

BESVARELSE EKSAMEN I CELLEBIOLOGI
6. AUGUST 1999

OPPGAVE 1

a) Ionetransport over plasmamembranen

De tre typer ionekanaler er:

1. reseptor/ligand operative

Åpnes/lukkes ved at en ligand (f.eks. hormon, neurotransmittor) bindes til sin reseptor på plasmamembranen

Finnes på nerveceller, epitelceller i nyrer

2. spennings operative

Åpnes/lukkes når membranpotensialet over plasmamembranen endres

Finnes på nerveceller, muskelceller

3. Mekaniske/strekkfølsomme

Finnes på muskelceller, hårceller i indre øret

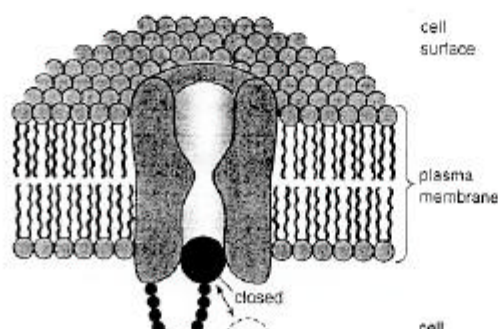
Åpnes/lukkes når plasmamembranen utsettes for mekanisk stress.

Antar at proteinene som utgjør slike ionekanaler har en aminosyrekjede på cytoplasmatiske side som foldes som en ball og passer inn i kanaler. Når kanalene aktiveres ved ett av de tre typer stimuli, vil proteinene som danner ionekanalene endre konformasjon slik at "ballen" fjernes fra kanalen som dermed åpnes, eller plasseres i kanalen som dermed lukkes.

Ioner diffunderer passivt gjennom ionekanalene med sin elektrokjemiske gradient, dvs med sin konsentrasjonsgradient og elektriske gradient (som avhenger av konsentrasjonen av ioner ekstracellulært og intracellulært). Ionefluxen avhenger derfor av:

- elektrokjemiske gradient
- permeabiliteten k som blant annet avhenger av antall ionekanaler i membranen.

Diamteren av ionekanalene og ladningen og polariteten av proteinen som utgjør kanalen bestemmer hvilke ioner som kan passere.



b) Beskriv Na⁺/K⁺ pumpen

Na⁺/K⁺ pumpen er et transmembranprotein som har 3 bindingssteder for Na⁺ og 2 for K⁺, slik at 3 Na⁺ molekyl er pumpes ut av cellen og 2 K⁺ inn.

Når konsentrasjonen av Na⁺ intracellulært/K⁺ ekstracellulært økes utover cellens normalverdi, begynner pumpen å arbeide:

ATP bindes til pumpen og hydrolyseres. Pumpen fungerer selv som en kinase. Fosfat fra ATP bindes kovalent til pumpen

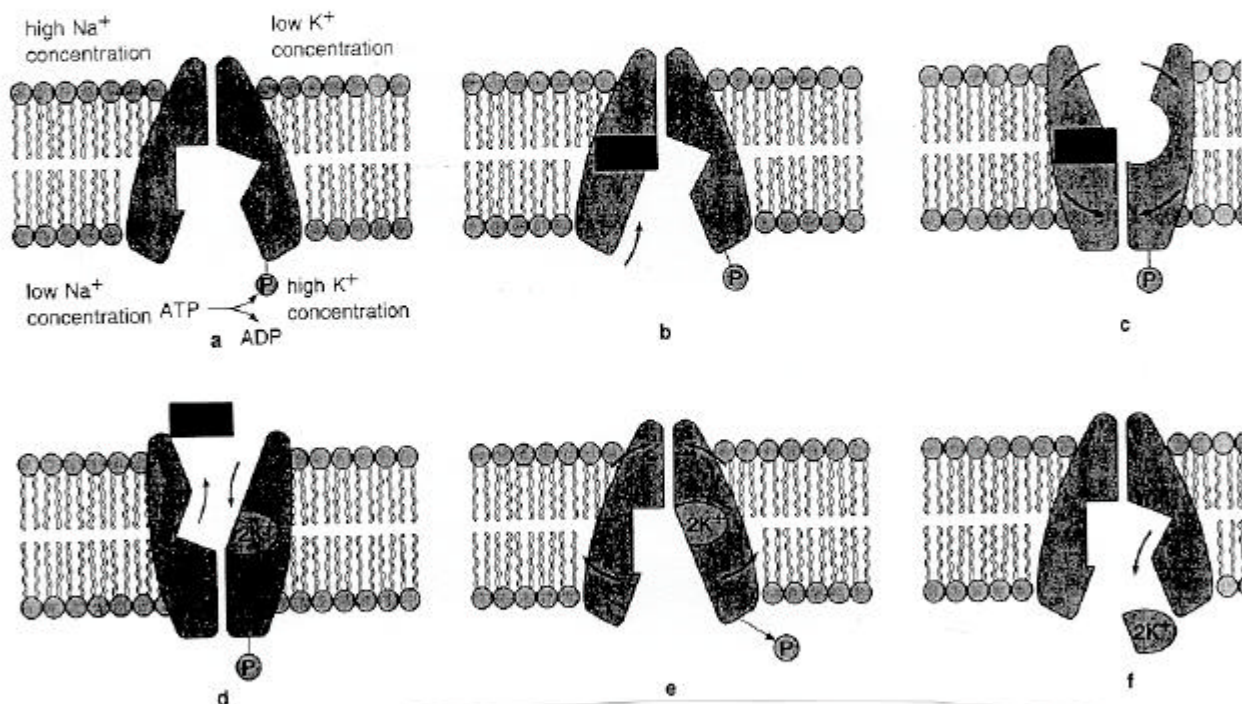
⇒ bindingsstedet for Na⁺ blir et høy-affinitetsbindingssted slik at Na⁺ lett bindes til pumpen på cytoplasmatiske side

⇒ pumpen gjennomgår en konformasjonsendring slik at Na⁺ overføres til ekstracellulær side og bindingsstedet bli et lav-affinitetsbindingssted

⇒ Na⁺ faller av ekstracellulært, Samtidig vil K⁺ bindes til pumpen på ekstracellulær side idet bindingsstedet for K⁺ er et høyaffinitetsbindingssted.

⇒ pumpen gjennomgår en konformasjonsendring slik at K⁺ overføres til cytosol, og fosfatgruppen faller av og bindingsstedet bli et lav-affinitetsbindingssted

Pumpen har nå transportert 3 Na⁺ ut av cellen og 2 K⁺ inn, og er klar for en ny syklus.



Oppgave 2
 a) InsP₃/DAG og Ca²⁺

Figure 6-4 The G-protein cycle in second-messenger pathways. The receptor, when bound to the first messenger, activates the α -chain of the G protein by catalyzing the exchange of GTP for GDP on the α -chain. The activated α -chain then releases from the β - and γ -subunits of the G-protein and, in turn, activates the effector. Hydrolysis of GTP to GDP, catalyzed by an enzymatic site forming part of the α -chain, inactivates the α -chain. The inactivated α -chain rejoins the complex with the β - and γ -chains to complete the cycle.

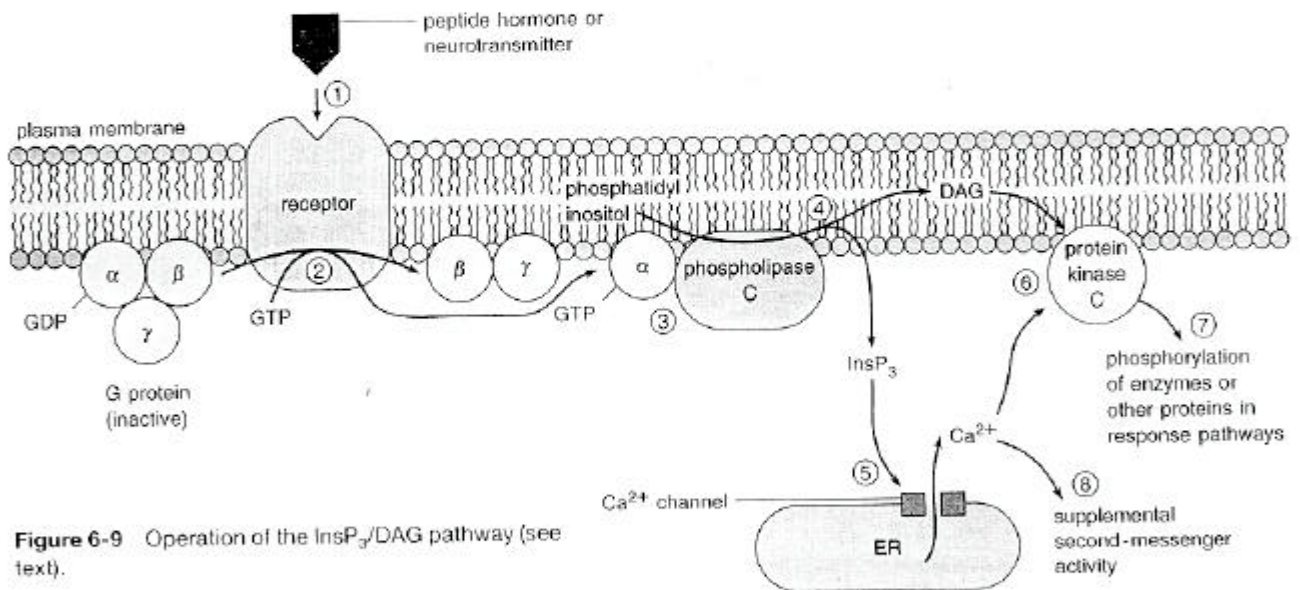
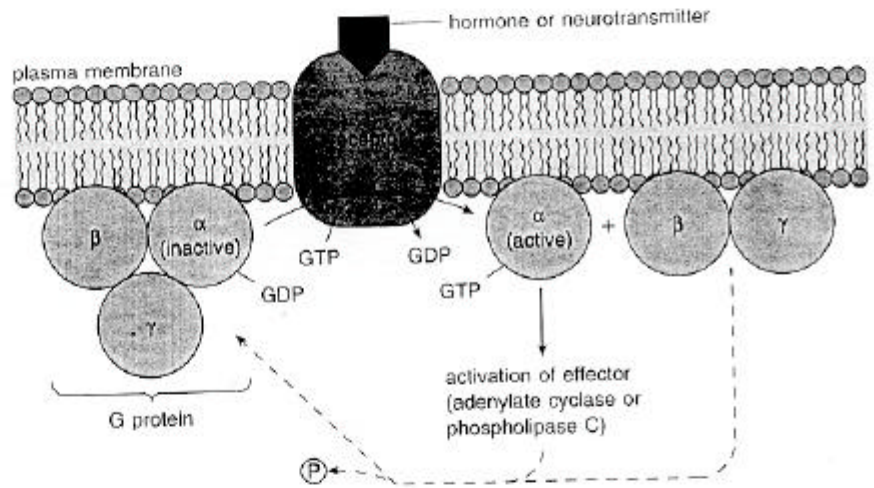


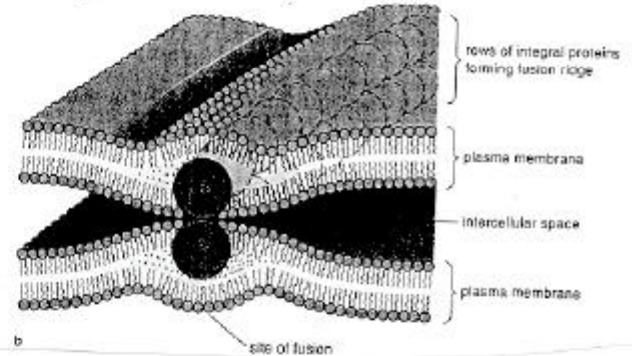
Figure 6-9 Operation of the InsP₃/DAG pathway (see text).

OPPGAVE 2

b) Tight junction

Sammensmelting mellom plasmamembranproteiner på to naboceller.

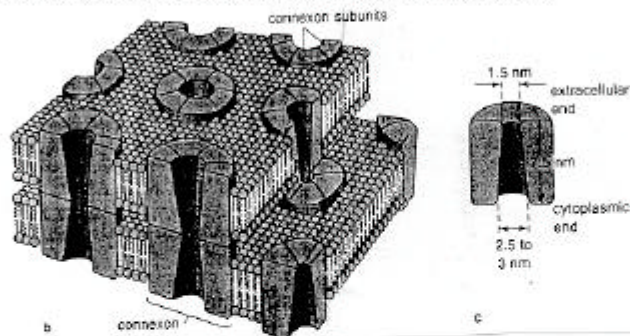
Opptreer ofte i serie, dvs sammensmelting mellom en rekke plasmamembran proteiner slik at det bli vanskeligere å trenge gjennom en slik junction



Gap junction

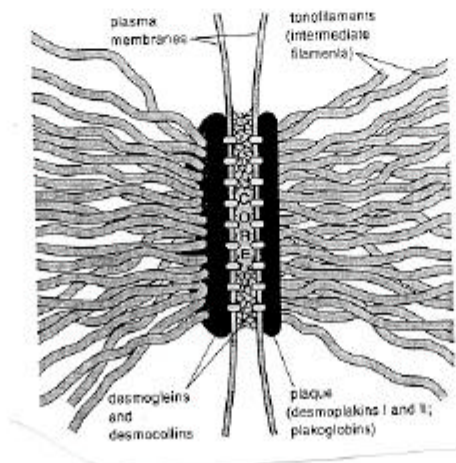
Protein kanal mellom to celler, slik at cytoplasma i naboceller er i direkte kontakt.

Proteinkanalen består av 4-6 proteiner som danner en såkalt connexon. Connexon i to naboceller er plassert slik at de danner en kanal mellom cellene.



Desmosomer

Intermediært filament bindes til proteiner som danner en såkalt plaque rett under plasmamembranen. Transmembran proteiner ofte såkalte cadheriner er bundet til proteiner i plaquet og til cadheriner på nabocellen. Cadheriner på nabicellen er igjen bundet til protein i plaquet rett under plasmamembranen som igjen er bundet til intermediært filament.



OPPGAVE 3

a) Organisering av cellens cytoskjelett, og hovedfunksjoner

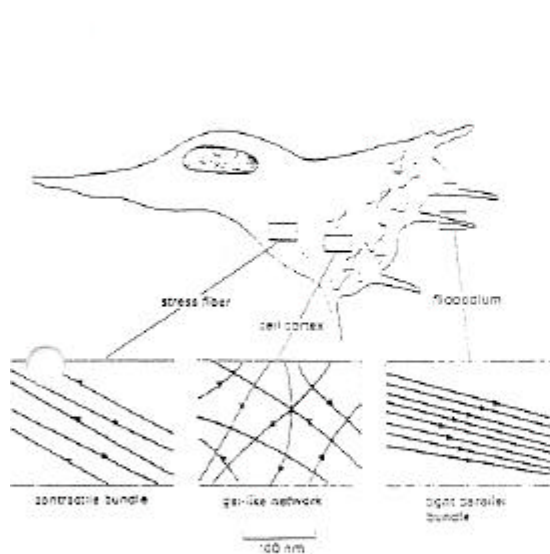
Organisering og funksjon av aktinfilament

1. Aktin filament er organisert som ett løst 3-dimensjonalt nettverk, kalt cellens cortex. (Proteinet filamin er ansvarlig for organiseringen). Nettverket befinner seg like under plasmamembranen. Funksjonen:

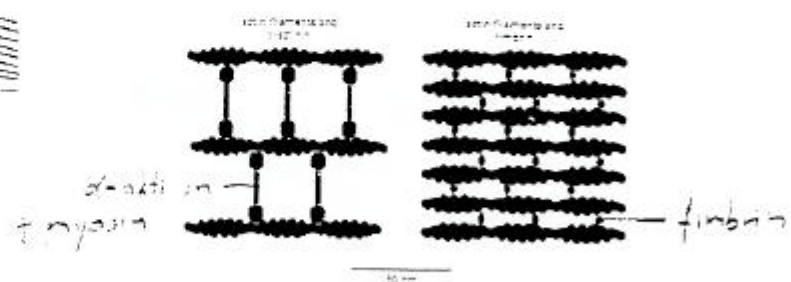
- gi plasmamembranen mekanisk støtte.
- Cellens cortex er også ansvarlig for cellens evne til å bevege seg med amøbeliknende bevegelser.
- festet til proteiner som danner såkalte forankrings-junction mellom celler (adherens junction) og mellom cellen og ekstracellulær matrix (integriner)

2. Aktin filament er organisert i tette parallelle bunter. (Proteinene villin og fimbrin er ansvarlige for organiseringen). Dette finnes bl.a. i fingerliknende strukturer på celle overflaten såkalte mikrovilli. Funksjonen er å øke cellens overflate. Finnes f.eks på epitel celler i tarm slik at absorpsjonsarealet øker.

3. Aktin filament er organisert i kontraktile bunter. (Buntene holdes sammen av proteinet α -aktinin, og myosin er ansvarlig for de kontraktile egenskapene). Slike bunter finnes i stress-fibre og i den kontraktile ringen som er ansvarlig for delingen av cytoplasma ved cytokinese. Stressfibre dannes i celler utsatt for mekanisk stress. De strekker seg fra fokalpunkter i plasmamembranen og innover i cytoplasma.



Løst nettverk: filamin (dimer) kryssbinder aktinfilament i ett 3-dimensjonalt nettverk.



b) Organisering av mikrotubulus

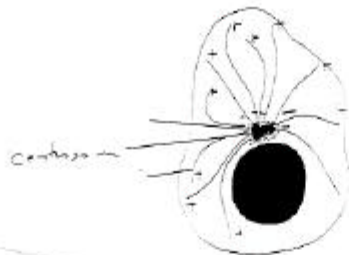
I cytoplasma strekker mikrotubulus seg ut fra centrosomen/mitotiske organiseringscenter nær kjernen. Centrosomen består av to centrioler omgitt av et formløst materiale. Centriolene består

av 9 tripletter av mikrotubulus, en hel og to partielle. Triplettene holdes sammen av mikrotubulus-assosierte proteiner.

Minus-enden er forankret i centrosomen. Plus-enden peker utover som vist på figuren.

Funksjonen til cytoplasmatiske mikrotubulus er:

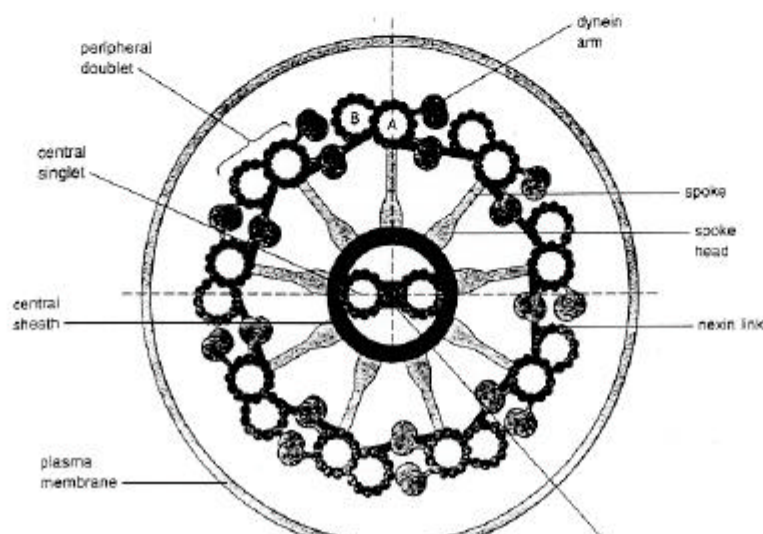
- vesikler og organeller kan bevege seg langs mikrotubulus
- organiserer cytoplasma i det organeller og vesikler er bundet til mikrotubulus via mikrotubulus-assosierte proteiner.
- bidrar til å gi cellen mekanisk styrke.
- danner det mitotiske spindelapparatet som trekker de to kromatin-trådene til hver sin spindelpol under mitose.



Flimmerhår er mikrotubulus organisert i såkalt axonem. Mikrotubulus danner et såkalt 9+2 mønster som vist på figuren. Dubletter av 9 mikrotubulus, en hel og en partiell mikrotubulus danner periferien av axonemet. Sentralt finnes to hele mikrotubulus. To nabadubletter holdes sammen av proteinene nexin og dynein. De 2 sentrale mikrotubulus holdes sammen med protein som danner en såkalt bru og et protein-hylster omgir de to sentrale mikrotubulus. Fra hylsteret og til dublettene i periferien strekker det seg proteiner som danner de såkalte eikene. Axonemet er forankret i centriolen.

Funksjon:

Flimmerhårene beveger seg på en regulert, synkronisert måte slik at de utfører en slagbevegelse over epitelcellelaget der de er festet. Slagbevegelser fører til at f.eks. støv og partikler føres oppover i luftveiene, og dermed fjernes.



6) Glykoproteiner i ER:

- Et oligosakkarid bestående av 14 sukker residu overføres til proteinet i lumen av ER.
- Bindes til NH₂ gruppen på asparagin-molekyl i proteinet
- Oligosakkaridet bindes i en blokk i et enzymatisk trinn (enzymet sitter i membranen på luminal side) så snart asparagin-molekylet i sekvensen Asn-X-Ser/Thr, når lumen av ER, dvs før protein syntesen er avsluttet og proteinet foldet.
- Forløper for oligisakkaridet er bundet til ER membranen i et lipid molekyl (dolichol)
- Oligosakkaridet bygges opp suktermolekyl for suktermolekyl
- Først legges suktermolekylene til på cytosol side, så skjer en translokasjon av sukker-molekylet til luminal side der syntesen fullføres.
- Oligosakkaridet består av N-acetylglucosamin, mannose, glukose
- I ER fjernes 3 glukose-residues og 1 mannose residue

Glykoproteiner i Golgi apparatet:

- Oligosakkaridet satt på proteinet i ER modifiseres ytterligere
- Sukker i terminal-området adderes i trans Golgi, i medial Golgi fjernes mannose og N-acetylglucosamin (i kjerne-området) adderes.
- Membranen rundt Golgi cisternen inneholder spesifikke transmembran bæreprøteiner som tillater at sukternucleotider går inn i lumen av Golgi cisternen i bytte med sukkerets nucleotidmonofosfat-produkt. Trinnvis prosess.

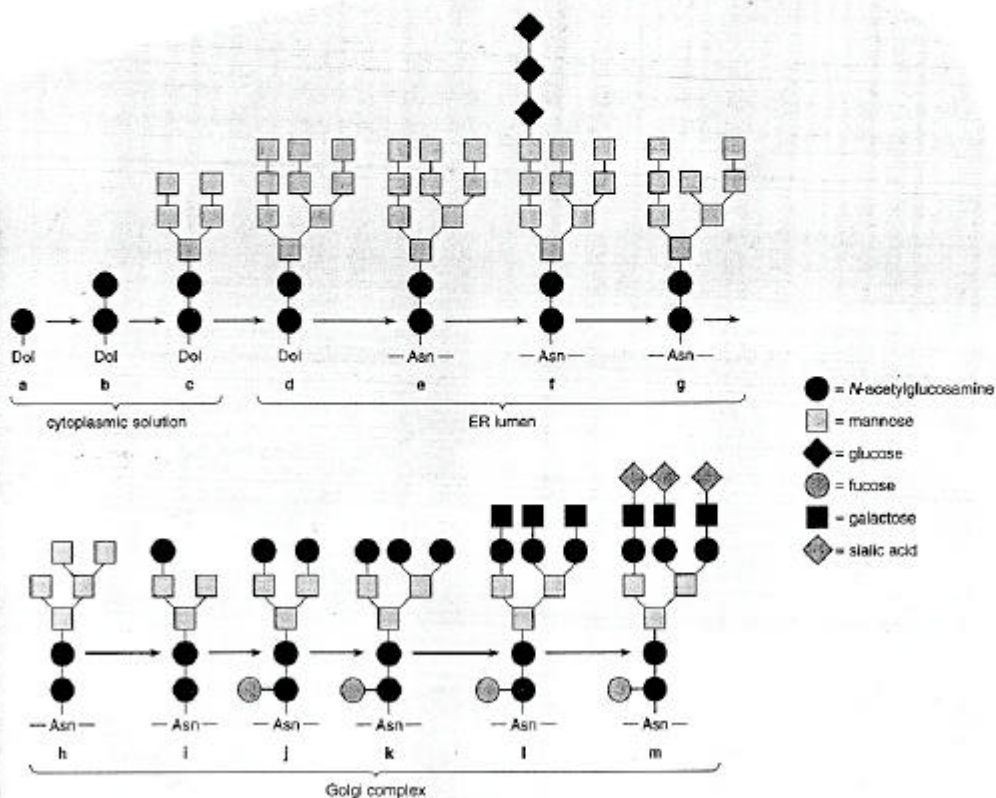


Figure 20-21 Assembly of a typical N-linked carbohydrate group in the ER and Golgi complex (see text). Dol = dolichol; Asn = asparagine.

OPPGAVE 4

a) Pakking av DNA:

- Proteinet histon binder seg til DNA (positiv ladning på histoner til negativt ladet DNA)

- DNA tvinner seg rundt en kjerne på 8 histoner og danner nucleosomer.

Kan observeres i elektron mikroskop som "perler på en snor". DNA er tvunnet to ganger rundt histon-oktameren som består av 2 kopier av H2A, H2B, H3 og H4. Mellom nucleosomene finner en såkalt linker-DNA.

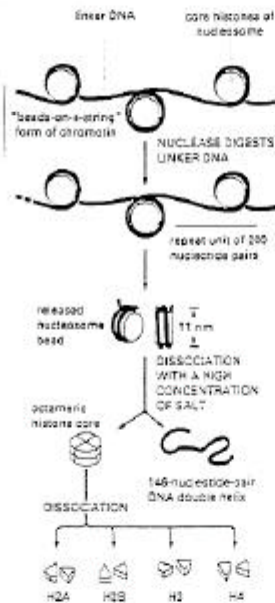


Figure 8-10 The nature of the nucleosome. (A) depicts two views of the three-dimensional structure of the histone octamer: the general path of the DNA wrapped around it is indicated by a coiled tube (top) and a series of parallel lines (bottom). Two H2A-H2B dimers (blue) flank an H3-H4 tetramer. The histone octamer is thus composed of two each of histones H2A, H2B, H3, and H4, with a total mass of about 100,000 daltons. (B) The nucleosome consists of two full turns of DNA (83 nucleotide pairs per turn) wound around an octameric histone core, plus the adjacent "linker DNA." The part of the nucleosome referred to here as the "nucleosome bead" is released from chromatin by digestion of the DNA with micrococcal nuclease. In each nucleosome bead 146 nucleotide pairs of DNA double helix (about 1.8 turns) remain wound around the octameric histone core. A, courtesy of Evangelos Moudrianakis.)

- Nucleosomer pakkes videre oppå hverandre i kromatin-fibre såkalt solenoid med diameter 34 nm. Solenoiden har 6-8 nucleosomer pr omdreining, og består av områder med og uten nucleosomer. (Nucleosom-frie områder sensitive for DNase).

Histon H1 er antatt å være ansvarlig for denne pakkingen. Det globulære hodet på H1 binder seg til et nucleosom og armene på histonet er i kontakt med histon-kjernen på nærliggende nucleosomer.

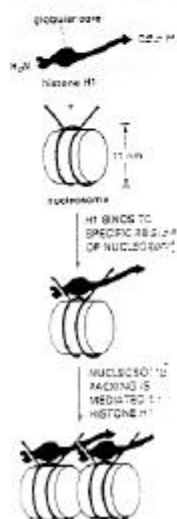
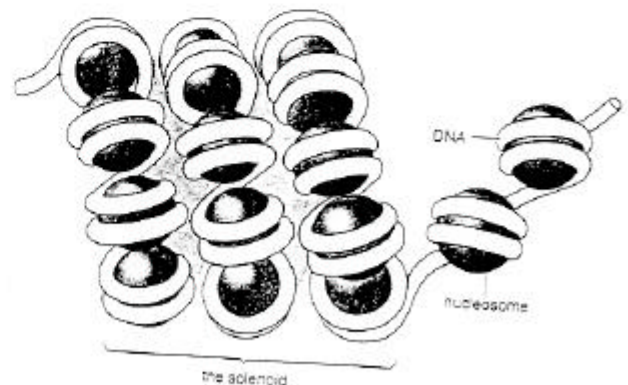


Figure 8-15 The way histone H1 is thought to help pack adjacent nucleosomes together. The globular core of H1 binds to each nucleosome near the site where the DNA helix enters and leaves the histone octamer. When H1 is present on the nucleosomes, 168 nucleotide pairs of DNA are protected from micrococcal nuclease digestion, compared with 146 nucleotide pairs for nucleosomes lacking H1 (see Figure 8-10).



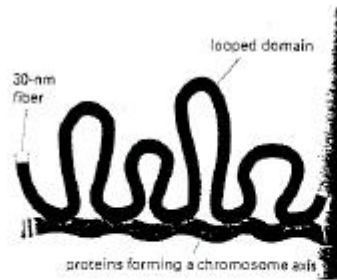


Figure 8-18 A model of chromosome structure. A section of a chromosome is shown folded into a series of looped domains, each containing perhaps 20,000 to 100,000 nucleotide pairs of double-helical DNA condensed in a 30-nm chromatin fiber.

Antar at kromatin-fibren er foldet i kromatin-løkker som strekker seg ut fra en sentral kromosomal akse, muligens er dette kjerne matrix.



Når cellene går inn i mitose kondenseres kromatinet ytterligere og en kan observere i mikroskop den karakteristiske kromosom-strukturen i metafasen. En antar at fosforylering av histon H1 er involvert i denne kondenseringen.

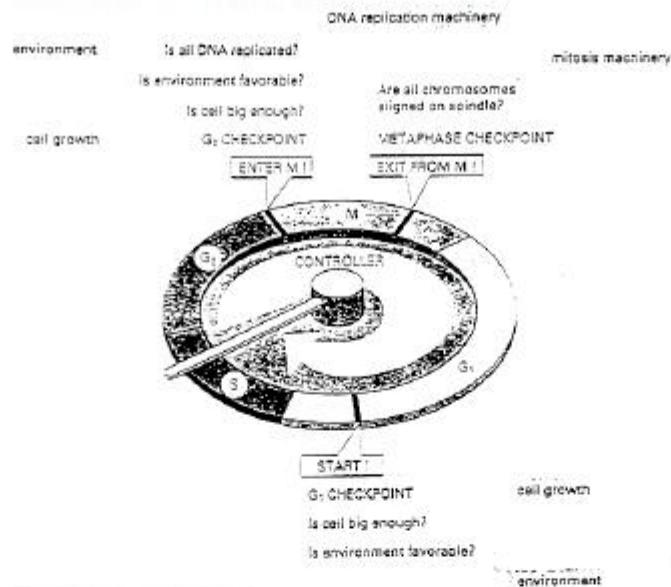
b) Regulering av cellyklus

Finnes 3 sjekkpunkter i cellyklus:

- sein G1 (også kalt restriksjonspunkt), undersøker om cellen er stor nok til å fullføre cellyklus, og om miljøet som omgir cellen er gunstig.
- inngangen til mitose, undersøker om alt DNA er replikert, om cellen er stor nok (skal være ca fordoblet i forhold til starten av G1) til å gå inn i mitose, og om miljøet er gunstig.

- utgangen av mitose, i metafase, undersøker om alle kromosomene ligger i ekvatorplanet midt mellom spindelpolene før kromatidtrådene kan trekkes til hver sin spindelpol.

Sjekkpunktene utgjøres av de to familiene av proteiner kalt cycliner og cyclin-avhengige kinaser (cdk). Det finnes to hovedklasser av cycliner, mitotiske cycliner som bindes til cdk i løpet av G2 og som er nødvendige for at cellen skal gå inn i mitose, og G1 cycliner som bindes til cdk i løpet av G1 og som er nødvendige for at cellen skal gå inn i S-fase.



Sjekkpunktet inn i mitose er best kjent. Komplekset av mitotisk cyclin og tilhørende cdk danner et kompleks kalt mitotisk-promoting-faktor (MPF). Konsentrasjonen av MPF varierer gjennom cellesyklus idet, konsentrasjonen av cyclin øker jevnt utover interfase og begynnelsen av mitose, som vist på figuren nedenfor. Ved overgangen metafase-anafase i mitose ødelegges cyclin plutselig, konsentrasjonen faller til bunnivå, før cyclin-konsentrasjonen øker igjen i neste interfase. Når cyclin har nådd en viss konsentrasjon bindes det til cdk og MPF dannes. MPF er først inaktivt, men via fosforylering/defosforylering av MPF aktiveres det. Aktiveringen skjer ved positiv tilbakekopling i det MPF virker på enzymer som aktiverer det slik at mer aktivt MPF dannes. Dermed oppstår en meget rask økning i konsentrasjonen av MPF som vist i figuren. Den nøyaktig mekanismen for degradering av cyclin på overgangen metafase-anafase er ikke kjent, men cyclin har en aminosyresekvens som fungerer som et signal om at det skal brytes ned ved proteolyse. Ved degraderingen av cyclin inaktiveres MPF og cellen kan fullføre og gå ut av mitose.

Sjekkpunktet ved metafase-anafase overgangen sikrer at cellene ikke går inn i anafase før metafase er fullført, dvs alle kromosomene skal befinne seg i planet midt mellom spindelpolene før kromatidtrådene trekkes til hver sin spindelpol.

Funksjonen til MPF er via fosforylering å drive cellen inn i mitose. MPF induserer kondensering av kromosomene, nedbrytingen av kjerne-konvolutt, og organiseringen av det mitotiske spindelapparatet. MPF kan virke direkte eller indirekte via en kaskade av fosforyleringer der MPF fosforylerer andre kinaser som så aktiveres og aktiverer nye kinaser osv, og tilslutt inntreffer den cellulære responsen. To eksempler der MPF fosforylerer proteiner direkte er fosforylering av lamin på innsiden av kjernekonvolutt som trigger nedbrytingen av kjernekonvolutt og fosforylering av histon H1 som muligens er involvert i kondenseringen av kromosomene.

Mekanismen for sjekkpunktet i sein G1 fase er dårligere kjent, men prinsippet er antatt å være det samme som ved mitose-sjekkpunktet. Komplekset av G1 cyclin og cdk gjør cellen i stand til å passere restriksjonspunktet slik at cellen går inn i S-fase.

