

CELLULAIRE en MOLECULAIRE BIOLOGIE

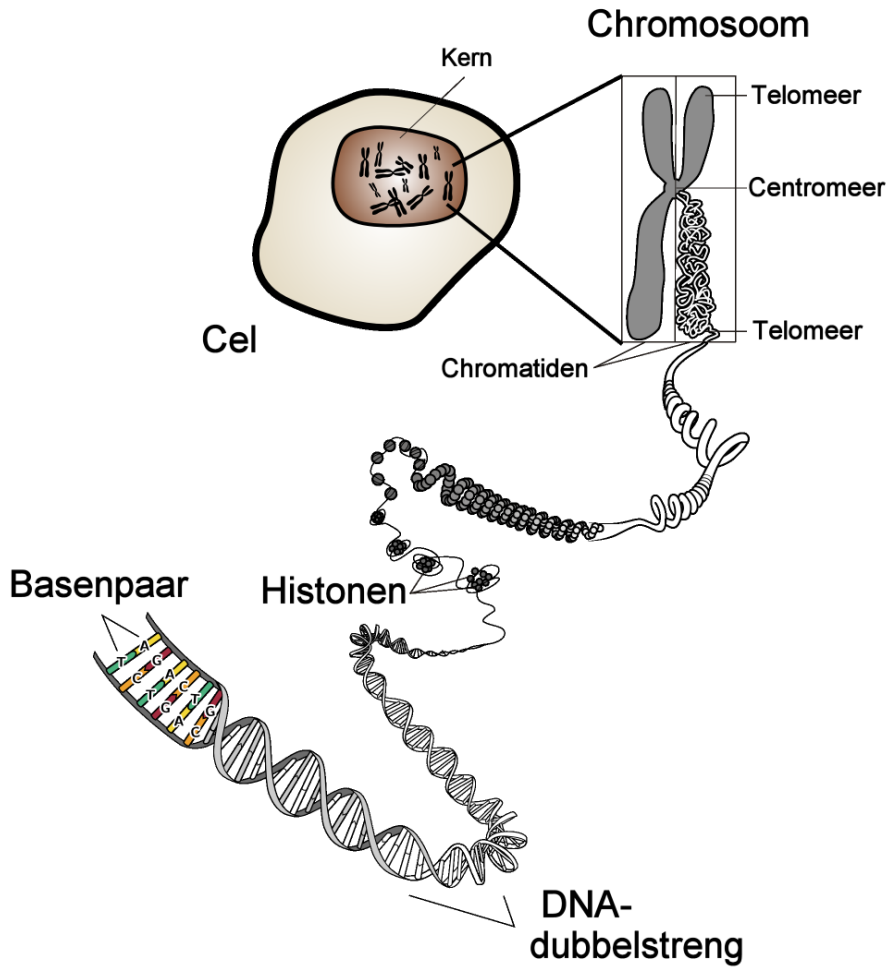
Prof. dr. Godelieve Gheysen

Bachelor of Science in de bio-ingenieurswetenschappen
Academiejaar 2019 – 2020



CELLULAIRE EN MOLECULAIRE BIOLOGIE

Academiejaar 2019-2020



Prof. Lieve Gheysen

godelieve.gheysen@ugent.be

Bronvermelding: de meeste illustraties komen uit het aanbevolen handboek "Becker's World of the Cell" van Hardin & Bertoni © 2017 Pearson Education, Ltd.

INHOUD

HOOFDSTUK 1 WAT IS LEVEN?..... FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 1.1. DEFINITIE..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 1.2. CELLULAIRE ORGANISATIE VAN LEVEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 1.3. MICROSCOPIE (ENKEL BASISPRINCIPES TE KENNEN) **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 1.3.1. *Inleiding*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 1.3.2. *Lichtmicroscopie* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 1.3.3. *Elektronenmicroscopie*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 1.4. EIGENSCHAPPEN VAN LEVEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 1.5. VIRUSSEN, VIROÏDEN EN PRIONEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 2 MOLECULEN VAN CELLEN FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 2.1. KOOLSTOFKETENS EN WATER **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 2.2. ORGANISATIE EN POLYMERISATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 2.3. ENKELVOUDIGE SUIKERS EN POLYSACCHARIDEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 2.4. AMINOZUREN & EIWITTEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 2.5. NUCLEOTIDEN & NUCLEÏNZUREN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 2.6. LIPIDEN EN MEMBRANEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 3 OORSPRONG VAN CELLEN FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 3.1. HOE IS LEVEN OP AARDE ONTSTAAN? **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 3.2. MEMBRANEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 3.2.1. *Belang van biologische membranen*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 3.2.2. *Structuur van membranen en vesikels* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 3.2.3. *Membranen bevatten integrale en perifere proteïnen.*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 3.2.4. *Transport door membranen* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 3.3. METABOLISME EN ENZYMEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 4 PROKARYOTE CELLEN..... FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 4.1. HET EERSTE LEVEN WAS PROKARYOTISCH .. **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 4.2. BACTERIËN EN ARCHAEA **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 4.3. PROKARYOTE CELSTRUCTUUR..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 4.3.1. *Bacteriële celwand* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 4.3.2. *In de prokaryote cel: het cytoplasma*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

HOOFDSTUK 5 EUKARYOTE CELLEN I FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 5.1. EUKARYOTEN ZIJN HEEL DIVERS **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 5.2. DE CELKERN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 5.3. MITOCHONDRIËN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 5.3.1. *Structuur en functie* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 5.3.2. *Aerobe respiratie* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 5.4. CHLOROPLASTEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 5.4.1. *Structuur en functie* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 5.4.2. *Fotosynthese*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

HOOFDSTUK 6 EUKARYOTE CELLEN II FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 6.1. ENDOMEMBRAANSYSTEEM **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 6.1.1. *Endoplasmatisch reticulum als synthese centrum.... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 6.1.2. *Het Golgi-apparaat modificeert en transporteert proteïnen..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 6.1.3. *Lysosomen zijn betrokken bij vertering. Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 6.1.4. *Vacuolen hebben variabele functies..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
- 6.2. PEROXISOMEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 6.3. CYTOSKELET **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 6.3.1. *Microtubuli* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 6.3.2. *Microfilamenten*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 6.3.3. *Intermediaire filamenten* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 6.4. EXTRACELLULAIR **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 6.4.1. *Dierlijke cellen hebben een extracellulaire matrix.... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 6.4.2. *Plantencellen hebben een stevige celwand..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 6.4.3. *Gisten, schimmels en oömyceten hebben ook een celwand... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*

HOOFDSTUK 7 MOLECULAIRE GENETICA. FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 7.1. GENETICA, VROEGER EN NU **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 7.2. OVERLAPPENDE DISCIPLINES **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 7.3. DEFINITIES..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 7.4. GENETICA EN MAATSCHAPPIJ..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 8 DNA-STRUCTUUR..... FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 8.1. CHROMOSOMEN BESTAAN UIT DNA EN EIWITTEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 8.2. EXPERIMENTEN DIE AANTONEN DAT ERFELIJKE INFORMATIE OP DNA LIGT **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 8.3. DE CHEMISCHE BOUWSTENEN VAN DNA **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 8.4. DE LAATSTE STUKJES VAN DE DNA-PUZZEL **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 8.5. DE DUBBELE HELIX **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

- 8.6. DE DNA-STRUCTUUR VOLDOET AAN DE VOORWAARDEN VOOR GENETISCH MATERIAAL..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 8.7. NUCLEOTIDESEQUENTIE VAN DNA **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 8.8. GENEN EN ALLELEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 9 DNA-ANALYSE VIA RESTRICTIE EN HYBRIDISATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

- 9.1. HYBRIDISATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 9.2. RESTRICTIE-ENZYMEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 9.3. RESTRICTIE EN HYBRIDISATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 10 GENOMEN..... FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 10.1. DNA-STRUCTUREN EN OPVOUWINGEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 10.2. PROKARYOTISCH GENOOM..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 10.3. EUKARYOTISCH GENOOM **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 10.3.1. *Ontstaan van eukaryoten* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 10.3.2. *Het nucleaire genoom*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 10.3.3. *Organelgenomen*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

HOOFDSTUK 11 DNA-REPLICATIE IN DE CELFOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 11.1. DNA-REPLICATIEPROCES **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 11.1.1. *Semiconservatieve DNA-replicatie*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 11.1.2. *Basisprincipes van DNA-replicatie***Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 11.2. DNA-REPLICATIE IN PROKARYOTEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 11.2.1 *DNA-polymerasen in E. coli* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 11.2.2. *Het replicatieproces in E. coli*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 11.2.3. *Replicatie van specifieke DNA-moleculen* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 11.3. DNA-REPLICATIE IN EUKARYOTEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 12 DNA-REPLICATIE IN VITRO EN SEQUENTIE-ANALYSE 8

- 12.1. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR): ZIE OOK PRACTICUM 8
- 12.2. SEQUENTIE-ANALYSE 10
- 12.3. ETHISCHE ASPECTEN VAN DNA-ANALYSE 13

HOOFDSTUK 13 MUTATIE, RECOMBINATIE & GENOOMEVOLUTIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

- 13.1. MUTATIES EN HUN HERSTEL **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 13.1.1. *Fouten bij DNA-synthese*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 13.1.2. *Spontane schade aan basen* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 13.1.3. *UV-schade aan DNA en NER*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 13.1.4. *Herstel dubbelstrengige (ds) DNA-breuk* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 13.2. GROTE DNA-HERSCHIKKINGEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 13.3. GENOOMANALYSE TOONT GENOOMEVOLUTIE..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 13.3.1. *Genomevolutie*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

13.3.2 Horizontale gentransfer **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

HOOFDSTUK 14 TRANSCRIPTIE FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

14.1. HET CENTRALE DOGMA VAN DE MOLECULAIRE BIOLOGIE.... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

14.2. TRANSCRIPTIE, OVERSCHRIJVEN VAN DNA-INFORMATIE NAAR RNA .. **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

14.2.1. RNA als boodschapper..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

14.2.2. RNA versus DNA-moleculen..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

14.2.3. Principe van RNA-synthese op een DNA-template. **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

14.3. TRANSCRIPTIE IN PROKARYOTEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

14.3.1. RNA-polymerase in *E. coli* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

14.3.2. Het transcriptieproces in *E. coli* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

14.4. TRANSCRIPTIE IN EUKARYOTEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

14.4.1. RNA-polymerasen in eukaryoten . **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

14.4.2. Belangrijkste verschillen bij transcriptie in eukaryoten t.o.v. *E. coli*.
..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

14.4.3. Transcriptie in eukaryoten d.m.v. RNA-polymerase II..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

INITIATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

TERMINATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

14.4.4. Transcriptie in eukaryoten d.m.v. RNA-polymerase I en III (enkel ter info) **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

HOOFDSTUK 15 RNA FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

15.1. mRNA, DE BOODSCHAPPER **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

15.1.1. mRNA in prokaryoten..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.1.2. mRNA in eukaryoten, algemeen... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.1.3. Interne modificatie bij eukaryote mRNA's: splicing.. **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.1.4. Modificaties aan de uiteinden van eukaryotische mRNA's..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.2. RIBOSOMAAL RNA OF rRNA **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

15.2.1. Ribosoomstructuur **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.2.2. rRNA-structuur **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.2.3. rRNA-genen (rDNA) **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.2.4. Transcriptie en "processing" van rRNA **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.3. TRANSFER-RNA OF tRNA **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

15.3.1. Structuur en functie van tRNA **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.3.2. Transcriptie en "processing" van tRNA **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.4. KLEINE RNAs & NIET-CODERENDE LANGE RNAs **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

15.4.1. Kleine ncRNAs **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

15.4.2. LncRNAs **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

HOOFDSTUK 16 SPLICING, EDITING EN KATALYTISCH RNA FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 16.1. GU-AG-SPLICING BIJ DE VORMING VAN MRNA**FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 16.2. ALTERNATIEVE SPLICING BIJ DE VORMING VAN MRNA .**FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 16.3. ANDERE TYPES VAN INTRONS..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 16.4. TRANS-SPLICING..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 16.5. RNA-EDITING **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 16.6. EVOLUTIEVE OVERWEGINGEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 16.7. RIBOZYMES..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 17 TRANSLATIE 14

- 17.1. EIWITTEN ZIJN POLYMEREN VAN AMINOZUREN (EVEN HERHALEN VAN HFST. 2) 14
- 17.2. DE GENETISCHE CODE15
- 17.2.1 *Het codewoord is een triplet van nucleotiden..... 15*
- 17.2.2 *Opheldering van de code 16*
- 17.2.3 *Kenmerken van de genetische code 16*
- 17.3. DE ROL VAN TRNA IN TRANSLATIE.....18
- 17.3.1 *De adaptorrol van tRNA via codon-anticodon interactie..... 18*
- 17.3.2 *Aminoacylatie van het tRNA 20*
- 17.4. TRANSLATIE IN PROKARYOTEN21
- 17.4.1 *Initiatie van translatie in E. coli 21*
- 17.4.2 *Elongatie van translatie in E. coli 22*
- 17.4.3 *Terminatie van translatie in E. coli 23*
- 17.5. TRANSLATIE IN EUKARYOTEN24
- 17.6. MUTATIES EN TRANSLATIE.....26
- 17.7. INHIBITOREN VAN TRANSLATIE.....26
- 17.8. POSTTRANSLATIONELE PROCESSING VAN EIWITTEN.....26
- 17.9. EIWITTRANSLOCATIE27

HOOFDSTUK 18 GENREGULATIE BASIS & PROKARYOTEN..... FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 18.1. BASISPRINCIPES CONTROLE VAN GENEXPRESSIE**FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 18.1.1 *Waarom regulatie van genexpressie?.....**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.***
- 18.1.2 *Mogelijke strategieën om de hoeveelheid genproduct te reguleren **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.***
- 18.2. REGULATIE VAN TRANSCRIPTIE-INITIATIE . **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 18.2.1 *Negatieve en positieve regulatie van genexpressie **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.***
- 18.2.2 *Lactose-operon in E. coli is een induceerbaar operon..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.***
- 18.2.3 *Tryptofaanoperon in E. coli is een repressiebaar operon **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.***
- 18.2.4 *Regulatorische sequenties en DNA-bindende eiwitten..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.***

HOOFDSTUK 19 GENREGULATIE EUKARYOTEN E.A..... FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 19.1. CONTROLE VAN TRANSCRIPTIE-INITIATIE . **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 19.1.1. *Transcriptiefactoren..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.1.2. *Voorbeelden van transcriptionele genregulatie bij eukaryoten Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.1.3. *Regulatie tijdens ontwikkeling..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.2. DNA-HERSCHIKKINGEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 19.3. POSTTRANSCRIPTIONELE REGULATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 19.3.1. *Ter hoogte van RNA-processing (vnl. eukaryoten) . Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.3.2. *Door controle van mRNA-stabiliteit..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.3.3. *Controle op niveau van translatie. Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.3.4. *RNAi Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.4. GENREGULATIE VIA CHROMATINE..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 19.4.1. *Chromatinestructuur..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 19.4.2. *DNA-methylatie..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*

HOOFDSTUK 20 EUKARYOTISCHE CELDELING ...FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 20.1. MITOTISCHE CELDELING..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 20.2. MEIOTISCHE CELDELING..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 21 OVERERVING EIGENSCHAPPEN: GENETICA....FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 21.1. INLEIDING..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.2. MONOHYBRIDE KRUISING → EERSTE WET VAN MENDEL (SPLITSINGSWET) **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.3. INTERMEZZO MENSELIJKE GENETICA..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.4. UITZONDERINGEN OP 1:2:1 SEGREGATIE, GENOTYPISCH EN/OF FENOTYPISCH **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.5. DIHYBRIDE KRUISING → TWEDE WET VAN MENDEL (ONAFHANKELIJKE SORTERING) **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.6. GEKOPPELDE GENEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.7. CYTOPLASMATISCHE ERFELIJKHEID **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.8. KWANTITATIEVE KENMERKEN OF QTLs ... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 21.9. PARENTALE IMPRINTING **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 22 GENSTRUCTUUR EN-EXPRESSIEFOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 22.1. KLASSIEKE DEFINITIE VAN EEN GEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 22.2. MOLECULAIRE DEFINITIE VAN EEN GEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 22.3. MOLECULAIRE DEFINITIE VAN EEN GEN (BIJ EUKARYOTEN). **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 23 VAN EPIGENETICA TOT EVOLUTIE.....FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 23.1. WAT IS EPIGENETICA? **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 23.2. EPIGENETISCHE IMPRINTS..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 23.3. EPIGENETICA EN GENERATIES..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 23.4. OVERDRACHT VAN EIGENSCHAPPEN NAAR VOLGENDE GENERATIES **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

23.5. SELECTIE VAN EIGENSCHAPPEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

**HOOFDSTUK 24 GENTECHNOLOGIE, GGO EN CRISPR..... FOUT!
BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

24.1. DEFINITIE GGO..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

24.2. RECOMBINANT DNA-TECHNOLOGIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

24.2.1. *Enzymen voor recombinant DNA-technologie ..* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.2.2. *Klonen* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.2.3. *Kloningsvectoren* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.3. VOOR ONDERZOEK EN TOEPASSINGEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

24.3.1. *Expressie van een gen* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.3.2. *Uitschakelen genexpressie* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.3.3. *Genome of gene editing* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.4. INDUSTRIËLE BIOTECHNOLOGIE..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

24.5. GENETISCH GEWIJZIGDE DIEREN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

24.5.1. *Genetische transformatie van dieren*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.5.2. *Voorbeelden van toepassingen bij dieren*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.6. GENETISCH GEWIJZIGDE PLANTEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

24.6.1. *Genetische transformatie van planten*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.6.2. *Voorbeelden van toepassingen bij planten*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.6.3. *GGO's op wereldschaal*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

24.6.4. *Veiligheid genetisch gewijzigde gewassen*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

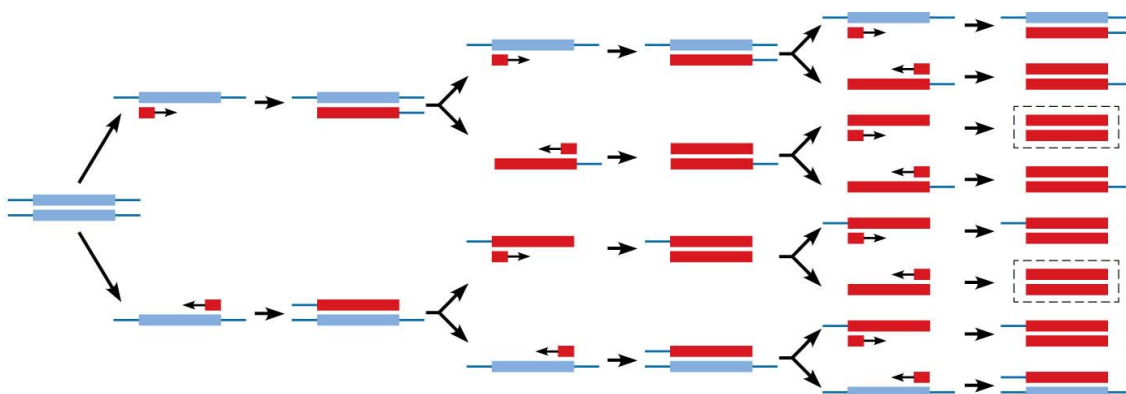
24.6.5. *Polemiek rond GGO's*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

HOOFDSTUK 12 DNA-REPLICATIE IN VITRO en SEQUENTIE-ANALYSE

12.1. Polymerase Chain Reaction (PCR): zie ook practicum

De polymerase-kettingreactie (PCR) amplificeert selectief een gekozen stukje DNA in de proefbuis (Saiki et al., 1985). Een belangrijke vereiste voor deze methode is dat de sequenties aan de uiteinden van het te amplificeren fragment gekend zijn. Gebaseerd op deze sequenties worden twee oligonucleotiden (=primers) gemaakt (via chemische synthese) die naar elkaar toewijzen en ongeveer 100-1000 basen van elkaar verwijderd zijn. Wanneer deze oligonucleotiden toegevoegd worden aan het DNA in de proefbuis, kunnen ze basenparen met de doelsequenties en op deze manier lijnen ze af welke sequentie geamplificeerd zal worden. Meestal worden oligo's van een 20-tal nucleotiden gebruikt, zodat de kans dat deze sequentie per toeval ergens anders in het genoom voorkomt zeer klein is.

Amplificatie wordt uitgevoerd met een **DNA-polymerase** uit thermofiele bacteriën, bijvoorbeeld het *TaqI*-polymerase uit *Thermus aquaticus*. Deze bacteriën leven in heetwaterbronnen en hun enzymen zijn bijgevolg thermostabiel. Om een PCR-reactie uit te voeren worden de oligo's (de primers) en het polymerase toegevoegd bij het (door hitte) gedenateerde DNA. De primers basenparen op het template-DNA en van daaruit start de synthese van nieuw DNA. Na synthese wordt het mengsel verhit (95°C) en terug afgekoeld zodat op het enkelstrengig DNA, zowel de oude als de nieuwe strengen nu, de primers terug kunnen basenparen en een nieuwe ronde van DNA-synthese kan starten. Door gebruik van een thermostabiel DNA-polymerase wordt vermeden dat bij iedere nieuwe cyclus vers enzyme moet toegevoegd worden,



bijgevolg kan de reactie geautomatiseerd worden.

De reactie kan herhaald worden voor een 30-40 cycli, waarbij het DNA tussen en ter hoogte van de primers **exponentieel** vermenigvuldigd wordt, tot miljoenen kopijen in enkele uren. PCR is de belangrijkste doorbraak sinds de ontwikkeling van het klonen. Zoals bij klonen worden grote hoeveelheden van identieke DNA-moleculen geproduceerd. Het voordeel van PCR is dat het sneller is en dat in theorie één enkele molecule voldoende is om amplificatie te starten. Een mogelijk nadeel in bepaalde gevallen is dat DNA-sequentie van de uiteinden van het fragment moet gekend zijn, maar er zijn technieken ontwikkeld om dat te omzeilen.

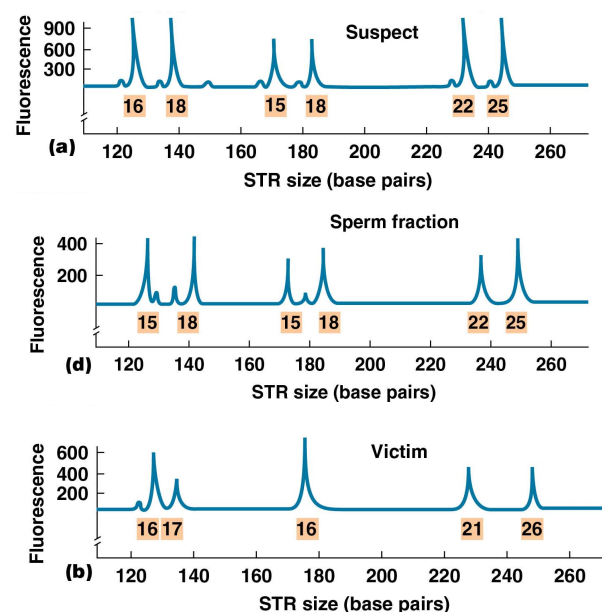
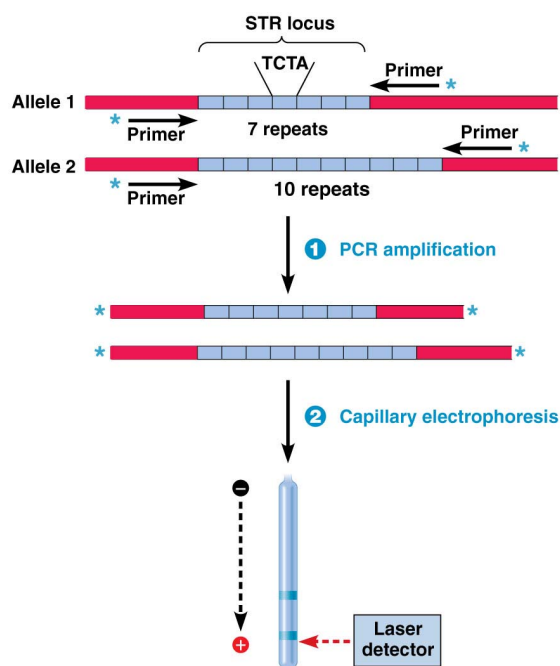
Door de grote gevoeligheid van de PCR-reactie moet er wel altijd opgepast worden voor contaminatie. Eén molecule die via een stofje of aerosoldruppeltje in de proefbuis terecht komt kan een vals positief resultaat geven.

Voorbeelden van toepassingen:

- Pre-implantatiediagnose: uit een in vitro opgekweekt embryo wordt 1 cel genomen die via PCR genalyseerd kan worden op geslacht van de baby, erfelijke ziekte...
- Misdaadanalyse: een haar, huidschilfer, spermacel, bloeddruppel of speekselvlek bevat voldoende DNA om een PCR op uit te voeren.

Niet elk stukje DNA is geschikt om te gebruiken voor identificatie van een individu (voor bv. misdaadanalyse). Men moet daarvoor een analyse doen op zogenaamde hypervariabele sequenties. De meeste genen zullen immers tussen individuele personen weinig of geen verschillen in DNA-sequentie vertonen. Men maakt daarom gebruik van **VNTR** (variable number of tandem repeats): clusters van herhalingen van bepaalde sequentiemotieven die hypervariabel zijn omdat die van individu tot individu verschillen in aantal herhalingen en dus in lengte van het gebied. De meest gebruikte VNTRs zijn de zogenaamde **microsatellieten** met een motief van 1 tot 5 bp. Het aantal herhalingen verandert niet elke generatie maar wel in de loop van vele generaties doordat het DNA-polymerase "stottert" tijdens de synthese van deze herhalingen (zie hoofdstuk 13). Synoniemen zijn short tandem repeat (**STR**) of simple sequence repeat (**SSR**). De detectie gebeurt via PCR gevolgd door gelelektroforese. Dergelijke fingerprints worden gebruikt in vaderschapstesten of in misdaadanalyse.

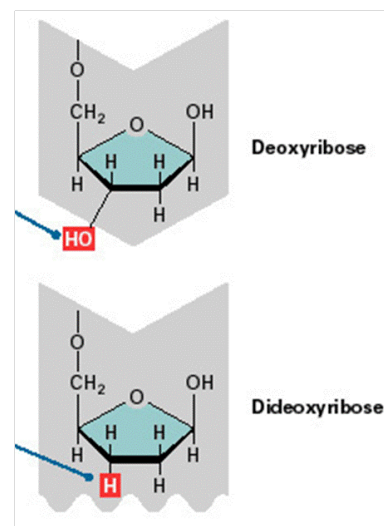
Hieronder wordt een STR-analyse via capillaire gelelektroforese getoond. Daarbij wordt het gel niet in een bakje gelopen maar in een capillair buisje. Omdat STR slechts in 1-5 basenlengte van elkaar kunnen verschillen, moet hiervoor PAGE gebruikt worden (polyacrylamidegelelektroforese). Links het principe voor 1 locus, rechts de analyse van 3 loci bij 3 stalen (oranje nummer = aantal motiefherhalingen).



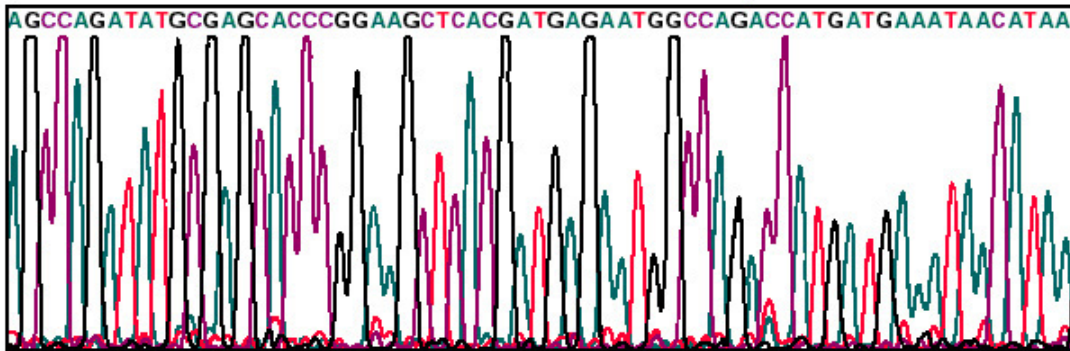
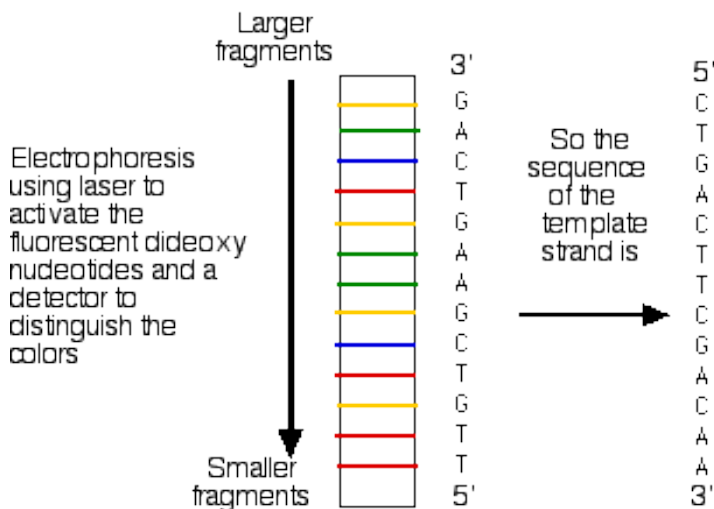
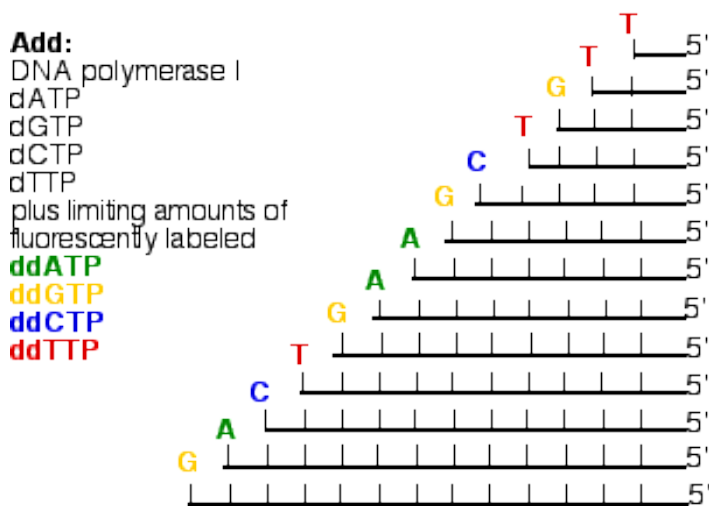
12.2. Sequentie-analyse

De meest gebruikte methode voor het bepalen van de DNA-nucleotidesequentievolgorde is de **dideoxymethode van Sanger** die gebaseerd is op DNA-synthese. Hierbij worden gelijktijdig vier analoge reacties uitgevoerd. De eerste stap is het basenparen van een primer op enkelstrengig DNA (meestal wordt vertrokken vanuit de vectorsequentie waartegen dus een universele primer kan gebruikt worden). Dan wordt de DNA-synthese in de vier verschillende reacties gestart door het toevoegen van een DNA-polymerase en de vier nucleotiden. In elk van de vier reacties wordt echter telkens ook een dideoxynucleotide (ddNTP) toegevoegd. Een dergelijke nucleotide kan wel ingebouwd worden maar kan niet meer verlengd worden wegens het ontbreken van een 3'OH. Dus bijvoorbeeld de A-reactie bevat een bepaalde verhouding van dATP en ddATP (naast dTTP, dCTP en dGTP) zodat meestal een dATP ingebouwd wordt doch in bepaalde moleculen een ddATP zodat daar de ketenverlenging stopt. In de A-reactie bekomt men dus uiteindelijk nieuwe DNA-ketens van verschillende lengte, die echter allemaal ter hoogte van een A stoppen. In de C-reactie stoppen ze bij de C's.

Genetics, analysis of genes and genomes, D.L. Hartl & E.W. Jones

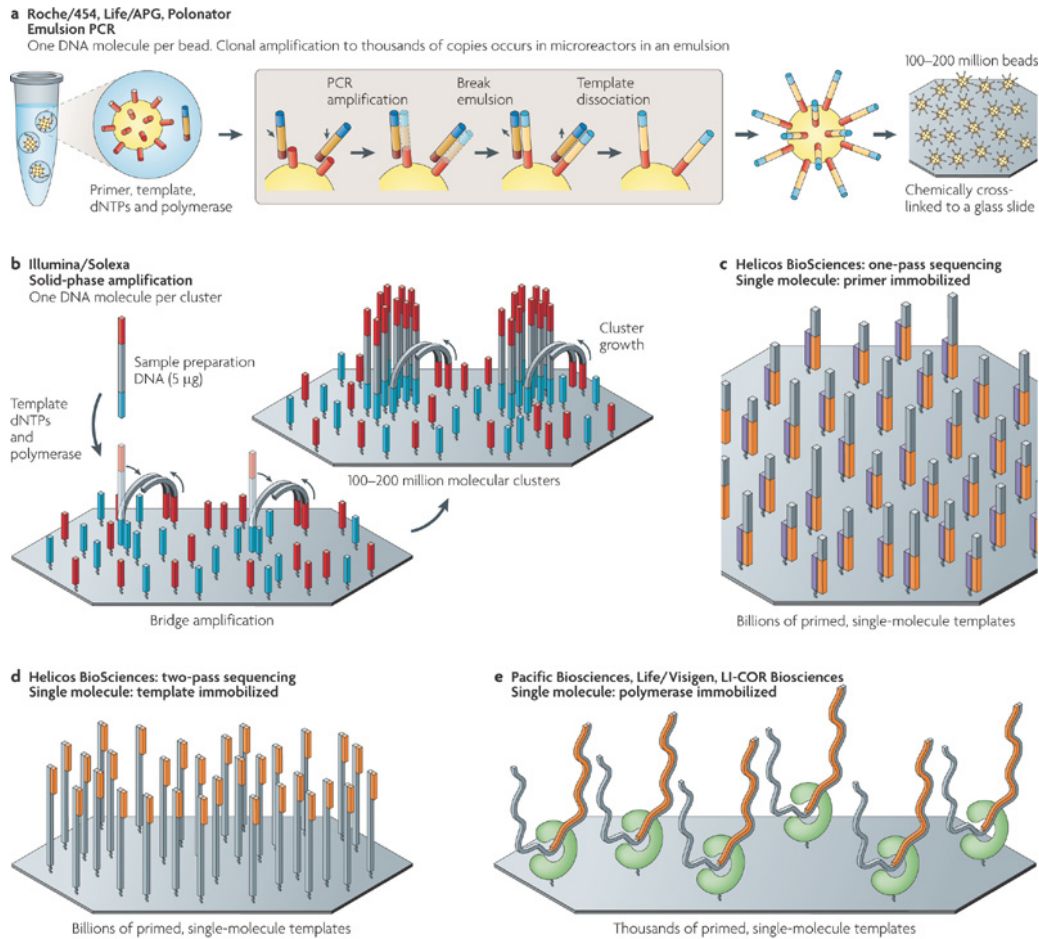


De verschillende reacties worden dan op een polyacrylamidegel geladen en gescheiden volgens grootte. Aangezien de kortste ketens snelst lopen en een polyacrylamidegel een zeer hoge resolutie heeft, kan nu van onderaan het gel te beginnen en naar boven af te lezen op de verschillende laantjes de sequentie van het betreffende DNA afgelezen worden. In de praktijk werd vroeger een radioactieve isotoop ingebouwd en dan werd de autoradiografische afdruk van het gel op een film afgelezen. Een andere, momenteel alom gebruikte mogelijkheid is werken met verschillende **fluorescentiemerkers** voor de vier ddNTP's waarbij de 4 reacties in één buisje kunnen gecombineerd worden. Daarna wordt het staal op een polyacrylamidegel geladen (vaak capillair) en fluorescentie kan gedetecteerd worden met een laser en detector die de sequentie doorgeeft aan een computer. De dideoxymethode wordt nog steeds gebruikt voor het sequencen van specifieke sequenties bv. ter controle van een PCR-product of een nieuwe recombinante molecule.



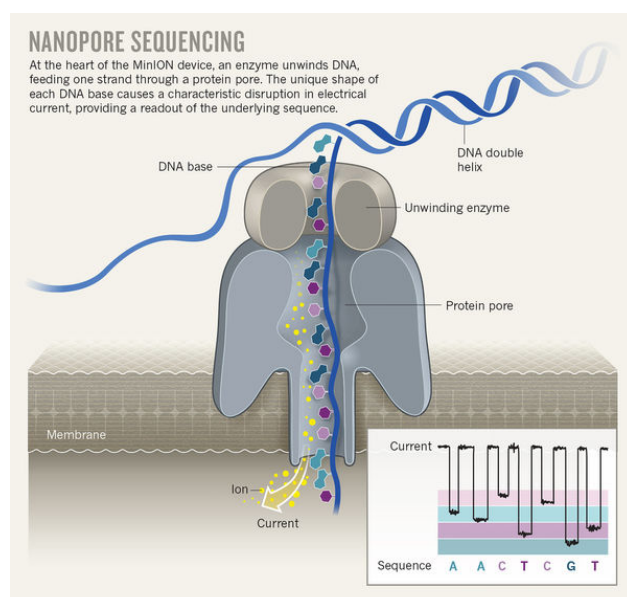
Er zijn echter intussen heel wat andere methoden ontwikkeld bv. pyrosequencing (454), illumina, die massale hoeveelheden sequenties tegelijk uitvoeren, die worden gebruikt om bv. een gans genoom (in overlappende stukjes) te sequencen. Deze nieuwere methoden worden de **next generation sequencing** genoemd en alhoewel de principes nogal kunnen verschillen, hebben ze als gemeenschappelijk principe dat in tegenstelling tot de Sanger sequencing geen gelelektroforese gebruikt wordt. De vele (miljoenen) parallele sequentiereacties worden uitgevoerd in platen met heel kleine vakjes of via moleculen die geïmmobiliseerd zijn op chips. Deze methoden zijn veel sneller en verbruiken per sequentiereactie veel kleinere hoeveelheden producten en geen gel, waardoor de kost per reactie gigantisch gedrukt wordt. Terwijl een Sanger-reactie enkele euro's kost per 1000 bp, kan met hetzelfde bedrag een paar

miljoen basen gesequeneerd worden met de nieuwere technieken. Het genoom van een mens kan momenteel voor een paar 1000 euro in enkele dagen geanalyseerd worden, en het wordt steeds goedkoper, terwijl de eerste genomsequentie van de mens vele jaren geduurd heeft. Hieronder enkele voorbeelden van dragers die gebruikt worden bij de next generation sequencing.



Nature Reviews | Genetics

Een van de nieuwste methoden is **nanopore sequencing** waarbij de DNA-streng door een nanopore getrokken wordt en de basen afgelezen worden via elektrische verschillen. Een belangrijk verschil met de meeste andere methoden is dat hier geen DNA-synthese nodig is voor de sequentie bepaling.



12.3. Ethische aspecten van DNA-analyse

De ontwikkelingen in de nieuwe sequentietechnologieën hebben gezorgd voor revoluties in de DNA-analyse die steeds meer effect krijgen op de maatschappij. Niet alleen kan de analyse steeds sneller en goedkoper gebeuren maar er is ook steeds meer geweten over welke variaties invloed hebben op bepaalde eigenschappen.

We kunnen ons DNA laten analyseren via een genetisch adviescentrum in een ziekenhuis, voor een betere diagnose of preventie van bepaalde ziekten. Daartegenover zijn er ook heel wat bedrijfjes die DNA-testen aanbieden via het internet. Interpretatie van de resultaten is echter niet altijd zo simpel en/of correct.

DNA-analyse wordt in België uitgevoerd op pre-implantatie-embryo's om zo te vermijden dat bepaalde erfelijke aandoeningen doorgegeven worden aan de kinderen. De lijst van aandoeningen waarvoor er getest wordt, kan verschillen tussen ziekenhuizen, maar het betreft altijd ziekten die de levenskwaliteit sterk negatief beïnvloeden (zoals mucoviscidose) of zelfs pre- of perinatale sterfte veroorzaken. In bepaalde andere landen kunnen toekomstige ouders via privé-klinieken echter laten testen op het geslacht van het embryo of zelfs de kleur van de ogen. Ethische discussies en regelgeving lopen achter op de maatschappelijke ontwikkelingen.

Via NIPT (niet-invasieve prenatale test) kan bij zwangere vrouwen (op 11-12 weken zwangerschap) ook analyse gebeuren op het DNA van de foetus. Tijdens de zwangerschap komt er door het afsterven van placentale cellen zowel DNA van de foetus als van de moeder vrij. Door een simpele bloedafname kan dit DNA geanalyseerd worden. Bij detectie van genetische afwijkingen kan dan al of niet beslist worden tot het afbreken van de zwangerschap.

In hoofdstuk 24 zullen we zien dat het ook mogelijk is om genetische "defecten" te corrigeren in pre-implantatie-embryo's.

Al deze ontwikkelingen gebeuren razendsnel terwijl de maatschappij (en de regelgeving) onvoorbereid is op de ethische discussies rond veel van deze mogelijkheden.

Een ander toepassingsdomein is de misdaadanalyse (forensische geneeskunde). Tot nog toe kunnen DNA-patronen van verdachten enkel vergeleken worden met databanken van stalen van vroegere misdaden. Maar steeds meer personen die hun DNA laten testen maken bepaalde details daarvan publiek bv. om hun familieboom te reconstrueren. Zelfs als je zeer voorzichtig bent met je eigen DNA-gegevens, is er wellicht meer informatie publiek dan je denkt. Bovendien kan men steeds beter op basis van het DNA de uiterlijke kenmerken (geslacht, huidskleur, gezichtsvorm, leeftijd...) van iemand voorspellen, zo zijn er algoritmes ontwikkeld die op basis van DNA een robotfoto produceren.

HOOFDSTUK 17 TRANSLATIE

17.1. Eiwitten zijn polymeren van aminozuren (even herhalen van Hfst. 2)

Eiwitten zijn verantwoordelijk voor het reguleren van genexpressie, de katalyse van cellulaire reacties, de opbouw van celmembranen, ... veel verschillende functies:

Structurele proteïnen bv. viruseiwitten, celmembraaneiwwitten, ...

Contractiele proteïnen bv. actine en myosine in de spieren, ...

Enzymen (metabolisme, synthese van celcomponenten) bv. fosfatase, ligase,

Transportproteïnen bv. hemoglobine, ...

Beschermende proteïnen bv. antilichamen, ...

"Storage" proteïnen bv. zaadopslageiwitten, ...

Eiwitten zijn polymeren opgebouwd door een aaneenschakeling van vele aminozuren. Een aminozuur is opgebouwd volgens een algemeen bouwplan waarbij een centraal α -C atoom de drager is van vier verschillende groepen:

een waterstofatoom - H

een carboxylgroep - COO⁻

een aminogroep - NH₃⁺

een R-groep die verschilt naargelang het aminozuur.

Er bestaan twintig verschillende aminozuren waarbij het verschil zich enkel situeert in de R-groep. Deze R-groep varieert enorm in chemische complexiteit gaande van een gewoon H-atoom tot complexe aromatische zijketens. Sommige R-groepen zijn polair (glycine, serine, threonine) terwijl andere apolair zijn (alanine, valine, leucine), de meeste R-groepen zijn ongeladen maar er komen ook positief geladen (lysine, arginine, histidine) of negatief geladen groepen (aspartaatzuur, glutaminezuur) voor.

Veel aminozuren aan elkaar vormen lange ketens die polypeptiden genoemd worden. De aminozuren in een polypeptide zijn aan elkaar gebonden door een peptidebinding. Deze binding komt tot stand door condensatie tussen de carboxylgroep van het ene aminozuur met de aminogroep van een tweede aminozuur. Zo kunnen tot 2000 aminozuren aan elkaar gezet worden om één polypeptide te vormen.

De twee uiteinden van een polypeptide zijn, net als bij een polynucleotide, verschillend. Het ene uiteinde heeft een vrije aminogroep en wordt de amino-, NH₂- of kortweg N-terminus genoemd, het andere uiteinde heeft een vrije carboxylgroep en wordt de carboxyl-, COOH- of C- terminus genoemd.

Bij een eiwitmolecule kunnen vier structuurniveaus onderscheiden worden:

- Primaire structuur: aminozuursequentie, volgorde van de aminozuren.
- Secundaire structuur: door H-bruggen tussen de COOH- en NH₂-groepen van de aminozuren. De twee meest voorkomende vormen zijn α -helix en β -sheet.
- Tertiaire structuur: 3D-vorm van één polypeptide, verdere opvouwing van de secundaire structuur door bv. S-bruggen tussen twee cysteïneresidus.
- Quaternaire structuur: interactie tussen verschillende polypeptiden die een multi-subeenheidstructuur vormen. De polypeptiden kunnen gelijk of verschillend zijn bv. RNA-polymerase van *E. coli* heeft 5 subunits: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$.

17.2. De genetische code

De volgorde van de aminozuren in een polypeptide wordt bepaald door de nucleotidensequentie in de mRNA-molecule. De regels die bepalen welke sequentie van nucleotiden welk aminozuur determineert, liggen vast in de genetische code.

17.2.1 Het codewoord is een triplet van nucleotiden

Rond de jaren 1950 werd door de moleculaire biologen van die tijd een hypothese vooropgesteld die gebaseerd was op twee theoretische argumenten:

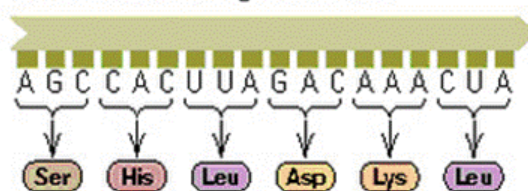
- er worden 20 verschillende aminozuren ingebouwd bij translatie, met 2 basen per codon zijn er slechts 16 (4^2) codons mogelijk, dus moet een **codon** uit 3 basen bestaan.
- er werd verondersteld dat genen colineair zijn met de eiwitten waarvoor ze coderen, wat wil zeggen dat de volgorde van de nucleotiden in het gen direct correleert met de volgorde van de aminozuren van het overeenkomstige proteïne (behalve introns).

Deze veronderstellingen werden bewezen door experimenten die het leesraam verstoren nl. er werden mutatiestudies uitgevoerd met de bacteriofaag T4, door middel van de kleurstof acridine. Intercalatie van dit mutageen veroorzaakt een basenpaarinserctie of -deletie. De interpretatie van deze experimenten gebeurde zonder dat sequentie-informatie beschikbaar was.

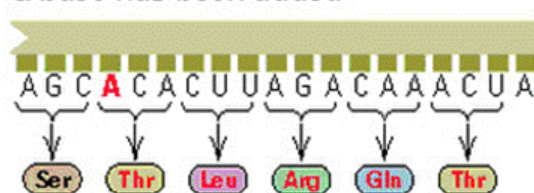
Een mutatie in een niet tolerant gebied van een gen heeft altijd functieverlies tot gevolg. Insectie of deletie van 1 of 2 nucleotiden (of een veelvoud ervan) leidt altijd tot verlies van de correcte informatie door leesraammutatie (zie figuur), ook indien de mutatie in een tolerant gebied gebeurt.

Empirisch zag men dat recombinatie van bepaalde mutanten terug wild type als gevolg had. De mutanten werden daarom in twee klassen ingedeeld + en - (overeenkomend met insertie en deletie). Twee + mutanten heffen elkaar dus niet op, maar een recombinatie van drie + (of 3-) mutanten kon wel terug in een wildtype resulteren. Dit komt doordat een mutatie in een tolerant gebied van het gen een verschuiving van het leesraam tot gevolg heeft wat het verlies van de correcte informatie betekent, terwijl een insertie of deletie van 3 nucleotiden (of een veelvoud van 3) het leesraam herstelt en dus ook de informatie. Het bewijs van colineariteit werd geleverd doordat één veranderd nucleotide leidde tot de wijziging van slechts één aminozuur wat wijst op een niet overlappende code.

mRNA from original DNA



mRNA from DNA in which a base has been added



17.2.2. Opheldering van de code

Na enkele andere experimenten (gebaseerd op *in vitro* translatie) die een deel van de genetische code ophelderden werd in 1964 door Nirenberg en Leder via de "triplet binding assay" de code volledig ontrafeld. Daarbij werden mini-RNA's van 3 basen geïncubeerd met ribosomen en tRNA's opgeladen met hun aminozuren. Door deze test met de verschillende opgeladen tRNA's uit te voeren en daarna het mengsel te filteren, kon bepaald worden welke aminozuur er via het tRNA-RNA-ribosoom complex weerhouden werd door een bepaald mini-RNA.

17.2.3. Kenmerken van de genetische code

Ondubbelzinnig: één triplet komt overeen met slechts één AZ.

Degeneratie: meestal meerdere codons mogelijk voor één AZ, 61 codons coderen voor de 20 aminozuren. Daarbij dient opgemerkt dat de verschillende codons voor één aminozuur meestal gelijkend zijn (dikwijls enkel verschillend in de derde base van het codon) en dat bovendien gelijkaardige aminozuren door gelijkaardige codons gecodeerd worden (bv. lysine en arginine zijn beide positief geladen AZ). Dit vormt een buffer tegen mutaties.

Start- en stop codons:

- AUG codeert voor methionine, als start of middenin (soms GUG als start)
- UAA, UAG, UGA zijn stopcodons of nonsens codons (resp. ochre, amber, opal).

Niet overlappend en geen interne punctuatie: vanaf de start tot aan de stop wordt systematisch per drie afgelezen zonder controle van de betekenis.

Universeel: de code is nagenoeg maar niet helemaal universeel.

Voorbeelden van uitzonderingen op de universaliteit:

- in de menselijke mitochondriën codeert UGA (normaal stopcodon) voor tryptofaan, terwijl UGA en AGG (normaal arginine) hier stopcodons zijn.
- protozoa bezitten andere terminatiecodons (UAA en UAG coderen voor glutamine).
- in bepaalde menselijke genen, zoals vvb. voor het enzyme glutathionperoxidase, codeert het stopcodon UGA voor het ongewoon aminozuur selenocysteïne (een cysteïne waarbij het zwavelatoom vervangen is door selenium). Dit zou komen doordat de mRNA's van deze genen een speciale "stem-loop" structuur bezitten die ervoor zorgt dat het stopcodon niet als dusdanig herkend wordt maar als het codon voor selenocysteïne.

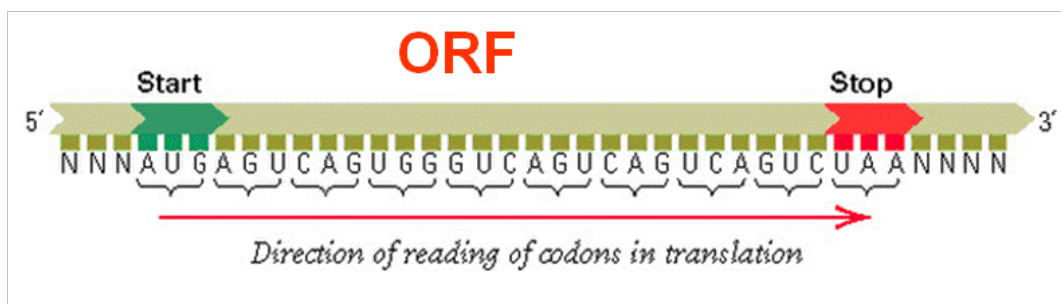
Gezien er geen chemische reden is voor de bestaande relatie tussen de codons en de aminozuren via de adaptor-tRNA's is de universaliteit van deze code het beste bewijs dat alle leven op aarde uit één oer cel is ontstaan.

Een belangrijk gevolg van de universele genetische code is dat DNA of RNA van het ene organisme in het andere kan overgebracht worden zonder dat de betekenis van de coderende informatie verandert. Wat wel moet aangepast worden zijn de

expressiesignalen aangezien die in elk organisme verschillend zijn. Bovendien moet er rekening gehouden worden met het codongebruik binnen de verschillende klassen van organismen. Zo wordt UUG meer gebruikt als codon voor leucine bij planten, terwijl bij bacteriën het codon CUG meer gebruiken. Dit zorgt voor problemen (minder efficiënte translatie) bij genetische modificatie waarbij planten-genen tot expressie gebracht worden in bacteriën en omgekeerd. Om deze problemen te voorkomen, moeten de sequenties van de gewenste genen aangepast worden aan het codongebruik van het organisme waarin de genen tot expressie moeten komen.

| 1st position (5' end) ↓ | 2nd position | | | | 3rd position (3' end) ↓ |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | U | C | A | G | |
| U | Phe Phe Leu Leu | Ser Ser Ser Ser | Tyr Tyr STOP STOP | Cys Cys STOP Trp | U C A G |
| C | Leu Leu Leu Leu | Pro Pro Pro Pro | His His Gln Gln | Arg Arg Arg Arg | U C A G |
| A | Ile Ile Ile Met =START | Thr Thr Thr Thr | Asn Asn Lys Lys | Ser Ser Arg Arg | U C A G |
| G | Val Val Val Val | Ala Ala Ala Ala | Asp Asp Glu Glu | Gly Gly Gly Gly | U C A G |

Een eiwit wordt geproduceerd door het per 3 aflezen van de genetische code op het mRNA vanaf het startcodon (AUG) tot er een stopcodon tegengekomen wordt in hetzelfde open leesraam (ORF). In een onbekend stuk DNA duidt de aanwezigheid van een voldoende lang ORF op de aanwezigheid van een gen.

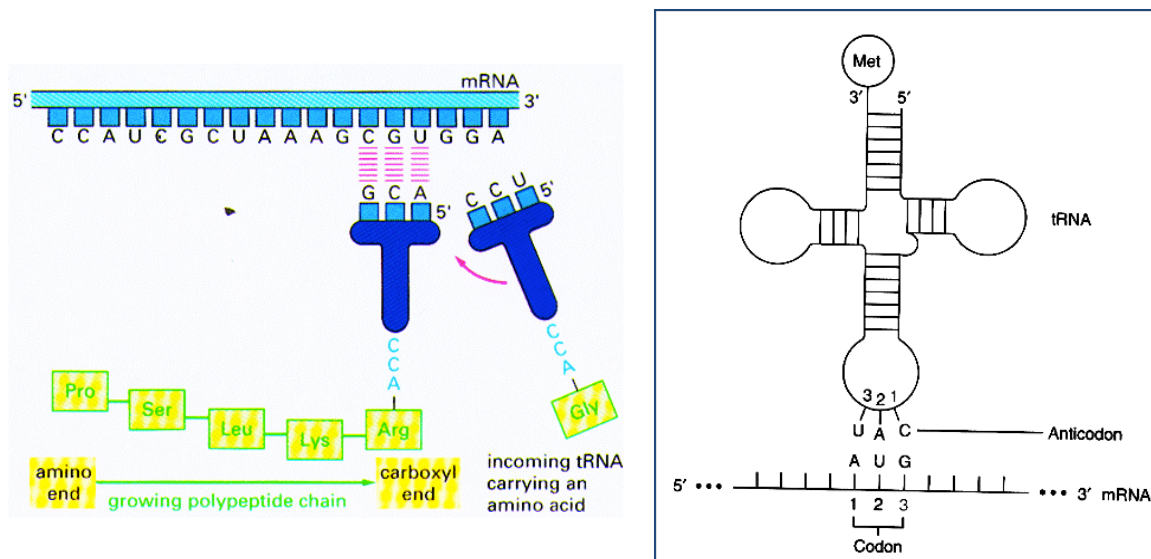


17.3. De rol van tRNA in translatie

Bij translatie of vertaling van de informatie in het DNA naar proteïnen, hebben heel wat eiwitten en RNA-moleculen een functie te vervullen. Wegens de hoeveelheid verschillende moleculen en hun interacties is translatie een complex gebeuren. Naast het mRNA dat de informatie draagt, de tRNA's (31-60 verschillende) die de aminozuren aanbrengen en de ribosomen (meer dan 50 proteïnen en 3 rRNA's) die de eiwitbiosynthese sturen, zijn nog specifieke eiwitfactoren nodig en 20 aminozuur-tRNA-koppelingsenzymen. De eiwitbiosynthese vormt een groot deel van de celactiviteit aangezien veel van deze moleculen in grote hoeveelheden nodig zijn, bv. 200.000 opgeladen tRNA's en 20.000 ribosomen in een prokaryotische cel.

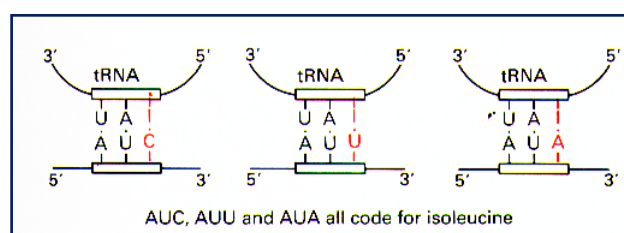
17.3.1. De adaptorrol van tRNA via codon-anticodon interactie

De nucleotidesequentie in het mRNA wordt per codon afgelezen en met elk codon komt een aminozuur overeen. Het tRNA vormt via zijn complementaire anticodon de sleutel voor de vertaling van de nucleotidevolgorde naar een aminozuurvolgorde.

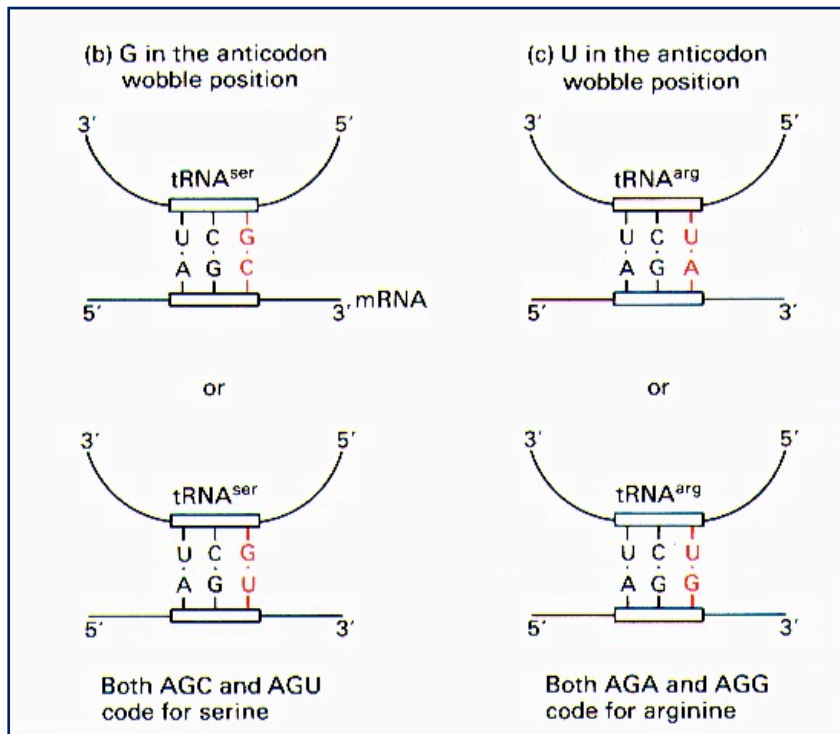


De codonherkenning gebeurt door het **anticodon** van de tRNA-molecule. Dit trinucleotide is complementair aan het codon dat codeert voor het aminozuur en zodoende kan basenparing plaatsvinden tussen codon en anticodon.

Voor elk aminozuur bestaat minstens één specifiek tRNA. Veelal zijn er meerdere zogenaamde iso-accepting tRNA's, die met hetzelfde aminozuur kunnen binden, bv. $tRNA_1^{Leu}$ en $tRNA_2^{Leu}$, dit zijn 2 tRNAs die door een verschillend gen geproduceerd worden en die voor de rest vrij verschillend kunnen zijn, tot en met het anticodon toe, want er zijn meerdere codons voor leucine en dus ook meerdere anticodons mogelijk die daarmee basenparen.



Naast het bestaan van iso-accepting tRNA's die verschillende anticodons kunnen hebben om verschillende codons voor eenzelfde aminozuur te herkennen, gebeurt het ook dat éénzelfde tRNA verschillende codons herkent via de zogenaamde **wobble**. Daardoor zijn er geen 61 tRNA's nodig maar slechts 31. De codonherkenning gebeurt normaal via complementaire basenparing, de wobble laat echter specifieke uitzonderingen toe op de wobblepositie (tussen de eerste base van het anticodon en de derde base van het codon). De meest voorkomende wobbles zijn: G-U basenparing naast de standaard G-C en Inosine (I) dat kan paren met zowel C, A en U.

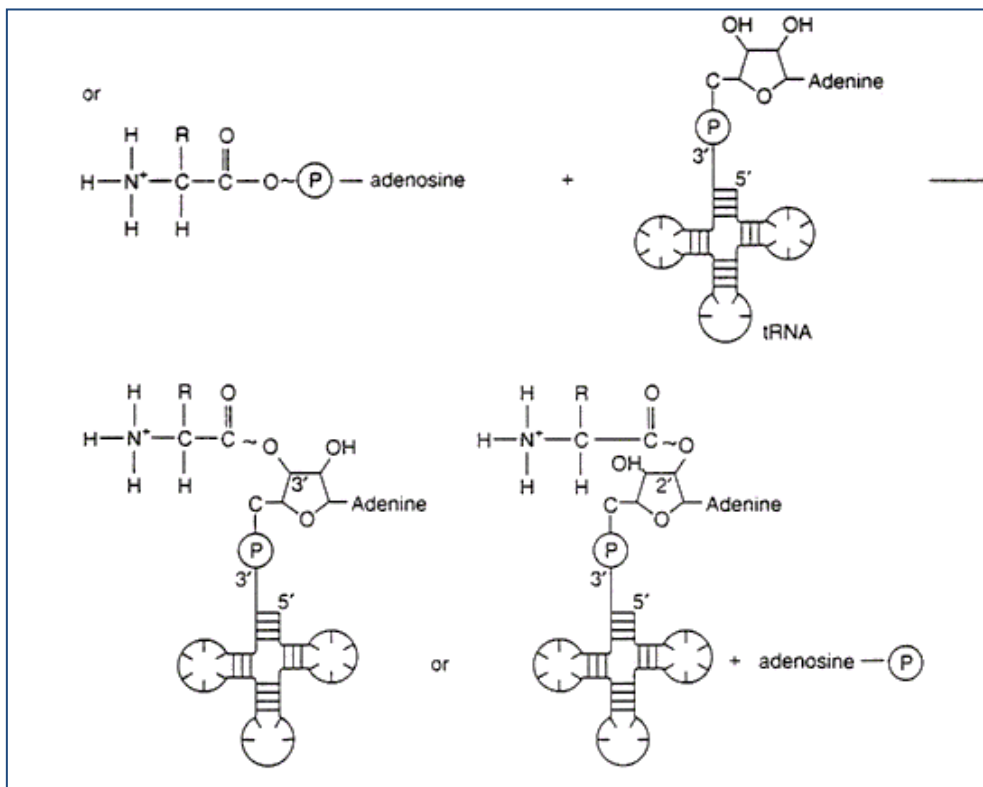


Anderzijds gebeurt het ook dat verschillende tRNA's eenzelfde codon herkennen via eenzelfde anticodon en dus een volledig identieke functie hebben (redundante tRNA's). Een uitzonderlijk geval waarbij twee tRNA's die hetzelfde codon herkennen toch een verschillende functie hebben (en dus niet redundant zijn) zijn de tRNA's die methionine dragen en AUG herkennen. Hierbij herkent het initiator-tRNA (tRNA_i) het AUG startcodon, terwijl de andere tRNA^{Met} moleculen enkel interne AUG-codons herkennen (zie verder). Net zoals bij de herkenning door de aminoacyl-tRNA-synthetasen (zie hieronder), gebeurt de specifieke herkenning van deze tRNA's via specifieke sequenties en/of de secundaire structuur.

17.3.2. Aminoacylatie van het tRNA

Elke tRNA-molecule kan een covalente binding maken met zijn specifiek aminozuur, wat laden van het tRNA of aminoacylatie wordt genoemd. Bij dit opladen mogen er natuurlijk geen fouten optreden en dit gebeurt dan ook door de belangrijke aminoacyl-tRNA-synthetases. Dit is een groep van zeer diverse enzymen die elk één bepaald aminozuur activeren (via koppeling aan ATP) en dan een covalente binding maken tussen de carboxylgroep van het aminozuur en de 2'OH- of 3'OH-groep van het laatste nucleotide op de acceptorarm (3'einde) van het overeenkomstige tRNA.

Deze enzymen hebben elk 3 bindings-plaatsen: voor ATP, een specifiek aminozuur en de overeenkomstige tRNA's. De specificiteit van het laden wordt dus bepaald door het enzyme, dat zowel het aminozuur als de overeenkomstige tRNA's (meestal via andere sequenties dan het anticodon) herkent en dan de reactie van het laden uitvoert. Onjuiste te grote aminozuren kunnen niet opgeladen worden. Indien andere verkeerde aminozuren per ongeluk aan het tRNA worden gekoppeld, gebeurt er hydrolyse van de tRNA-aminozuurbinding door het enzyme.



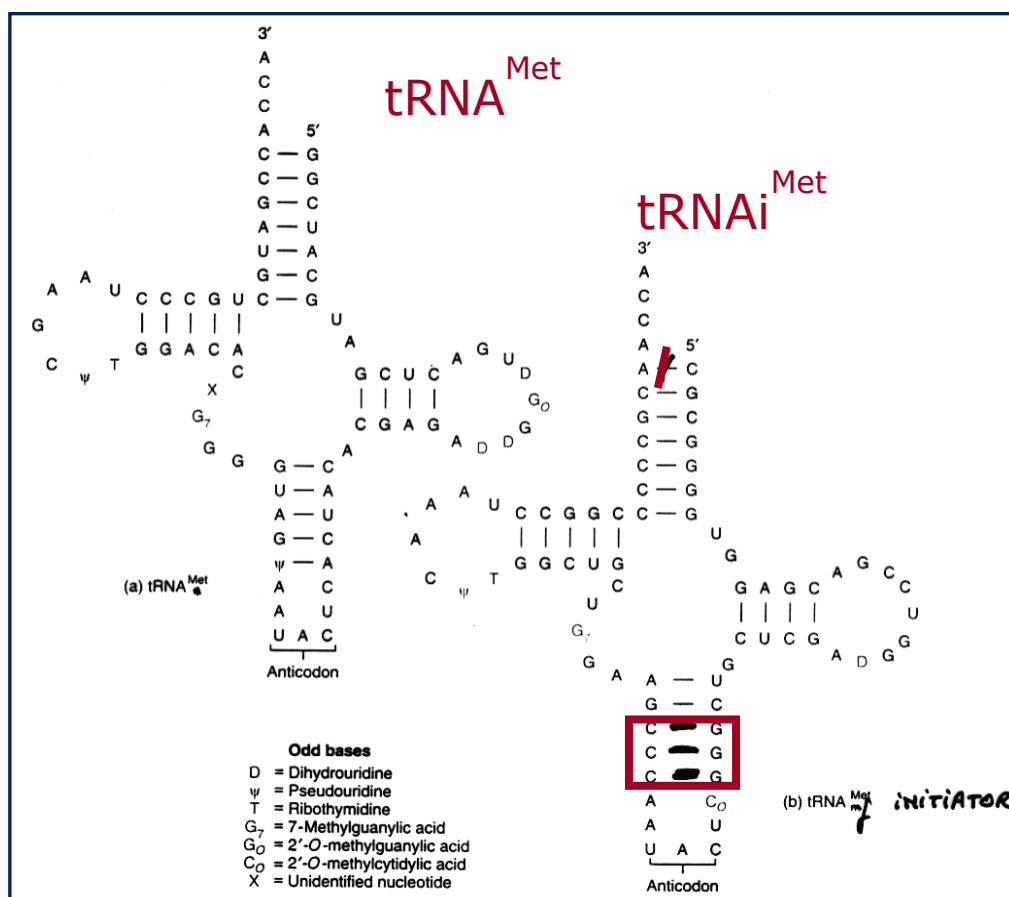
17.4. Translatie in prokaryoten

17.4.1. Initiatie van translatie in *E. coli*

De eerste stap in translatie bij *E. coli* is de vasthechting van de 30S-ribosoom sub-eenheid op het mRNA. Deze binding gebeurt op een specifieke plaats, de ribosoom-bindingsplaats/site (**RBS**). Deze RBS ligt op enkele tot een tiental nucleotiden opwaarts van het startcodon en wordt gekenmerkt door een geconserveerde sequentie: de **Shine Dalgarno sequentie (SD)**: 5' AGGAGGU 3'

Deze sequentie is complementair aan een deel van de 16S-rRNA-molecule wat een tijdelijke basenparing mogelijk maakt met de 30S-ribosoomsubeenheid. Vandaar migreert de 30S-subeenheid dan naar het startcodon, waar translatie kan beginnen nadat een initiatiecomplex gevormd is.

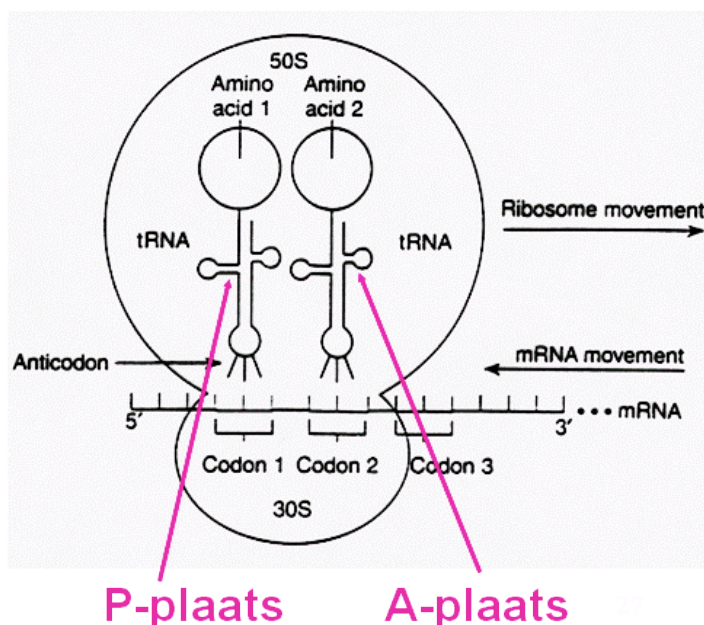
De combinatie van het mRNA met de 30S-subeenheid op het startcodon wordt aangevuld met het initiator-tRNA (tRNA_i), dat opgeladen is met methionine. In eubacteria is dit methionine geformyleerd op de aminogroep, zodat dit methionine enkel als start kan gebruikt worden. Er zijn echter bijkomende eigenschappen van het tRNA_i waardoor dit enkel als start-tRNA kan gebruikt worden. Zo is de 5de laatste nucleotide aan de acceptorarm niet gebasenpaard, en dit blijkt noodzakelijk om het tRNA te verhinderen tijdens elongatie op AUG-codons te binden. De drie G-C basenparen in de anticodonarm daartegenover blijken noodzakelijk om het tRNA_i in het initiatiecomplex toe te laten.



Bij het initiatieproces zijn eveneens **initiatiefactoren** (IF) noodzakelijk. Bij initiatie in *E. coli* blijken er drie IF een rol te spelen (niet te kennen).

IF1 en IF3 zijn verantwoordelijk voor de splitsing van het ribosoom in de 30S- en 50S-subeenheden, waarbij de 30S- subeenheid gestabiliseerd wordt met behulp van IF1. Daarnaast is IF3 betrokken in de herkenning van de ribosoombindingsplaats. IF2 is een bepalende factor bij de binding van het initiator-tRNA. Enkel IF2 is in staat het tRNA_i te herkennen en binnen te brengen in het initiatiecomplex. Bovendien zorgt IF2 voor de binding van een GTP- molecule op het initiatiecomplex die nodig is voor de volgende stap in translatie.

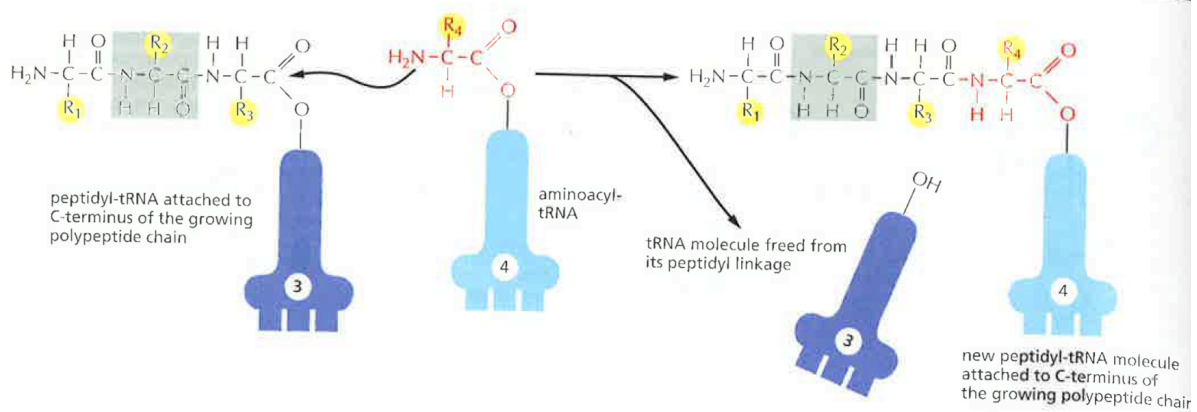
Eens het initiatiecomplex gevormd is, kan de 50S-subeenheid erop binden, dit gaat gepaard met hydrolyse van GTP en het loskomen van IF2 en IF3. Door het volledige ribosoom worden nu twee verschillende tRNA-bindingsplaatsen gevormd: de peptidyl- of P-plaats (nu t.h.v. het startcodon) en de aminoacyl- of A-plaats (nu t.h.v. het 2de codon).



17.4.2. Elongatie van translatie in *E. coli*

Het eerste ingebouwde aminozuur is dus (f)methionine, dat echter zowel bij prokaryoten als eukaryoten na translatie van het gevormde polypeptide kan afgesplitst worden. Bij eubacteria gebeurt ook deformylatie van f-methionine.

De **P-plaats** wordt zo genoemd omdat zich daar tijdens elongatie een tRNA met de groeiende polypeptideketen bevindt, op de **A-plaats** komt een tRNA binnen met het volgende aminozuur. Tussen de polypeptideketen en het volgende aminozuur wordt een **peptidebinding** gevormd door het peptidyltransferase. Dit enzyme bestaat uit verschillende componenten van de 50S-subeenheid waaronder een RNA-molecule (23S-rRNA) en meerdere eiwitten, waarbij het 23S-rRNA zeker deels verantwoordelijk is voor de katalytische activiteit (ribozyme). Dit enzyme werkt samen met een tweede ribosomaal enzyme, het tRNA-deacylase, dat de binding tussen het aminozuur en tRNA breekt. Hierna schuift het ribosoom exact drie nucleotiden op, wat translocatie wordt genoemd. Het tRNA verlaat het ribosoom via de Exit-plaats.



Tijdens elongatie zijn bijkomende **elongatiefactoren** (EF) nodig. Alle tRNA's die tijdens elongatie gebruikt worden, worden herkend door de elongatiefactor EF-Tu en binding van de tRNA's vereist telkens een GTP-molecule die ook door EF-Tu aangebracht wordt. Een andere elongatiefactor EF-Ts is nodig om EF-Tu na elk gebruik te reactiveren. Voor translocatie is een derde factor EF-G nodig en ook GTP-hydrolyse.

De snelheid van translatie in *E. coli* is ongeveer 15 aminozuren per seconde, in rode bloedcellen 2 per seconde. Zowel bij pro- als eukaryoten zijn tegelijk vele ribosomen met de translatie van één mRNA bezig (polysomen). **In prokaryoten is translatie bovendien gekoppeld met transcriptie, wat niet mogelijk is bij eukaryoten!**

17.4.3. Terminatie van translatie in *E. coli*

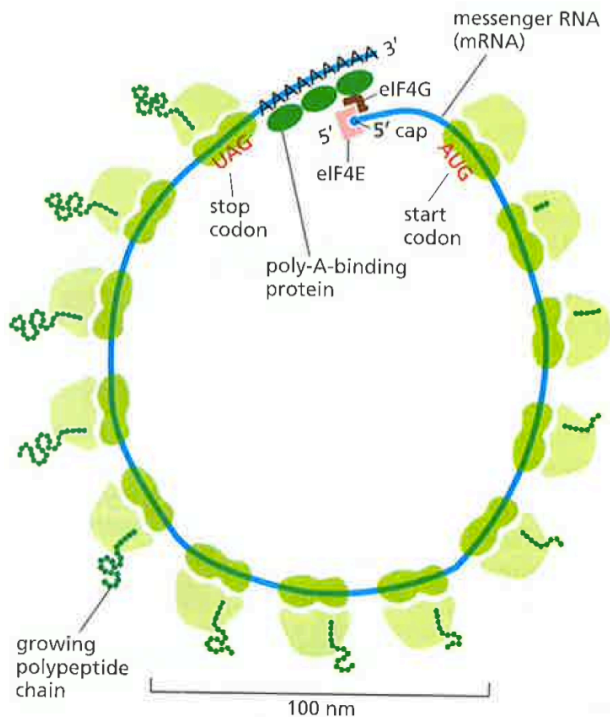
Elongatie gaat door tot het ribosoom een stopcodon tegenkomt. Voor de stopcodons bestaan er geen tRNA's, maar deze codons worden herkend door de "**release**" **factoren** (RF1, RF2, RF3). Deze knippen de polypeptideketen los van het laatste tRNA. Het ribosoom laat polypeptide en mRNA los en dissocieert in de 2 sub-eenheden.

De opvouwing van het eiwit gebeurt soms spontaan maar in veel gevallen zijn chaperone- of hulpeiwitten nodig. Veel eiwitten krijgen nog posttranslationele modificaties zoals het opzetten van suikergroepen in het endoplasmatische reticulum en het golgi-apparaat bij de vorming van glycoproteïnen.

17.5. Translatie in eukaryoten

Eiwitbiosynthese bij eukaryoten is essentieel hetzelfde als bij prokaryoten behalve een aantal verschillen die hier samengevat worden:

- Terwijl translatie bij prokaryoten gekoppeld met transcriptie gebeurt, dit wil zeggen dat de ribosomen de eiwitsynthese starten terwijl het polymerase nog mRNA aan het vormen is, gebeurt dit bij eukaryoten volledig gescheiden.
- Eukaryoten hebben enkel monocistronische mRNA's terwijl bij prokaryoten veel polycistronische mRNA's voorkomen (zie ook hoofdstuk 18).
- Het belangrijkste verschil tijdens het proces zelf is ter hoogte van initiatie. Bij eukaryoten bindt de kleine ribosoomsubeenheid (40S) op de 5'cap van het mRNA en scant vandaar naar het eerste AUG-codon (startcodon), dat wel in een bepaalde context moet aanwezig zijn om goed herkend te worden. Bij eukaryoten is er dus geen interne ribosoombindingsplaats zoals de Shine Dalgarno-sequentie bij prokaryoten maar functioneert de cap als de ribosoombindingsplaats. Voor de vorming van het initiatiecomplex ter hoogte van het AUG-codon zijn minstens 8 initiatiefactoren nodig en wordt ATP verbruikt.
- Een ander duidelijk verschil is dat methionine op het tRNA_i niet geformyleerd is.
- Voor elongatie zijn er slechts twee elongatiefactoren nodig: eEF1 bindt de aminoacyl-tRNA's en eEF2 helpt bij translocatie.
- Bij terminatie op het stopcodon is er slechts één releasefactor.
- Eukaryotische mRNAs vormen een cirkel voor translatie waarbij de 5'cap en de 3'polyA dicht tegen elkaar zitten en zo ook beschermd worden tegen afbraak.



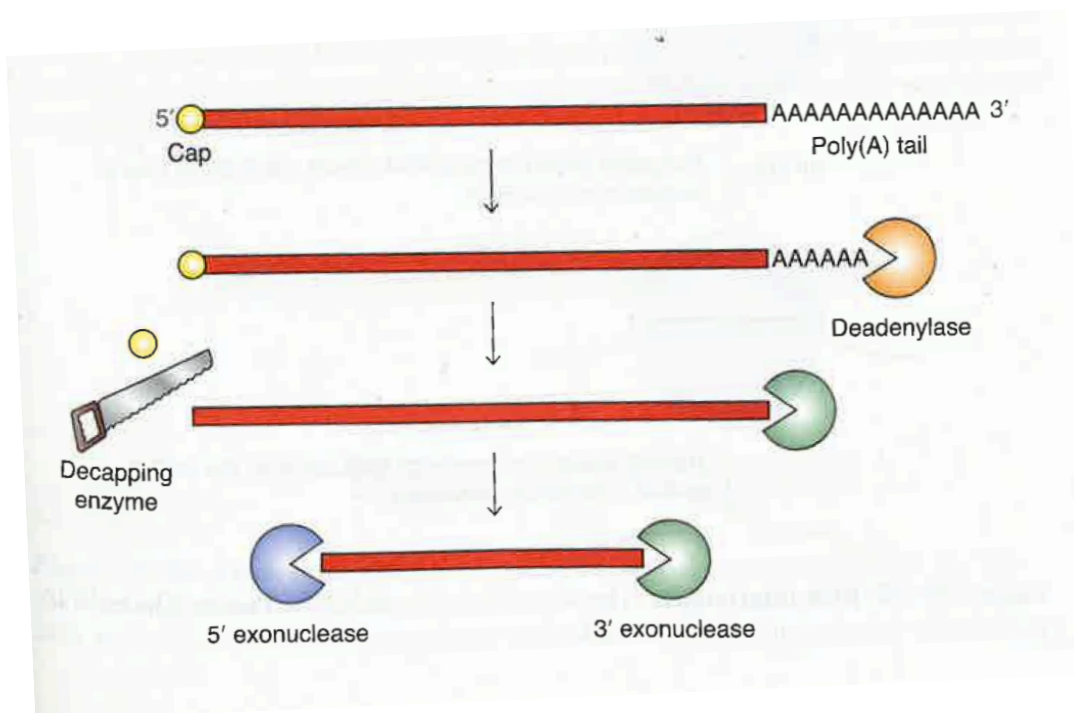
Molecular Biology of the Cell,
Alberts et al.

Opm. ivm mRNA (in)stabiliteit

Prokaryotisch mRNA is zeer onstabiel, het wordt tijdens transcriptie onmiddellijk vertaald en afgebroken.

Eukaryotisch mRNA daarentegen wordt gestabiliseerd door de 5'cap en de 3'polyA-staart. Deze kunnen door enzymen afgeknabbeld worden waardoor het mRNA onstabiel wordt en vervolgens volledig afgebroken wordt. Bepaalde sequenties, secundaire structuren, RNAs of eiwitten die op mRNA binden kunnen de stabiliteit beïnvloeden. Ook het proces van translatie stabiliseert het mRNA.

Bij eukaryoten zijn er ook mechanismen om mRNAs die geen correct eiwit kunnen afleveren bv. mRNAs die door mutatie of verkeerde splicing een vroegtijdig stopcodon hebben of mRNAs die geen stopcodon hebben af te breken (via respectievelijk nonsense-mediated mRNA decay en nonstop-mediated mRNA decay). Zo wordt verhinderd dat er nutteloos energie verspild wordt aan de vertaling van niet-functionele mRNAs.



Essential Biochemistry, Pratt & Cornely

17.6. Mutaties en translatie

Nu we de rol van codons beter kennen, kunnen we begrijpen dat basemutaties in een open leesraam heel verschillende gevolgen kunnen hebben op het fenotype.

- Geen effect op AZ (**silent**), omdat bepaalde codons redundant zijn.
- Ander AZ (**missense**), effect op fenotype afhankelijk van belang van dat AZ.
- Stopcodon (**nonsense**), effect vnl. afhankelijk van plaats in open leesraam.

| | | | | |
|--------------------------|-------|-------|------|-------|
| Missense mutation | DNA: | G A A | → | G T A |
| | | C T T | | C A T |
| | mRNA: | G A A | → | G U A |
| Protein: | Glu | → | Val | |
| Nonsense mutation | DNA: | T T A | → | T A A |
| | | A A T | | A T T |
| | mRNA: | U U A | → | U A A |
| Protein: | Leu | → | Stop | |
| Silent mutation | DNA: | C C C | → | C C A |
| | | G G G | | G G T |
| | mRNA: | C C C | → | C C A |
| Protein: | Pro | → | Pro | |

17.7. Inhibitoren van translatie

Een groot aantal inhibitoren van translatie zijn gekend, zij zijn zeer nuttig voor de studie van de verschillende stappen van translatie. Een deel ervan wordt als antibioticum gebruikt (indien enkel inhibitorisch bij prokaryoten). Bijvoorbeeld streptomycine bindt op de 30S-ribosoomsubeenheid, chloramfenicol op de 50S. Tetracyclines binden op de ribosomen en verhinderen tRNA-binding (ze binden ook op 80S-ribosomen maar eukaryotische membranen zijn minder permeabel voor Tc).

Difterietoxine (*Corynebacterium diphtheriae*) verdient een speciale vermelding wegens zijn uitzonderlijke werking. Eén molecule van dit toxine kan een cel doden omdat het als enzyme werkt en de eukaryotische eEF2-factor irreversibel inactieveert.

17.8. Posttranslationele processing van eiwitten

Polypeptideketens kunnen tijdens/na translatie geprocesseerd worden bv. geknipt worden (insuline), gecombineerd worden met andere polypeptiden (cfr. quaternaire structuur), geglycosyleerd worden (Hoofdstuk 6, ER en GA), enz. Een aantal van die modificaties gebeuren afhankelijk van het compartiment waar de eiwitten terecht komen door translocatie.

17.9. Eiwittranslocatie

Niet alleen de primaire structuur van eiwitten ligt gecodeerd in het DNA, maar uit deze primaire structuur volgt tevens de verdere driedimensionale opvouwing en de associatie in polypeptidecomplexen. Bovendien wordt in de primaire aminozuursequentie ook gespecificeerd naar welk organel een bepaald eiwit moet, en of het al of niet in een membraan komt te zitten.

Eiwitten die niet in het cytoplasma blijven, worden algemeen geproduceerd als preproteïnen. Deze eiwitten bezitten een "leader"-peptide van 16 tot 26 aminozuren aan de aminotermus, ook signaalsequentie of signaalpeptide genoemd, die tijdens het transport door het membraan afgeknipt wordt. Dit gebeurt bv. bij gram-negatieve bacteriën wanneer het eiwit naar het periplasma of buiten gesecreteerd moet worden.

Een eiwit kan door het membraan gaan of in het membraan blijven steken tijdens het transport. Dit is afhankelijk van het al of niet aanwezig zijn van hydrofobe reeksen aminozuren die affiniteit vertonen voor de hydrofobe binnenkant van een membraan.

Bij eukaryoten komen meerdere compartimenten voor o.a. cytoplasma, nucleus, mitochondriën en chloroplasten, endoplasmatisch reticulum (ER), Golgi apparaat (GA)... De ribosomen komen vrij in het cytoplasma voor of gebonden op het ER. Als de ribosomen gebonden zijn op het ER dan worden eiwitten geproduceerd voor het ER zelf, het GA en voor secretie naar buiten de cel. De transfer van deze eiwitten gebeurt cotranslationeel. Aan de vrije ribosomen worden de eiwitten voor het cytosol en de andere organellen geproduceerd (nucleus, mitochondriën, chloroplasten, peroxisomen). Hier is er een posttranslationele transfer. Hieronder enkele karakteristieke voorbeelden.

Eiwittransport naar het ER: cotranslationeel

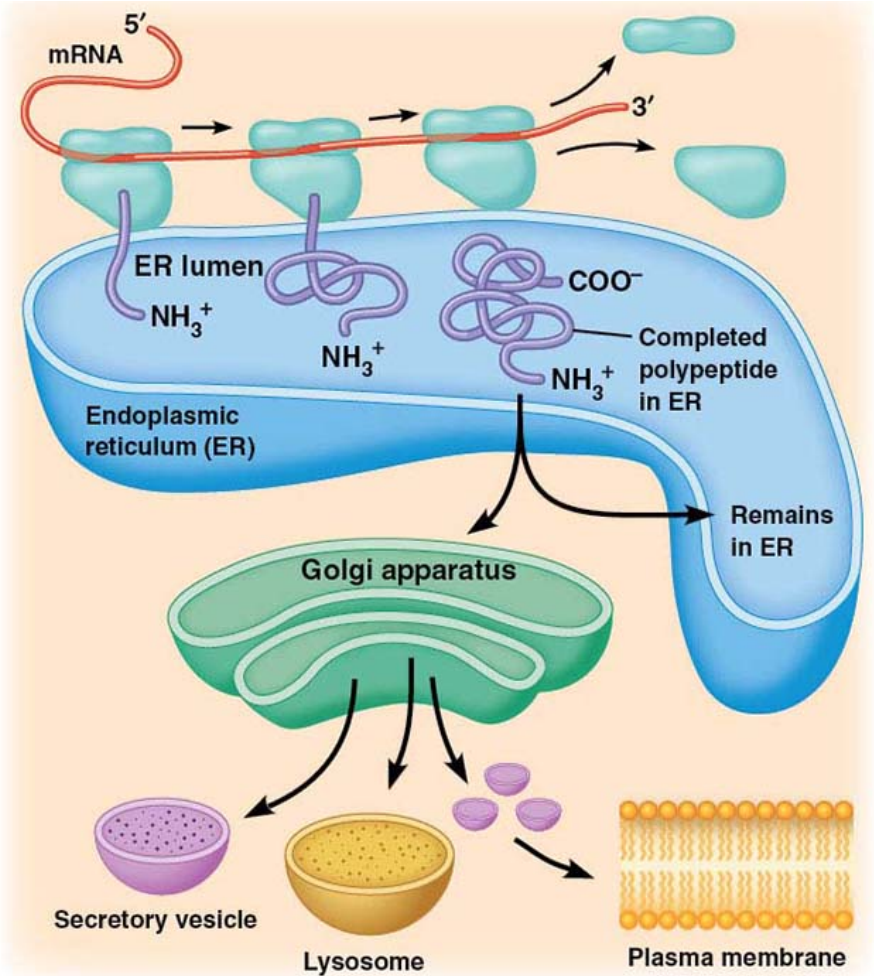
Bij eiwitten die bestemd zijn voor het ER of secretie, bindt een "signal recognition particle" SRP op het pas gevormde signaalpeptide. Hierdoor wordt translatie stilgelegd en het translatiecomplex (ribosoom-mRNA-signaalpeptide) wordt naar een SRP-receptor op het ER-membraan getransporteerd. Daar hervat translatie zich, waarbij het eiwit tijdens vorming door het ER-membraan getransloceerd wordt.

Eiwittransport naar de mitochondria: posttranslationeel

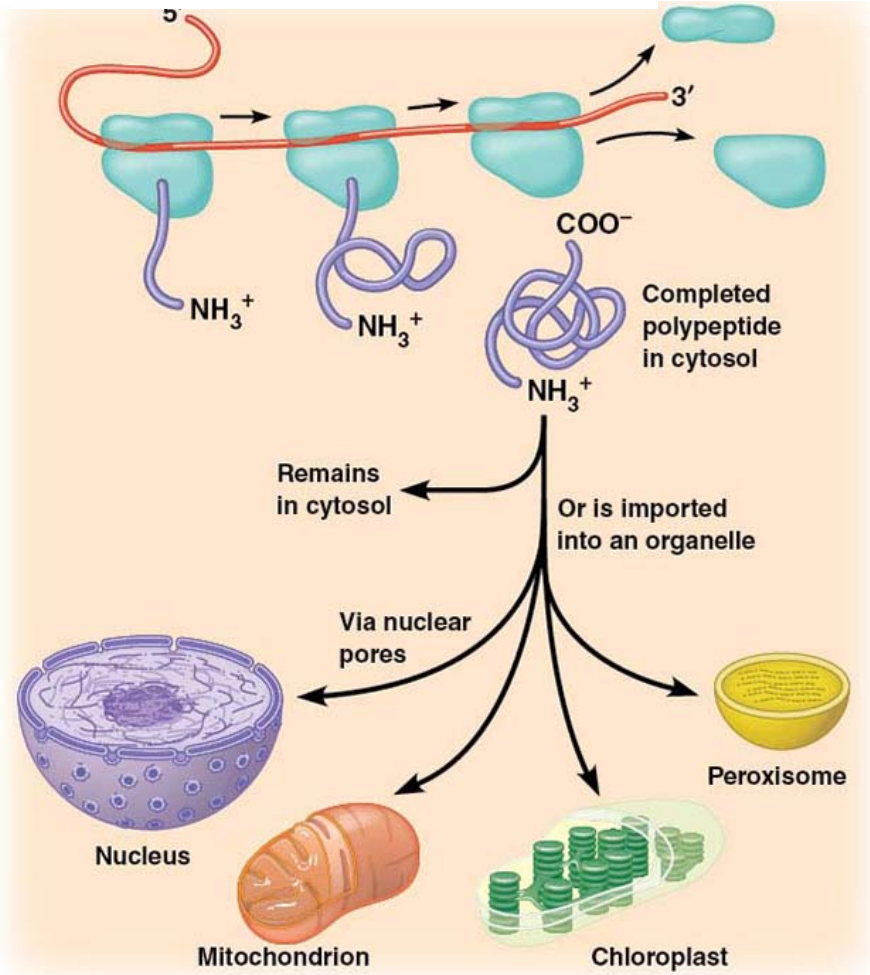
Mitochondriën hebben twee membranen met twee ruimtes tussen deze membranen. Het transport wordt ook hier geregeld door een signaalpeptide aan de aminotermus, dat tot 70 aminozuren lang kan zijn, en afgeknipt wordt tijdens translocatie.

Eiwittransport naar de kern: posttranslationeel

De poriën van de kernmembraan zijn te klein voor spontane diffusie van de meeste eiwitten. Eiwitten die in de kern een functie te vervullen hebben (bv. transcriptiefactoren) bevatten één of meerdere interne nucleaire localisatiesignalen (NLS) die niet uitgeknipt worden tijdens translocatie.



(a) COTRANSLATIONAL IMPORT



(b) POSTTRANSLATIONAL IMPORT