (og Wee1 hæmmes) >> defosforylering >> aktivering af M-CDK'er >> initiering af M-fase (Mitose).
- **DNA-REPLIKATION CHECKPOINT:** Hindrer indgang til M-fasen hvis DNA ikke er fuldt ud replikeret. Dette gøres ved at hæmme aktivering af Cdc25 fosfatase >> % aktivering af M-CDK'er.
- Nogle funktioner initieret af M-CDK ifbm. mitose: 1) Fosforylering af nukleær lamina >> depolymerisering af denne. 2) Kondensering af kromosomer. 3) samling af tetrådsapparat. 4) Fastgørelse af kromosomer til tetrådsapparat.

M-fase:

- APC (Anaphase Promoting Complex) aktiverer separation af søster kromatider i mitosen: APC nedbryder et protein (securin) der fastholder og inaktiverer en protease (separase). Når APC nedbryder securin frigøres separase'n og adskiller søster-kromatiderne (separase nedbryder cohesin-molekyler der holder søster kromatiderne sammen).

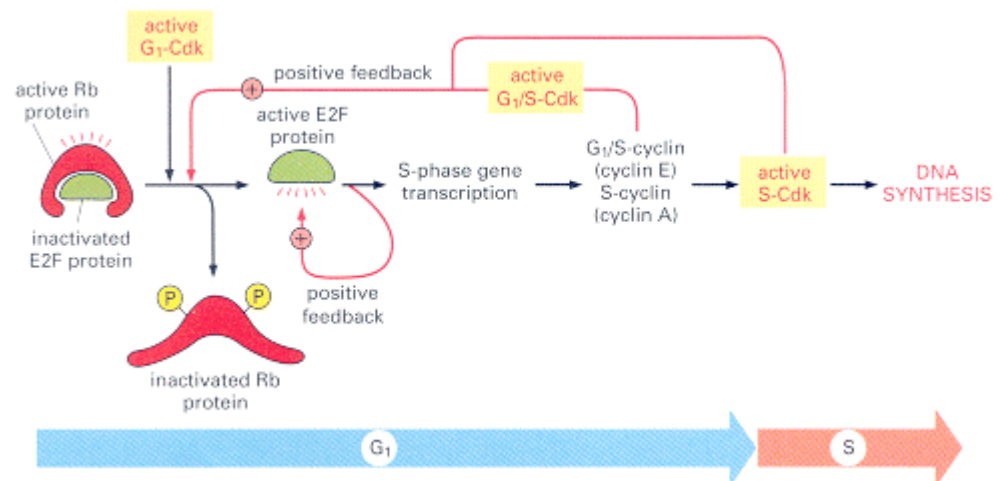


- **SPINDLE ATTACHMENT CHECKPOINT:** Hvis ikke kinetokore (område på kromosom der fastgøres til tetrådsapparat) på alle kromosomer er fastgjort ved slutningen af metafase >> celle udsender negative signaler >> hæmmer aktivitet af APC >> % initiering af anafase.
- Afslutning af mitose sker ved defosforylering af proteiner (gennem inaktivering af M-CDK). M-CDK inaktiveres ved mærkning af M-cycliner med ubikvitin (mærkning med ubikvitin aktiveres af APC) >> nedbrydning af disse i proteasomer.
- APC stimuleres til aktivitet af M-CDK >> nedregulering af M-cycliner >> fald i mærkning med ubikvitin af M-CDK'er udført af APC'er >> M-cycliner kan begynde at ophobes igen i starten af G₁-fasen.

G1-fasen:

- Generelt undertrykkes CDK-aktivitet i G1-fasen, og tillader celle vækst, stimuleret af ekstracellulære signaler (vækstfaktorer).
- Med tiden ophobes der G1-cycliner >> fører til aktivitet af G1-CDK >> transkription af G1-S cycliner >> G1-S CDK'er dannes, og stimulerer cellen til at gå i S-fase (cyklus kan starte forfra).

Figur 23 G1-CDK aktivitet initierer fosforylering af Rb-protein (en inhibitor af celle cyklus progression). Dette inaktiverer Rb og frigør E2F (genregulatorisk protein der påvirker transkription af G1-S og G1 cycliner).

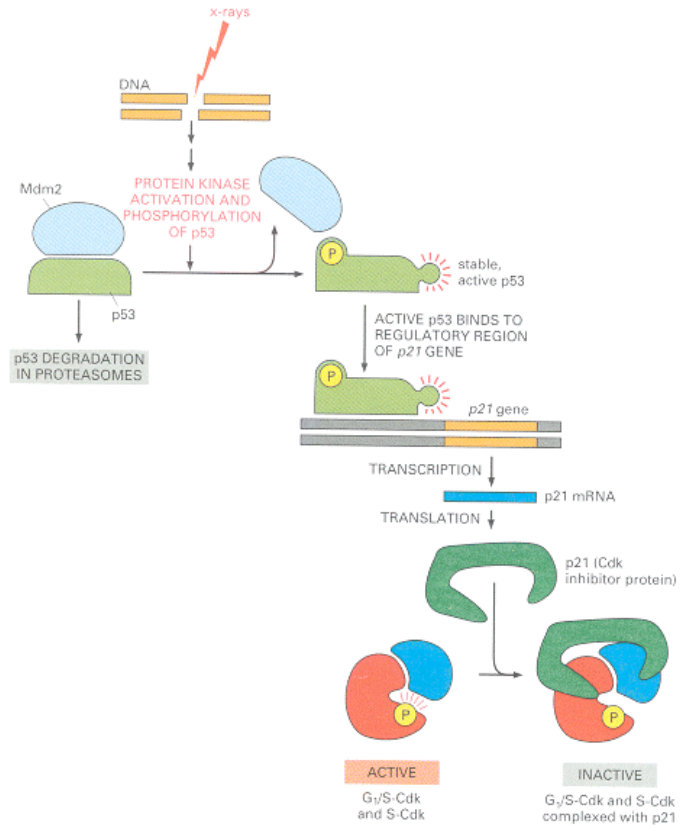


Cyclinerne går sammen med CDK'er og danner henholdsvis G1-CDK og G1-S CDK der har en positiv feedback funktion på fosforyleringen af Rb-protein. Samtidig stimulerer frigjort E2F transkription af sine egne gener >> ligeledes positiv feedback loop.

- Rb-protein virker som ”bremse” på progression af cellecyklus fase G1 i pattedyr (se figur).

DNA-damage checkpoints:

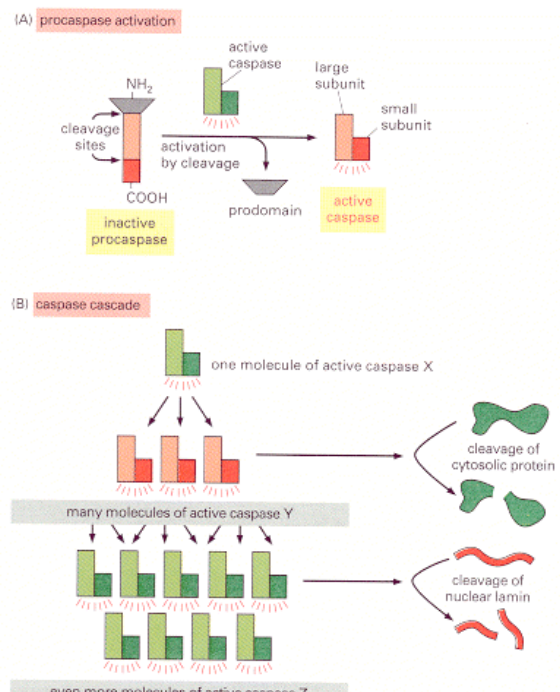
- DNA kan blive beskadiget i både G1 og G2 faserne ex. ved stråling eller kemisk påvirkning >> 2 DNA Damage checkpoints sent i henholdsvis G1-fase og G2-fase sørger for at fejl rettes før celle går i henholdsvis S-fase og M-fase.
- **Checkpoint sent i fase G2** virker ligesom DNA replikation checkpoint i S-fase: Aktiviteten af phosphatase Cdc25 hæmmes >> % aktivering af M-CDK'er >> % "entry" til M-fase.
- **Checkpoint sent i fase G1:** (se figur)



Figur 24 Beskadiget DNA aktiverer kinase der phosphorylerer p53 protein >> p53 aktiveres og stabiliseres (Normalt binder p53 til Mdm2 der promoverer tilhæftning af ubikvitin til p53 der altså normalt nedbrydes i proteasomet). Det stabile p53 akkumuleres i cellen og stimulerer transkription af gen der koder for CKI (CDK inhibitory protein) p21. p21 binder til og inaktiverer henholdsvis G1-S CDK og S-CDK >> celle fastholdes i G1-fase.

Apoptose:

- Celler der skal undergå apoptose aktiverer såkaldte caspaser, der normalt findes i cellen på en inaktiv form (pro-caspaser).

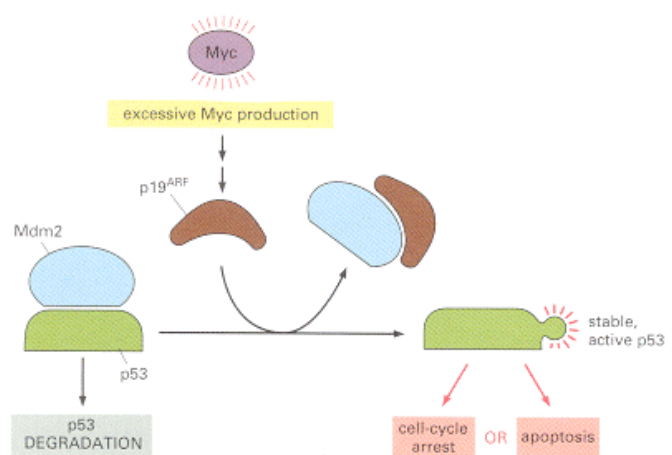


- Caspaser spalter ex. nukleær lamina, cytoskelet, samt aktiverer DNaser der nedbryder DNA til små fragmenter.
- Aktivering af caspaser sker ved, at ADAPTOR proteiner bringer initiator procaspaser sammen >> danner aggregater>> procaspaser har svag enzym-aktivitet der lige er stor nok til at de kan aktivere hinanden >> aktiverede caspaser aktiverer igen flere caspaser >> kaskade reaktion (se figur).
- Procaspaser kan enten aktiveres af udefra kommende signaler (ex. via FAS-ligand der binder til FAS-receptor >> rekrutterer adaptor proteiner der samler procaspaser). Eller ved signaler indefra cellen (ex. mitochondrier der frigiver cytokrom c >> cytokrom c binder til adaptor protein >> aktivering af procaspaser).

Kontrol af cellevækst, deling og apoptose:

- **Mitogener:** stimulerer til celledeling, ved at frigøre kontrolmekanismer der negativt hæmmer celledeling (eksempler på mitogener- PDGF (Platelet derived Growth factor) og EGF (Epidermal growth factor).
- Mangel på mitogener >> hæmning af CDK'er i G1-fase opretholdes >> Celler kan evt. gå i G0-fase (nogle celler såsom skelet muskelceller og neuroner er i såkaldt terminal differentieret G0-fase). Andre celletyper kan midlertidigt befinde sig i G0, for senere at returnere til G1-fasen og cellecyklus.
- MAP-kinase kaskaden er et eksempel på hvordan mitogener stimulerer til celledeling. Slut produkt af MAP-kinase vejen er (blandt andet) en forøgelse i aktiviteten af henholdsvis G1-CDK og G1-S CDK.
- **Vækstfaktorer:** Stimulerer via intracellulære signalerings veje cellen til at danne makromolekyler, samt sænker graden af degradering for selv samme. Eksempel på intracellulært signaleringsvej der stimuleres af vækstfaktor = PI-3 kinasen der aktiveres af Receptor Tyrosin Kinase.

- **Apoptose / Celle cyklus "arrest":**
Overproduktion og dermed overaktivitet af eksempelvis genregulatoriske proteiner der stimulerer celledeling kan aktivere p53 protein vejen (se figur) >> fastholdelse af celle i G1-fase ved inaktivering af henholdsvis G1-CDK og G1-S CDK'er (se afsnit om DNA damage checkpoints).



Proto-oncogener & Tumor supressor gener:

- Proto-oncogener og Tumor supressor gener = Cancer kritiske gener.
- Mutationer i protooncogener >> oncogener >> GAIN OF FUNCTION
- Mutationer i tumor supressor gener >> LOSS OF FUNCTION
- RAS = Proto-oncogen; Overaktivering af RAS >> uhæmmet celle proliferation.
- p53 = Tumor Supressor gen; Mangel på p53 >> % DNA-Damage Checkpoint sent i fase G2 i cellecyklus >> replikation af beskadiget DNA >> ophobning af mutationer.
- Proto-oncogener har DOMINANT EFFEKT: En enkelt mutaion i ex. RAS-gen kan føre til overaktivering af RAS og MAP-Kinase signaleringsvejen.
- Tumor Supressor gener har RECESSIV EFFEKT, da der kræves 2 "hits" for at effekt af mutationer kan ses. Hvis begge gener der koder for tumor supressor gen muteres >> loss of function >> mulighed for cancer udvikling.
- Man kan være arveligt disponeret for cancer, ved at arve ex. 1. hit for en mutation i tumor supressor gen, hvorved alle ens somatiske celler indeholder 1. hit. Alle celler kan derfor rammes af 2. hit og dermed blive potentiel cancer-celle. Hos "normale" (ikke arveligt disponerede) kræves der 2 hits i samme celle (meget usandsynligt).