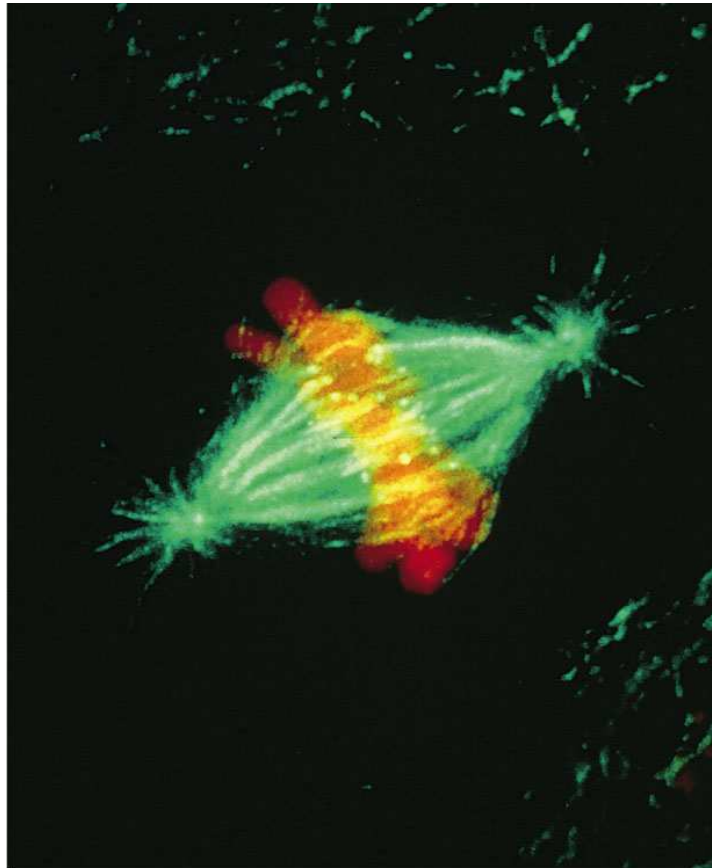


# Universiteit Gent

Academiejaar 2019-2020



© 2007 Thomson Higher Education

## Celbiologie en Genetica

**Prof. dr. Geert De Jaeger**

Vakgroep Plantenbiotechnologie en Bioinformatica  
VIB-Center voor Systeembio van Planten  
Technologiepark 927, 9052 Zwijnaarde  
e-mail: [geert.dejaeger@ugent.be](mailto:geert.dejaeger@ugent.be)

## VIII. DNA: de fysische drager van genetische informatie

De cel kan slechts functioneren en differentiëren wanneer zij beschikt over proteïnen die als enzymen of structurele proteïnen actief zijn. De synthese van deze proteïnen is dus noodzakelijk voor een levende cel en het vermogen om de proteïnen aan te maken moet bij elke celdeling ook doorgegeven kunnen worden aan de dochtercellen. Dit potentieel van elke cel om een bepaald metabolisme uit te voeren en door te kunnen geven aan de volgende generatie ligt vervat in de genetische informatie van de cel. De genetische informatie van organismen, prokaryoten zowel als eukaryoten, is opgebouwd uit een polymeer van nucleïnezuren: het desoxyribonucleïnezuur of DNA.

### VIII.1 Bewijs dat DNA de drager is van genetische informatie

Er is lange tijd discussie geweest over welke van de 4 groepen polymere organische verbindingen -de proteïnen met 20 verschillende monomeren, de nucleïnezuren met 4 monomeren, of de suikers en de vetten met hun grote variatie aan structuren- de genetisch code konden dragen. In eerste instantie werd gedacht dat enkel de proteïnen, de polymere suikers of de vetten structureel complex genoeg waren om genetische informatie te kunnen dragen.

In 1944 werd in een eerste publicatie van Oswald Avery en medewerkers aangetoond dat DNA-moleculen de fysische dragers van het genetisch materiaal zijn. Later hebben verschillende andere experimenten bevestigd dat de DNA-molecule inderdaad de informatiedrager is van het erfelijk materiaal.

Het inleidende onderzoek werd reeds in 1928 uitgevoerd door Frederick Griffith die als bacterioloog een studie uitvoerde van de ziekteverwekkende (pathogene) eigenschappen van *Pneumococcus*, nu *Streptococcus pneumoniae* genoemd. De *S. pneumoniae* bacteriën veroorzaken een vorm van pneumonie (longontsteking) bij zoogdieren en komen voor onder twee karakteristieke vormen. De S-bacteriën hebben een polysaccharide kapsel rond de cel dat hen beschermt tegen het immunologisch afweersysteem van de gastheer. Hierdoor kunnen de S-bacteriën overleven in de gastheer en zijn ze pathogeen (virulent). De S-bacteriën veroorzaken de vorming van verschillende specifieke antilichamen in de gastheer omdat de polysaccharide laag diverse antigenen draagt. Op basis van de antilichamen die zij opwekken kunnen de S-bacteriën onderverdeeld worden in de serotypes I, II en III. Het serotype is genetisch bepaald en wordt overgeërfd van generatie op generatie. De kolonies van S-bacteriën zijn slijmerig ("smooth"), vandaar de term S-bacteriën. Een kolonie is de verzameling van alle dochtercellen

die door deling afkomstig zijn van één op een vast groeimedium geënte bacteriecel. Degelijke kolonies zijn zichtbaar als ronde stippen op het groeimedium waarbij de kleur, de vorm en de grootte karakteristiek zijn voor het bacterietype of de soort.

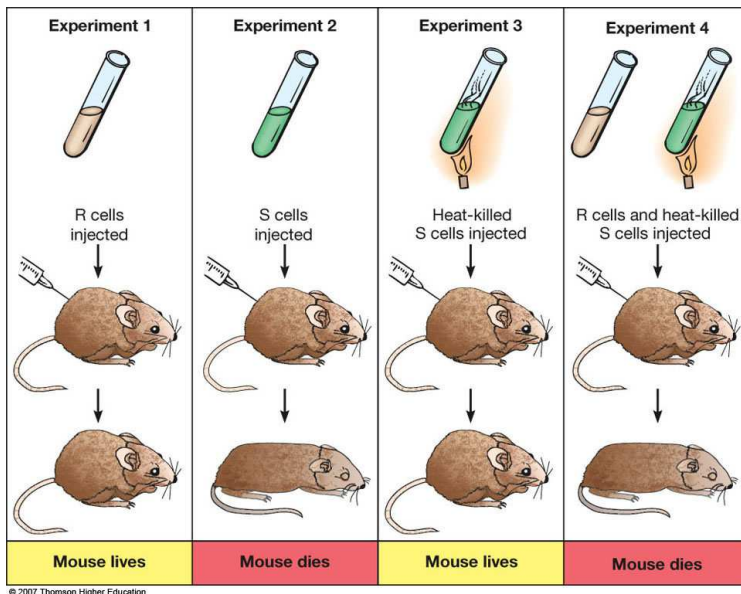
Het tweede type van *S. pneumoniae* bacteriën, de R-bacteriën, bezitten geen polysaccharide kapsel en zijn ook niet virulent omdat het immunologisch afweersysteem van de gastheer de R-bacteriën direct onschadelijk maakt. R-kolonies hebben een droog en ruw oppervlak ("rough") en kunnen morfologisch duidelijk van de S-kolonies onderscheiden worden.

Men stelt vast dat de S-bacteriën met een frequentie van ongeveer  $10^{-7}$  veranderen (muteren) tot R-bacteriën. Dit betekent dat op ongeveer  $10^7$  S-kolonies er één kolonie zal voorkomen die niet meer slijmerig is. Een mutatie is een overerfbare verandering in het genoom van een organisme en wordt als een "forward" mutatie aangeduid wanneer het een verandering betreft ten opzichte van het algemeen voorkomende referentieorganisme, het wild type organisme. De "forward" mutatie is hier een "verlies van functie"- of een "loss of function"-mutatie van een gen.

Anderzijds kan men soms ook vaststellen dat een R-bacterie terug verandert of revertteert tot een S-bacterie. Het betreft hier dan een reversiemutatie of een terugmutatie. De revertant die hierbij ontstaat draagt steeds hetzelfde serotype I, II of III kapsel als de oorspronkelijke bacterie waarin de forward mutatie naar de R-vorm optrad. De reversie-mutatie kan hier dus beschouwd worden als een "terugwinnen van functie"- of een "gain of function"-mutatie en het organisme heeft terug een wild type fenotype.

De "forward" mutatie van een gen gebeurt spontaan slechts met een lage frequentie, variërend van  $10^{-5}$  tot  $10^{-10}$ , afhankelijk van het gen en de omstandigheden. De terugmutatie of reversie is nog zeldzamer en de frequentie ( $10^{-7}$ - $10^{-12}$ ) is afhankelijk van de aard van de forward mutatie, het gen en de omstandigheden.

Griffith deed verschillende experimenten waarbij muizen geïnfecteerd werden met *S. pneumoniae* bacteriën. Muizen geïnjecteerd met S<sub>III</sub>-bacteriën ontwikkelden pneumonie en stierven, muizen geïnjecteerd met R<sub>II</sub> bacteriën overleefden de behandeling terwijl muizen geïnjecteerd met S<sub>III</sub> bacteriën die eerst gedood waren de behandeling overleefden. Wanneer muizen geïnjecteerd werden met een mengsel van R<sub>II</sub> bacteriën en gedode S<sub>III</sub> bacteriën, overleefden zij de behandeling niet. Bij dit laatste experiment konden pathogene S<sub>III</sub> bacteriën geïsoleerd worden uit de muizen. Het besluit was dat de R<sub>II</sub>-cellen door het S<sub>III</sub>-extract getransformeerd werden naar S<sub>III</sub>-cellen. De onbekende component in S<sub>III</sub> extracten die de R<sub>II</sub> cellen transformeerde werd het "transformerend principe" genoemd. (In de figuur hieronder wordt het serotype van de bacteriën niet vermeld.)



In 1944 konden Oswald Avery, Colin McLeod en Maclyn McCarty het "transformerende principe" als DNA identificeren door R<sub>II</sub> bacteriën met verschillende fracties van S-celextracten te behandelen en na te gaan welke van deze fracties de R<sub>II</sub> bacteriën tot S<sub>III</sub> bacteriën kon transformeren. Zij toonden aan dat R<sub>II</sub> bacteriën na een behandeling met eiwitten geïsoleerd uit S<sub>III</sub> bacteriën niet transformeerden. Anderzijds werden R<sub>II</sub> bacteriën na behandeling met gezuiverd DNA van S<sub>III</sub> bacteriën getransformeerd naar S<sub>III</sub> bacteriën.

Meer evidentie dat DNA in het algemeen de moleculaire drager van de genetische informatie is accumuleerde in het begin van de jaren 1950. Dit was onder andere gebaseerd op de vaststelling dat de DNA-inhoud in verschillende cellen van een zelfde organisme stabiel en identiek is en dat DNA een metabolisch stabiele molecule is. Een experiment dat de doorslag heeft gegeven is het Hershey-Chase experiment met het bacterieel virus T<sub>2</sub>.

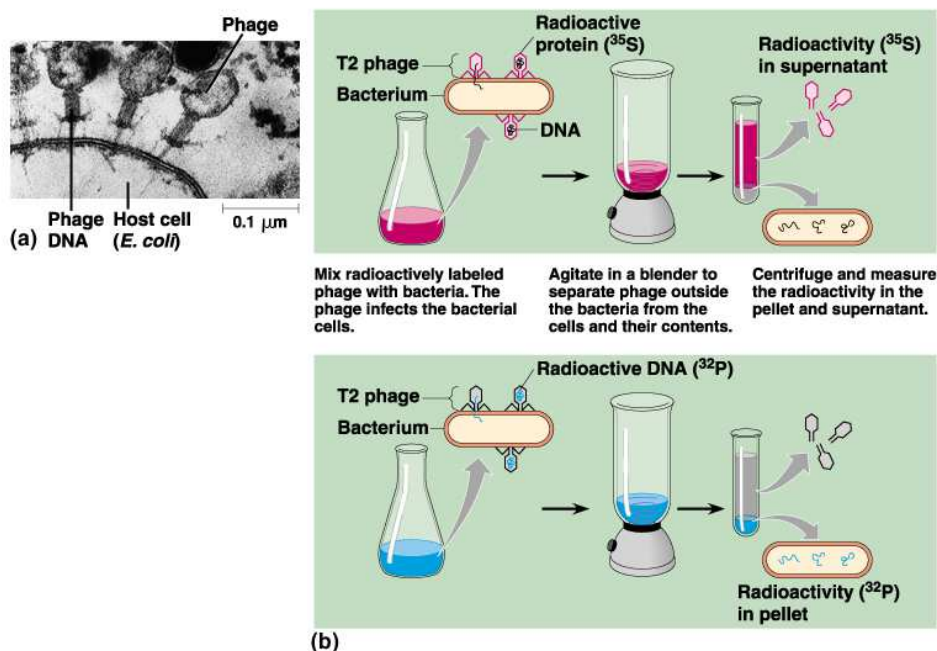
*Escherichia coli* (*E. coli*) is een bij de mens algemene darmbacterie die geïnfecteerd kan worden door de bacteriofaag T<sub>2</sub>, een bacterieel virus. Uit microscopisch onderzoek wist men dat de bacteriofaag (ook wel afgekort tot "faag") opgebouwd is uit een proteïnekapsel rond een DNA polymeer.

Binnen de eerste 10 minuten van de infectiecyclus hecht de bacteriofaag zich vast op de celwand van de bacterie en injecteert zijn genetisch materiaal in het *E. coli* cytoplasma. Hierop wordt het metabolisme in de bacterie drastisch veranderd en worden er nieuwe T<sub>2</sub> bacteriofagen gevormd in het cytoplasma van de bacterie. Na ongeveer een uur ziet men de bacterie openbreken ("lyse") en komen er 100 tot 200 bacteriofaagnakomelingen uit de cel vrij ("burst"). Deze kunnen dan op hun beurt elk individueel aan een nieuwe infectiecyclus beginnen op nabijgelegen *E. coli* cellen.

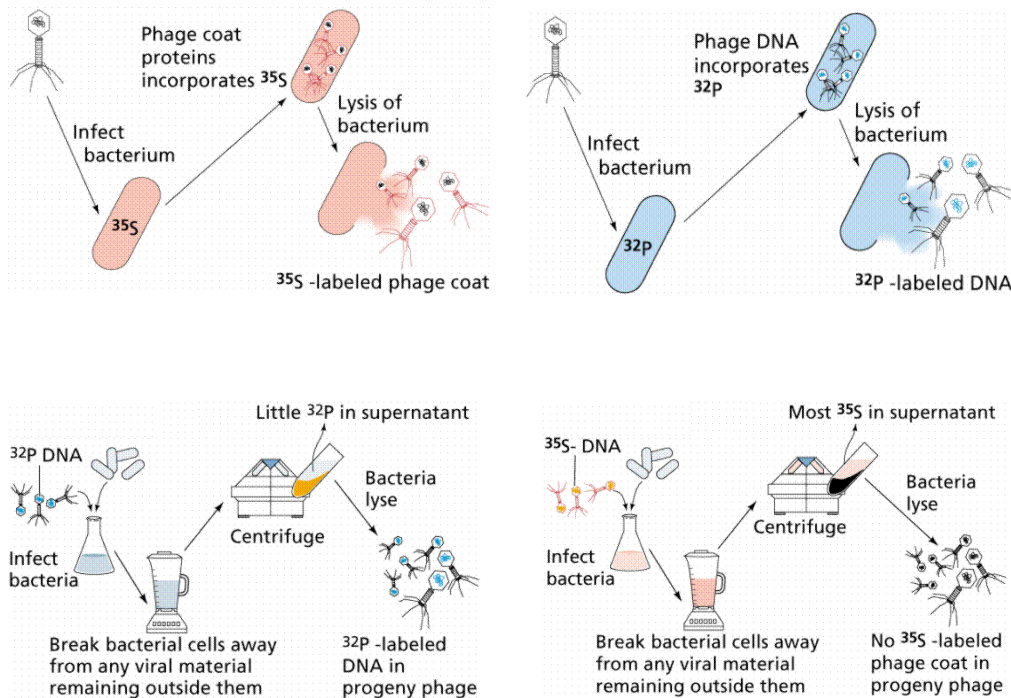
Wanneer een grote hoeveelheid bacteriën op een vast medium worden gebracht verkrijgt men na groei een aaneengesloten massa die als een bacterieel tapijt (“bacterial lawn”) het volledige medium bedekt. De aanwezigheid van één enkele bacteriofaag ergens in die massa veroorzaakt na één infectiecyclus de lyse van één bacteriecel waarbij honderden fagen vrijkomen. Door herhaalde infecties van naburige cellen krijgt men in het bacterieel tapijt een cirkelvormige zone van gelyseerde bacteriecellen, die groter wordt in functie van de tijd. Dit wordt een plaque genoemd, een zone in het bacterieel tapijt die helder en doorzichtig is.

Bij het experiment van Alfred Hershey en Martha Chase werd een cultuur van bacteriën (cultuur A) opgegroeid in een medium met het radioactieve isotoop  $^{35}\text{S}$ . Het  $^{35}\text{S}$  wordt ingebouwd in proteïnen (en niet in DNA of RNA) en merkt dus het proteïnekapsel van de T<sub>2</sub>-virussen die op bacteriën van de cultuur A zijn gegroeid. Een andere groep van bacteriën werd opgegroeid in een medium met het radioactieve isotoop  $^{32}\text{P}$  (cultuur B). Dit  $^{32}\text{P}$  wordt niet ingebouwd in de proteïnen maar voornamelijk in het DNA en RNA van de bacteriën en dus ook in het DNA van T<sub>2</sub>-bacteriofagen die in cultuur B worden geïnfecteerd.

Er werden dus twee radioactief gemerkte stocks van T<sub>2</sub>-bacteriofagen geproduceerd: bij één bacteriofaagstock waren de proteïnen gemerkt met  $^{35}\text{S}$  (T<sub>2</sub>-A), bij de andere bacteriofaagstock was het DNA gemerkt met  $^{32}\text{P}$  (T<sub>2</sub>-B). In een volgende stap werd een *E. coli* cultuur geïnfecteerd met T<sub>2</sub>-A ( $^{35}\text{S}$ -gemerkte) bacteriofagen. Na enkele minuten werd de cultuur hard geschud waardoor de vastgehechte bacteriofaagpartikels van de bacteriecellen loskomen in het medium. Na centrifugeren bevinden de bacteriecellen zich in de neerslag (de pellet) en de bacteriofaagpartikels in het medium. Bij analyse van de verdeling van het  $^{35}\text{S}$  vond men dat het meeste  $^{35}\text{S}$  zich in het medium bevond.



Een andere *E. coli* cultuur werd geïnfecteerd met T<sub>2</sub>-B (<sup>32</sup>P gemerkte bacteriofaagstock). Dezelfde procedure werd gevolgd en in dit geval bevond het meeste radioactieve <sup>32</sup>P zich in de celfractie en dus in de bacteriën. Bovendien wordt de kleine hoeveelheid proteïne die toch de bacteriecel binnenkomt niet doorgegeven aan een nieuwe generatie virussen, terwijl de <sup>32</sup>P merker van het DNA wel in de volgende generatie van virussen teruggevonden kon worden.



Deze gegevens worden als volgt geïnterpreteerd. Bij een bacteriofaag infectie wordt het DNA van de bacteriofaag in de bacteriecellen binnengebracht terwijl de meeste proteïnen van het bacteriofaagkapsel buiten blijven. Omdat voor verdere multiplicatie van de virussen de genetische informatie moet binnengebracht worden in de gastheercel, is dit dus wellicht het DNA en niet de proteïne fractie van de bacteriofaag. Dit wordt bevestigd doordat de radioactieve merker van het DNA teruggevonden kan worden in de volgende generatie virussen. De molecule die doorgegeven wordt naar de volgende generatie is de drager van de genetische informatie, en dus DNA. Het feit dat ook in hogere organismen de genen bevat zitten in de DNA-structuur is sinds ±1970 definitief bewezen door het gebruik van de recombinant DNA-technologie.

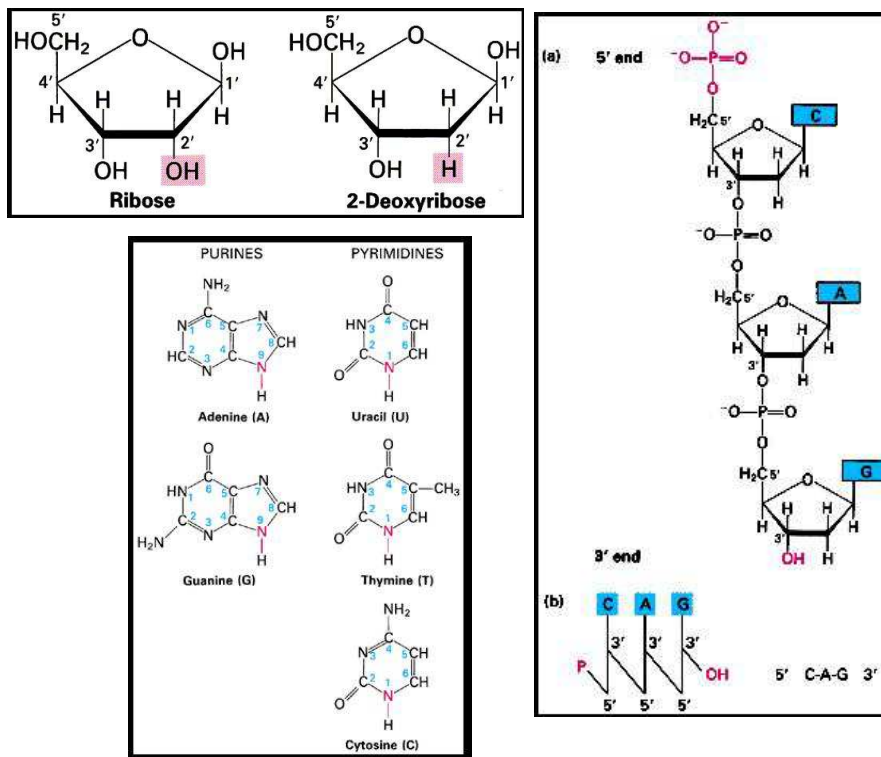
Achteraf lijkt het evident dat de nucleïnezuren DNA en RNA drager zijn van het genetisch materiaal. Voorgevormde ideeën kunnen het oplossen van nieuwe problemen echter in de weg staan. Zo was er tot 1993 niemand die de hypothese van Prusiner (reeds geformuleerd rond ±1980) aanvaardde dat het infectief materiaal van de overdraagbare en infectieuze ziekte scrapie bij schapen en geiten of de verwante dolle koeien ziekte bij runderen overeenkomt met een speciale vorm van een proteïne, het prion, en geen DNA of RNA bevat. Het model is nu dat infectieuze prioneiwitten associëren met bijna identieke eiwitten die normaal aanwezig zijn in neuronale weefsels en deze door multimeervorming converteren tot eveneens infectieuze prioneiwitten. Bij mensen kan infectie met prionen aanleiding geven tot de Creutzfeldt-Jacob ziekte (CJD) of de verwante ziekte Kuru. Infectie treedt op door het consumeren van prion-gecontamineerd neurale weefsel. In 1997 heeft Prusiner voor zijn werk de Nobelprijs gekregen.

## VIII.2 De structuur van DNA

DNA is opgebouwd uit twee lineaire polynucleotidestangen die als een rechtshandige, dubbele helix georganiseerd zijn in de ruimte. Essentieel voor het begrijpen van de structuur van DNA is dat er drie verschillende bouwstenen zijn in de DNA-molecule: een fosfaatgroep, een desoxyribosesuiker en vier verschillende heterocyclische basen: de purines guanine (G) en adenine (A) en de pyrimidines thymine (T) en cytosine (C) (voor details wordt verwezen naar de cursus organische chemie en biochemie).

Een desoxyribosesuiker (in de furanose vorm) wordt op de 1' plaats gebonden met één van de vier heterocyclische basen met de vorming van een nucleoside. Zo zijn desoxyguanosine en desoxyadenosine de desoxynucleosiden van –respectievelijk- de purines guanine en adenine en zijn desoxythymidine en desoxycytidine de nucleosiden van – respectievelijk- thymine en cytosine.

Wanneer het nucleoside op de 5' plaats via een ester gebonden is met één of meerdere fosfaatgroepen spreekt men van een nucleotide. Nucleotiden kunnen voorkomen als de mono-, di- en trifosfaat esters van het corresponderende nucleoside. Desoxyadenosine trifosfaat is een nucleotide dat sterk lijkt op adenosine trifosfaat of ATP.



### VIII.2.1 *Nucleotiden kunnen covalent verbonden worden in elke mogelijke volgorde.*

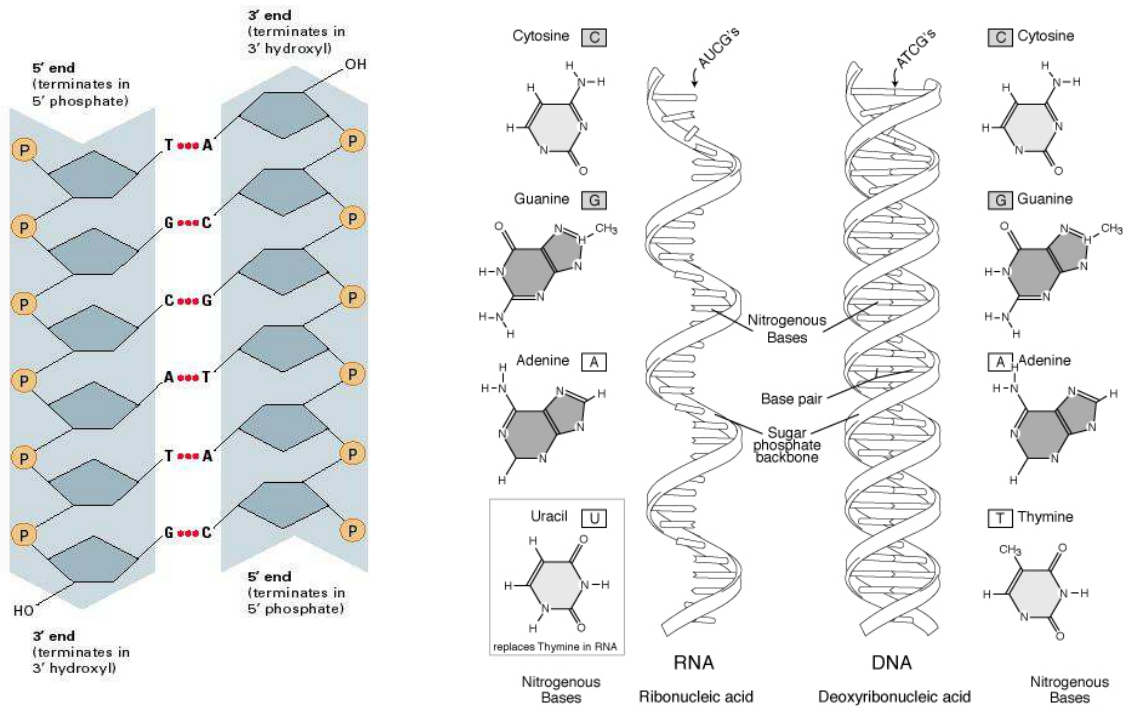
Een polynucleotide of DNA-streng wordt opgebouwd uit verschillende monomeren van nucleotiden in de monofosfaat vorm. Meer bepaald zijn hierbij de nucleotiden -als monofosfaat verbinding- via fosfodiëster verbindingen aan elkaar gekoppeld tot een lineair polymeer. Hierbij wordt de 5' fosfaat groep van één nucleotide via een ester gebonden aan de 3' hydroxyl (OH) groep van een tweede nucleotide. Er ontstaat hierdoor een lineair polymeer, het polynucleotide, dat een polariteit vertoont: het polynucleotide heeft een vrije 5' fosfaatgroep en -aan het andere uiteinde- een vrije 3'OH groep.

In een dergelijk polynucleotide vindt men de vier verschillende basen terug, waarbij er geen *a priori* restricties zijn op hun onderlinge volgorde in het polymeer. We noemen in een polynucleotide de volgorde van de nucleotiden –bepaald door de aard van de purine of pyrimidine basen- de DNA sequentie. Voor een DNA-streng van 100 opeenvolgende basen zijn er derhalve  $4^{100}$  (ongeveer  $10^{60}$ ) verschillende sequenties mogelijk. Per conventie wordt de sequentie van een DNA-streng altijd gelezen van 5' naar 3'.

### VIII.2.2 *DNA is een dubbelstrengige molecule.*

DNA is opgebouwd uit twee DNA strengen die anti-parallel georiënteerd zijn ten opzichte van elkaar. De strengen kunnen slechts een dubbelstrengige structuur vormen wanneer de tegenover elkaar gelegen basen complementair zijn. De regels van de basencomplementariteit eisen dat tegenover een A altijd een T is gelegen, tegenover een C altijd een G. De reden voor deze basencomplementariteit is dat DNA slechts een regelmatige structuur kan aannemen wanneer (i) een purine van één streng tegenover een pyrimidine van de tweede streng komt te liggen en (ii) er regelmatige waterstofbruggen kunnen gevormd worden tussen beide basen. De beide strengen worden in DNA namelijk aan elkaar gebonden via twee waterstofbruginteracties tussen elke A en T en via drie waterstofbruginteracties tussen elke G en C. Twee tegenover elkaar gelegen basen in twee verschillende strengen die via waterstofbruginteracties gebonden zijn, wordt een basenpaar genoemd. DNA bestaat dus uit twee anti-parallel georiënteerde polynucleotidestringen die via de regels van de basencomplementariteit verbonden zijn in opeenvolgende basenparen.





DNA heeft hierdoor een regelmatige structuur waarbij de ruggengraat gevormd wordt door de opeenvolgende desoxyribose-fosfaat groepen van de twee strengen en loodrecht hierop naar binnen georiënteerd, de sequenties van tegenover elkaar gelegen basen in waterstofbruginteractie. Dit betekent verder dat de sequentie van één DNA-streng de sequentie van de complementaire streng ondubbelzinnig bepaalt.

Deze structuur organiseert zich in de cellen als een regelmatige, rechtsdraaiende dubbele helix waarbij twee types van groeven ontstaan: de grote en de kleine groeve. In de grote groeve is de sequentie van de opeenvolgende basen relatief meer geëxposeerd naar het milieu. Het is ter hoogte van de grote groeve dat er sequentierkenning kan optreden door verschillende proteïnen die met DNA interageren en er eventueel op binden.

### VIII.2.3 DNA als informatiemolecule

Het is de DNA sequentie die de genetische informatie bepaalt: de volgorde van de vier verschillende basen in een DNA-molecule bepaalt de functie van deze DNA molecule. De variatie aan mogelijke sequenties is hierbij enorm: bij de mens telt de genetische informatie per genoom ongeveer  $3 \cdot 10^9$  basenparen. Het aantal mogelijke verschillende DNA-moleculen van die lengte is astronomisch groot  $4^{(3.000.000.000)}$ . Genen komen overeen met bepaalde gebieden in het DNA van een organisme. De lengte van genen is variabel, maar gemiddeld omvat het coderende gebied van een gen in prokaryoten en eukaryoten ongeveer 1.000

nucleotiden. Met het coderende gebied wordt dit deel van het gen bedoeld dat de synthese van een polypeptide bepaalt.

We drukken de lengte van een DNA molecule uit in basenparen. Een DNA fragment van 1.000 basenparen wordt ook aangeduid als 1 kilobasenpaar (of 1 kilobase wanneer het een enkelstrengige molecule betreft), afgekort als kb. Een DNA molecule met 1.000.000 basenparen komt dan overeen met 1 megabasenparen (megabasen als het een enkelstrengige molecule betreft), afgekort als Mb. Het DNA van de mens bedraagt ongeveer 3.000 Mb, of nog, 3 gigabasenparen (Gb).

Organismen hebben DNA als drager van de genetische informatie: een bacterie, een sequoia boom, een olifant, de mens of een fruitvlieg. DNA is dus de universele drager van de genetische informatie. Virussen zoals bepaalde bacteriofagen van bacteriën, verschillende plantenvirussen en het HIV-virus dat gecorreleerd is met AIDS bij de mens dragen een variant van DNA als fysische drager van de genetische informatie: het ribonucleïnezuur of RNA. RNA heeft een analoge basisstructuur als DNA maar is meestal enkelstrengig, bevat geen thymine maar in plaats daarvan uracil (met als nucleoside uridine) en bevat geen desoxyribose maar ribose. Het uracil in RNA gedraagt zich als thymine in DNA en vormt een basenpaar met A.

Terwijl DNA meestal dubbelstrengig is, vindt men RNA meestal als enkelstrengige molecule terug. Doordat er verschillende gebieden kunnen voorkomen binnen één RNA streng die complementair zijn aan elkaar kunnen er door intramoleculaire basenpaarvorming gebieden ontstaan die georganiseerd zijn als een "hairpin" structuur. Hoe uitgebreider de gebieden van complementariteit, hoe stabielere deze "hairpin" structuren. In een RNA molecule van 1 kb vindt men dan ook altijd min of meer korte gebieden van complementaire basen terug. Het resultaat is dan ook dat RNA in veel gevallen niet als lineaire molecule voorkomt maar als een molecule met een min of meer sterke secundaire en tertiaire structuur.

### **VIII.3 De replicatie van DNA.**

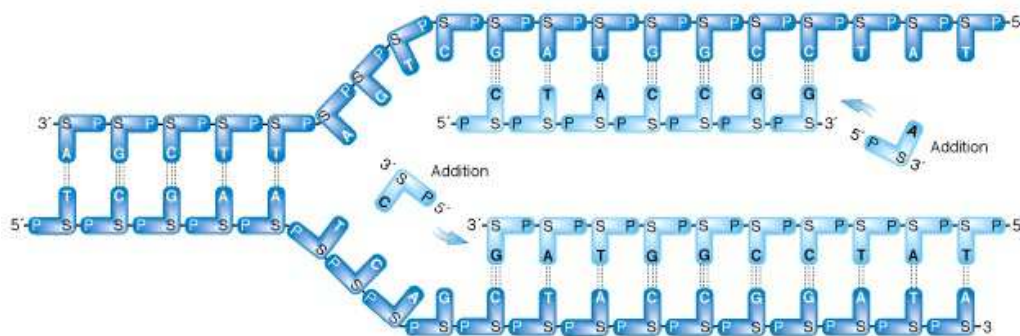
De replicatie van DNA is noodzakelijk om twee exacte kopijen van de genetische informatie te verkrijgen. Door transmissie van deze informatie naar de dochtercellen wordt het genoom doorgegeven aan de volgende generatie. Ook tijdens de meïose treedt replicatie van DNA op, maar doordat er maar één replicatieronde gebeurt terwijl er twee celdelingen doorgaan wordt de DNA inhoud per dochtercel gehalveerd en verkrijgt men haploïde cellen.

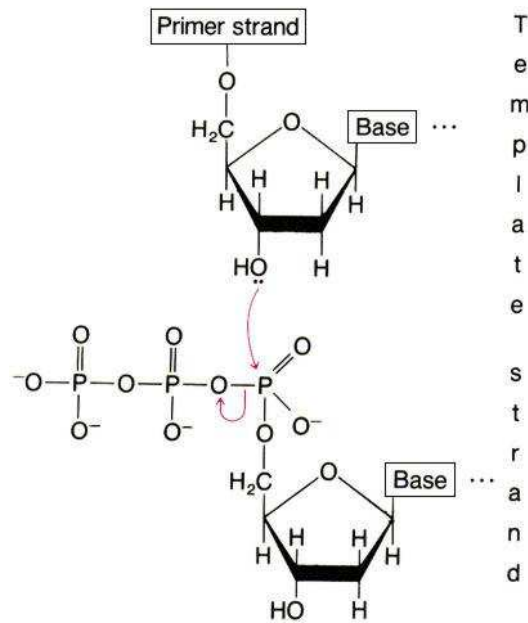
Replicatie is het best bestudeerd bij prokaryoten omdat deze organismen eenvoudiger te manipuleren zijn, er gemakkelijker mutaties kunnen geïsoleerd worden in de genen die nodig zijn voor de replicatie en zij een bijzonder kleine generatietijd hebben. Als modelorganismen zijn de bacteriën ideaal om fundamentele moleculair genetische processen te bestuderen.

Ook bij eukaryoten werkt men met modelorganismen. Vooral die soorten die zich snel reproduceren, weinig eisen stellen aan de voeding, klein zijn en dus in grote hoeveelheden tegelijk bestudeerd en bewaard kunnen worden zijn ideale modelorganismen. Voor genetisch onderzoek kiest men ook best voor modelorganismen met een relatief klein genoom. Dit vereenvoudigt de genetische analyses, het opstellen van genetische kaarten, het bepalen van de DNA-sequentie en de isolatie van mutanten. Voorbeelden van eukaryote modelsoorten zijn de gist *Saccharomyces cerevisiae*, de nematode (rondworm) *Caenorhabditis elegans*, de fruitvlieg *Drosophila melanogaster*, voor planten de zandraket *Arabidopsis thaliana*, en voor de vertebraten (gewervelde dieren) de muis *Mus musculus* en de zebravis.

In wat volgt wordt het replicatieproces beschreven zoals dat in bacteriën bestudeerd werd. De algemene principes zijn ook geldig voor eukaryoten.

Replicatie van DNA gebeurt semi-conservatief: de ouderlijke strengen worden ontwonden en elke streng wordt gebruikt als een mal, de template genoemd, om de synthese van een nieuwe streng mogelijk te maken. In de nieuw gesynthetiseerde streng worden de nucleotiden gepolymeriseerd door een enzym, het DNA polymerase, waarbij de keuze van de in te bouwen nucleotiden gebaseerd is op de identiteit van de tegenoverliggende base in de template streng. Een nieuwe nucleotide die ingebouwd wordt moet complementair zijn aan de tegenoverliggende nucleotide in de moederstreng. Afwijkende basen worden herkend en niet ingebouwd. Op die manier ontstaat er een nieuwe dubbele helix waarvan één streng afkomstig is van de oorspronkelijke DNA molecule en de ander streng nieuw gesynthetiseerd werd door het DNA polymerase. Dit is de reden waarom men spreekt over semi-conservatieve replicatie. De sequentie van de moederstreng bepaalt de sequentie van de nieuwe streng.





Deze twee strengen zijn uiteraard terug anti-parallel georiënteerd ten opzichte van elkaar. De synthese van de nieuwe streng gebeurt altijd in de  $5' \rightarrow 3'$  richting: de inbouw van een nieuwe nucleotide gebeurt aan een vrij  $3'OH$  uiteinde van een bestaande streng en het nucleotide is als een trifosfaat niet enkel het substraat maar levert ook de nodige energie voor de polymerisatie. Door het afsplitsen van twee fosfaatgroepen wordt er voldoende energie vrijgesteld om het DNA polymerase toe te laten de overblijvende  $5'$  fosfaat groep via een esterbinding te verbinden aan het  $3'OH$  uiteinde van de groeiende DNA streng.

DNA polymerasen hebben dus nood aan een template streng, de desoxynucleotide trifosfaten dATP, dGTP, dTTP en dCTP én een vrije  $3'OH$  groep om de nieuwe te polymeriseren streng te kunnen verlengen. Zonder dergelijke vrije  $3'OH$  groep kan het enzym niet starten. Wanneer een moederstreng vrijkomt wordt er daarom eerst een kort stukje polynucleotide gesynthetiseerd door een ander enzym, een RNA polymerase. Dit enzym kan starten met ATP, GTP, UTP en CTP en een template streng om een kort stukje dubbelstrengig gebied te maken door de nieuwe synthese van wat een RNA primer genoemd wordt. De primer is complementair met een kort gebied van de template streng maar is opgebouwd uit RNA.

Eens de primer van 50 tot 60 basenparen gemaakt is stopt het RNA polymerase en kan het DNA polymerase overnemen. Er is nu immers een vrije  $3'OH$  groep beschikbaar en de RNA primer kan nu verlengd worden met de synthese van DNA in de  $5' \rightarrow 3'$  richting.

Met een frequentie van ongeveer  $10^{-4}$  per basenpaar worden door het DNA polymerase basen geïncorporeerd die niet complementair zijn met de corresponderende base

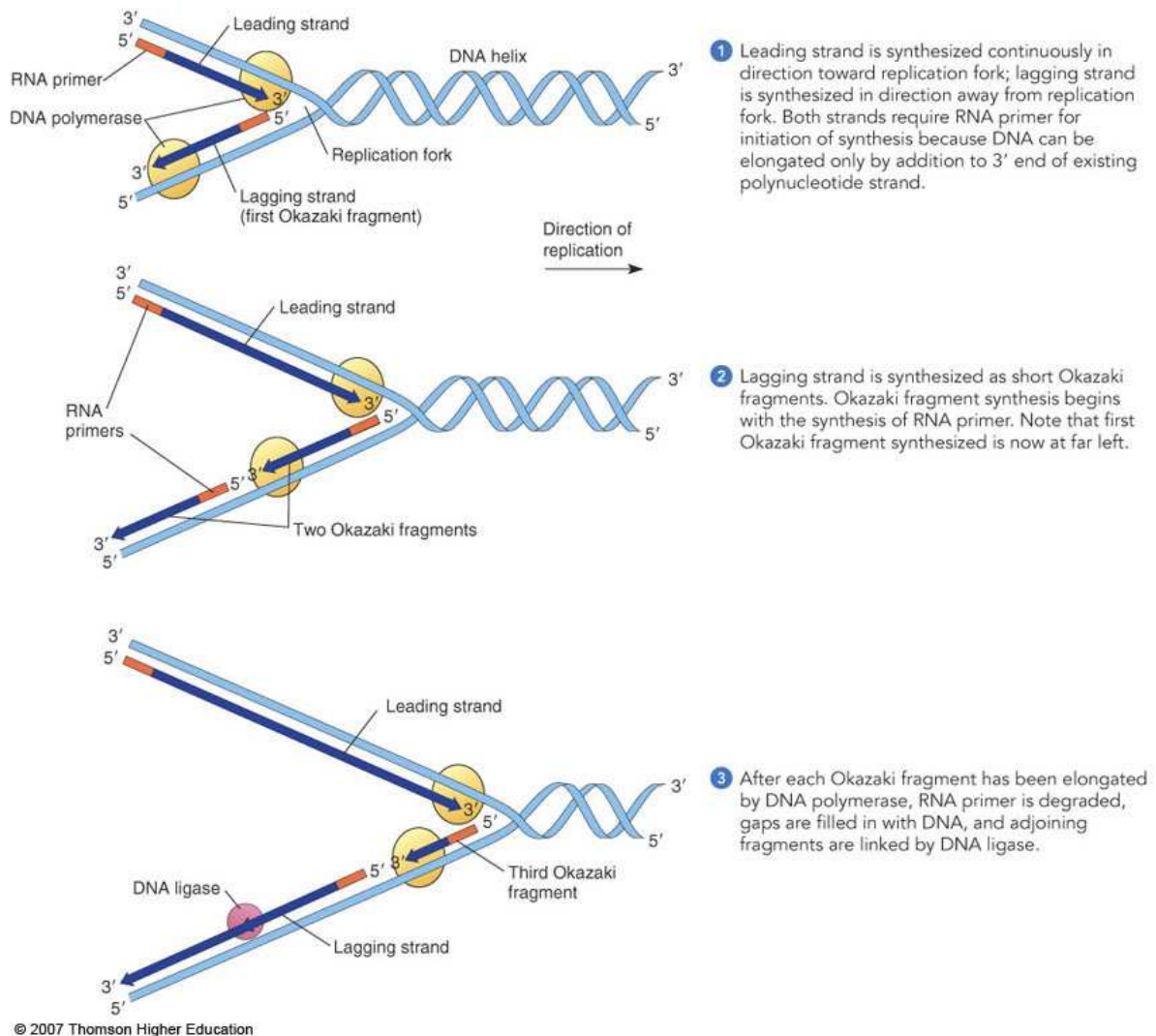
van de template streng. Dit kan aanleiding geven tot een mutatie waarbij het gen door de gewijzigde DNA sequentie ook een afwijkende activiteit kan hebben en hierdoor een mutant allel kan worden. DNA polymerasen hebben echter naast een 5'→3' polymerase activiteit ook een 3'→5' exonuclease activiteit. Deze activiteit laat toe om aan het 3'OH uiteinde verkeerd geïncorporeerde basen te verwijderen. Wanneer de verkeerde base weggeknipt is vervolgt het polymerase de polymerisatie. Door deze activiteit vermindert het aantal verkeerd ingebouwde basen tot ongeveer  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  per basenpaar. Cellen beschikken echter ook over additionele herstelsystemen die fouten in het DNA kunnen opsporen en herstellen zodat de uiteindelijke mutatiefrequentie na replicatie nog lager ligt ( $10^{-9}$ - $10^{-10}$  per basenpaar).

Vergelijk dit met het overschrijven van een cursus met  $\pm 600$  woorden per blad en ongeveer 200 bladzijden. De volledige cursus bevat dan 120.000 woorden en met gemiddeld 8 letters per woord, afgerond ongeveer 1.000.000 letters. Het foutenniveau na replicatie is vergelijkbaar met het 1.000 tot 10.000 keer overschrijven van de cursus en daarbij slechts één keer een fout maken in de spelling van een woord. En dit met een snelheid van 60.000 letters per minuut in bacteriën, 6.000 tot 600 letters per minuut in eukaryoten.

Het DNA polymerase in bacteriën heeft ook een 5'→3' exonuclease activiteit. De functie van deze activiteit ligt in het afwerken van de replicatie. Het replicatieproces vereist immers het openen van de DNA helix waardoor een replicatievork ontstaat. In de vork zijn de twee moederstrengen bruikbaar als template en de replicatie kan doorgaan doordat de vork opschuift en meer template DNA vrijkomt. De template die 3'→5' georiënteerd is ten opzichte van de groeivorkverschuiving laat een continue synthese van een nieuwe DNA streng toe door DNA polymerase in de 5'→3' richting, zoals vereist. Deze nieuwe streng wordt de leidende of "leading" streng genoemd. Voor de andere template streng stelt zich een probleem. Deze is 5'→3' georiënteerd ten opzichte van de groeivorkverschuiving en omdat DNA synthese alleen in de 5'→3' richting kan gebeuren is de verschuiving niet compatibel met een continue synthese van deze streng. De streng wordt de achterblijvende of "lagging" streng genoemd. De reden is dat naarmate er nieuw template DNA vrijkomt door groeivorkverschuiving, er een nieuwe primer gevormd wordt op basis waarvan nieuwe DNA synthese kan gebeuren tot aan het voorgaande, reeds gesynthetiseerde fragment. De synthese van de "lagging" streng gebeurt dus discontinue, via de vorming van verschillende fragmenten die de Okazaki fragmenten genoemd worden.

De Okazaki fragmenten worden hersteld door de werking van de 5'→3' exonuclease activiteit van DNA polymerasen. Hierdoor zal de RNA primer van een voorgaande fragment weggeknipt worden terwijl op hetzelfde ogenblik het volgende fragment via de 5'→3' polymerase activiteit aan het 3' OH uiteinde verlengd wordt. Uiteindelijk zijn de Okazaki fragmenten volledig opgebouwd uit DNA en liggen ze naast elkaar met nog steeds een

enkelstrengige breuk tussen beide. Hier neemt een ander belangrijk enzym over: het DNA ligase. Dit enzym herstelt met behulp van ATP enkelstrengige breuken in DNA door een esterbinding te vormen tussen een 5' fosfaatgroep en een 3'OH groep van naast elkaar en op één streng gelegen nucleotiden. De Okazaki fragmenten zijn nu allemaal covalent gebonden en vormen een continue, nieuwe DNA streng.



## Inhoudstafel

<b>I. De organisatie van de cel.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 De cel is de basiseenheid van leven. ....</b>	<b>1</b>
<b>I.2 De organisatie van cellen en hun grootte laat homeostasis toe. ....</b>	<b>3</b>
I.2.1 <i>De basisorganisatie van elke cel is gelijkaardig. ....</i>	3
I.2.2 <i>De grootte van een cel is gelimiteerd. ....</i>	4
<b>I.3 Twee types cellen liggen aan de basis van alle organismen: de prokaryote en de eukaryote cel. ....</b>	<b>6</b>
<b>I.4 Prokaryote cellen zijn metabolisch divers, eukaryote cellen zijn verscheiden in morfologie en activiteit.....</b>	<b>6</b>
<b>I.5 Studie van cellen gebeurt met een combinatie van verschillende methoden. ....</b>	<b>8</b>
I.5.1 <i>Lichtmicroscopen voor de studie van cellen. ....</i>	8
I.5.2 <i>Elektronenmicroscopie heeft een hoge resolutie en laat sterke vergroting toe. .</i>	11
I.5.3 <i>Celfractionering laat de studie van celcomponenten toe. ....</i>	12
<b>I.6 Prokaryote cellen zijn structureel eenvoudiger dan eukaryote cellen. ....</b>	<b>14</b>
<b>I.7 Eukaryote cellen bevatten organellen. ....</b>	<b>14</b>
I.7.1 <i>De nucleus bevat de genetische informatie. ....</i>	16
I.7.2 <i>Het endoplasmatisch reticulum als centrum van synthese. ....</i>	19
I.7.3 <i>Het Golgi-apparaat modificeert en verpakt proteïnen. ....</i>	21
I.7.4 <i>Lysosomen zijn betrokken bij vertering. ....</i>	23
I.7.5 <i>Vacuolen hebben variabele functies. ....</i>	24
I.7.6 <i>Mitochondriën produceren ATP door cellulaire respiratie. ....</i>	25
I.7.7 <i>Chloroplasten zetten lichtenergie om in ATP. ....</i>	27
I.7.8 <i>Peroxisomen zijn betrokken in de afbraak van kleine, organische verbindingen. ...</i>	29
<b>I.8 Eukaryote cellen hebben een cytoskelet. ....</b>	<b>29</b>
I.8.1 <i>Microtubuli zijn holle cilinders. ....</i>	30
I.8.2 <i>Cilia en flagellen zijn opgebouwd uit microtubuli. ....</i>	32
I.8.3 <i>Microfilamenten bestaan uit actine-vezels. ....</i>	34
I.8.4 <i>Intermediaire filamenten stabiliseren de celvorm. ....</i>	34
<b>I.9 De structuren aan de buitenkant van eukaryote cellen.. ....</b>	<b>35</b>
<b>II. Biologische membranen.....</b>	<b>37</b>
<b>II.1 Biologische membranen bestaan uit vetten en proteïnen. ....</b>	<b>37</b>
II.1.1 <i>De vetcomponent in membranen is opgebouwd uit fosfolipiden. ....</i>	37
II.1.2 <i>Biologische membranen als twee-dimensionele vloeistoffen ....</i>	40
II.1.3 <i>Biologische membranen vormen vesikels door fusie. ....</i>	41
II.1.4 <i>Membranen bevatten integrale en perifere proteïnen. ....</i>	41
II.1.5 <i>Membraanproteïnen zijn asymmetrisch georiënteerd in een membraan. ....</i>	43
II.1.6 <i>Membraanproteïnen functioneren ondermeer in transport, signaal transductie of als enzymen. ....</i>	43
<b>II.2 Celmembranen hebben een selectieve permeabiliteit. ....</b>	<b>44</b>
II.2.1 <i>Diffusie van moleculen ....</i>	46
II.2.2 <i>Osmose ....</i>	47
II.2.3 <i>Turgordruk ....</i>	49
II.2.4 <i>Gefaciliteerde diffusie ....</i>	49
II.2.5 <i>Actief transport. ....</i>	51

II.2.6	<i>Indirect actief transport (co-transport)</i> .....	55
II.2.7	<i>Endocytose en exocytose, processen voor het transport van grotere partikels.</i> .	55
<b>II.3</b>	<b>Celmembranen zijn betrokken in signaaltransductie.</b> .....	<b>59</b>
<b>II.4</b>	<b>Juncties zijn gespecialiseerde contacten tussen cellen.</b> .....	<b>61</b>
II.4.1	<i>“Anchoring junctions”</i> .....	62
II.4.2	<i>“Tight junctions”</i> .....	63
II.4.3	<i>“Gap junctions”</i> .....	64
II.4.4	<i>Plasmodesmata in plantencellen</i> .....	65
<b>III.</b>	<b>De energetische en chemische huishouding van de cel</b> .....	<b>66</b>
<b>III.1</b>	<b>Energetische processen in de cel</b> .....	<b>66</b>
III.1.1	<i>ATP als energiemolecule</i> .....	66
III.1.2	<i>Redox-reacties zijn betrokken bij energietransfer in de cel.</i> .....	68
<b>III.2</b>	<b>Enzymen als biologische katalysatoren</b> .....	<b>71</b>
III.2.1	<i>Enzymen verlagen de activeringsenergie van een reactie</i> .....	71
III.2.2	<i>Enzymen zijn specifiek.</i> .....	72
III.2.3	<i>Verskillende enzymen werken met co-factoren.</i> .....	73
III.2.4	<i>Enzymen functioneren slechts goed onder bepaalde condities.</i> .....	75
III.2.5	<i>Enzymen werken in metabolische reactiewegen die sterk gereguleerd zijn.</i> .....	76
<b>IV.</b>	<b>De synthese van ATP door afbraak van moleculen</b> .....	<b>80</b>
<b>IV.1</b>	<b>Aerobe respiratie als redox-proces</b> .....	<b>80</b>
<b>IV.2</b>	<b>De aerobe respiratie van glucose</b> .....	<b>81</b>
IV.2.1	<i>De glycolyse splitst glucose in twee moleculen pyruvaat en levert energie.</i> .....	82
IV.2.2	<i>De vorming van acetyl CoA.</i> .....	86
IV.2.3	<i>Tijdens de citroenzuurcyclus wordt acetyl CoA geoxideerd.</i> .....	87
IV.2.4	<i>De elektronen transportketen wordt gekoppeld aan de synthese van ATP.</i> .....	91
IV.2.5	<i>De totale energieopbrengst van de aerobe respiratie van glucose bedraagt 30 tot 32 ATP's.</i> .....	94
<b>IV.3</b>	<b>Ook de respiratie van andere nutriënten kan energie opleveren</b> .....	<b>95</b>
<b>IV.4</b>	<b>Cellen reguleren de aerobe respiratie</b> .....	<b>97</b>
<b>IV.5</b>	<b>Anaerobe respiratie en fermentatie in afwezigheid van zuurstof</b> .....	<b>98</b>
<b>V.</b>	<b>De fotosynthese</b> .....	<b>101</b>
<b>V.1</b>	<b>Fotosynthese in eukaryoten gebeurt in de chloroplasten.</b> .....	<b>101</b>
<b>V.2</b>	<b>Bij de fotosynthese wordt lichtenergie omgezet in chemische bindingen.</b> .....	<b>104</b>
V.2.1	<i>Energieproductie tijdens de lichtafhankelijke fase</i> .....	105
V.2.2	<i>Tijdens de koolstoffixatie worden suikers geproduceerd.</i> .....	106
<b>V.3</b>	<b>De lichtafhankelijke reacties</b> .....	<b>106</b>
V.3.1	<i>Niet-cyclisch elektronentransport bij de productie van ATP en NADPH</i> .....	107
V.3.2	<i>Cyclisch elektronentransport bij de productie van ATP</i> .....	110
V.3.3	<i>ATP synthese via chemi-osmose</i> .....	111
<b>V.4</b>	<b>Koolstoffixatie</b> .....	<b>112</b>
<b>V.5</b>	<b>In C<sub>4</sub> en CAM planten wordt de CO<sub>2</sub> opname gereguleerd</b> .....	<b>116</b>
V.5.1	<i>De C<sub>4</sub> reactieweg fixeert CO<sub>2</sub> bij lage concentraties.</i> .....	116
V.5.2	<i>CAM-planten fixeren CO<sub>2</sub> 's nachts.</i> .....	119
V.5.3	<i>Fotorespiratie reduceert de efficiëntie van fotosynthese.</i> .....	120



<b>VI. Chromosomen, mitose en meiose.....</b>	<b>123</b>
<b>VI.1 Eukaryote chromosomen dragen genetische informatie. ....</b>	<b>123</b>
VI.1.1 <i>De chromosomen dragen genen. ....</i>	124
VI.1.2 <i>Varianten van een gen worden allelen genoemd.....</i>	125
VI.1.3 <i>Het aantal allelen per gen in de cel is gelinkt aan het aantal sets chromosomen in de cel. ....</i>	127
<b>VI.2 Celgroei en deling .....</b>	<b>129</b>
VI.2.1 <i>De celcyclus.....</i>	130
VI.2.2 <i>De mitose verdeelt chromosomen over twee zustercellen. ....</i>	131
VI.2.3 <i>Cytokinese .....</i>	134
VI.2.4 <i>Organellen worden willekeurig over de dochtercellen verdeeld. ....</i>	134
<b>VI.3 Seksuele voortplanting vereist reductiedeling of meiose. ....</b>	<b>135</b>
VI.3.1 <i>Meiose I.....</i>	136
VI.3.2 <i>Meiose II.....</i>	139
VI.3.3 <i>De positie van de meiose in de levenscyclus varieert tussen soorten. ....</i>	140
<b>VII. De erfelijkheidswetten.....</b>	<b>141</b>
<b>VII.1 Monohybride kruisingen .....</b>	<b>141</b>
<b>VII.2 Kansrekening bij de voorspelling van overerving.....</b>	<b>144</b>
<b>VII.3 Dihybride en multihybride kruisingen.....</b>	<b>145</b>
<b>VII.4 Het geslacht wordt bepaald door geslachtschromosomen.....</b>	<b>147</b>
VII.4.1 <i>Bij de meeste zoogdieren bepaalt het Y chromosoom het mannelijk geslacht. .</i>	148
VII.4.2 <i>Genen op geslachtschromosomen vertonen afwijkende overervingspatronen. ....</i>	150
VII.4.3 <i>Dosis compensatie kalibreert de expressie van X gekoppelde genen. ....</i>	151
<b>VII.5 Koppeling en recombinatie van genen .....</b>	<b>153</b>
VII.5.1 <i>Gekoppelde genen segregeren niet onafhankelijk. ....</i>	153
VII.5.2 <i>Recombinatie en de lineaire volgorde van genen op een chromosoom .....</i>	154
<b>VII.6 Uitbreidingen op de wetten van Mendel .....</b>	<b>157</b>
VII.6.1 <i>Dominantie is niet altijd compleet. ....</i>	157
VII.6.2 <i>Een gen kan meer dan twee allelen hebben. ....</i>	158
VII.6.3 <i>Eén gen kan verschillende eigenschappen van een organisme beïnvloeden....</i>	159
VII.6.4 <i>Twee of meer genen kunnen één kenmerk beïnvloeden. ....</i>	160
VII.6.5 <i>Continue variatie kan verklaard worden door de wetten van Mendel. ....</i>	163
VII.6.6 <i>Een bepaald genotype veroorzaakt niet noodzakelijk steeds hetzelfde fenotype....</i>	164
.....	164
<b>VIII. DNA: de fysische drager van genetische informatie .....</b>	<b>167</b>
<b>VIII.1 Bewijs dat DNA de drager is van genetische informatie .....</b>	<b>167</b>
<b>VIII.2 De structuur van DNA .....</b>	<b>172</b>
VIII.2.1 <i>Nucleotiden kunnen covalent verbonden worden in elke mogelijke volgorde. ....</i>	173
VIII.2.2 <i>DNA is een dubbelstrengige molecule.....</i>	173
VIII.2.3 <i>DNA als informatiemolecule .....</i>	174
<b>VIII.3 De replicatie van DNA. ....</b>	<b>175</b>
<b>IX. De expressie van genetische informatie .....</b>	<b>180</b>
<b>IX.1 De genetische code .....</b>	<b>181</b>
IX.1.1 <i>De rol van codons in open leesramen .....</i>	181
IX.1.2 <i>De code is redundant.....</i>	182
IX.1.3 <i>Mutaties corresponderen met wijzigingen in de DNA sequentie. ....</i>	182

IX.1.4	<i>De universaliteit van de genetische code</i> .....	184
<b>IX.2</b>	<b>Transcriptie: RNA synthese op basis van een DNA template</b> .....	<b>185</b>
IX.2.1	<i>Promoters zijn DNA sequenties nodig voor de start van transcriptie</i> .....	185
IX.2.2	<i>Het boodschapper RNA of mRNA</i> .....	187
IX.2.3	<i>Post-transcriptionele modificatie van RNA is typisch voor eukaryoten.</i> .....	187
<b>IX.3</b>	<b>Translatie: de vertaling van een RNA-sequentie naar een aminozuursequentie.</b> .....	<b>190</b>
IX.3.1	<i>Ribosomen: enzymcomplexen betrokken in translatie</i> .....	190
IX.3.2	<i>Transfer RNA, tRNA, brengt aminozuren naar de ribosomen.</i> .....	191
IX.3.3	<i>Het translatieproces: initiatie, elongatie en terminatie</i> .....	192
<b>X.</b>	<b>Genregulatie: controle van genexpressie</b> .....	<b>195</b>
<b>X.1</b>	<b>Genregulatie in prokaryoten</b> .....	<b>195</b>
X.1.1	<i>Regulatie van het lac operon: negatieve regulatie via een repressor.</i> .....	196
X.1.2	<i>Regulatie van het lac operon: positieve regulatie via een activator/co-activator</i> .....	198
X.1.3	<i>Regulatie van het trp operon: expressie wordt verhinderd door een repressor/corepressor complex.</i> .....	200
X.1.4	<i>Een regulon: een groep van functioneel verwante operons die gemeenschappelijk gereguleerd worden.</i> .....	201
X.1.5	<i>Post-transcriptionele controle in prokaryoten</i> .....	202
<b>X.2</b>	<b>Genregulatie in eukaryoten</b> .....	<b>202</b>
X.2.1	<i>Regulatie van transcriptie initiatie</i> .....	202
X.2.2	<i>Post-transcriptionele controle in eukaryoten</i> .....	206
X.2.3	<i>Genregulatie door wijzigingen in het chromatine</i> .....	209
X.2.4	<i>Niet-coderend RNA speelt een essentiële rol in eukaryote genregulatie</i> .....	212