

CELLULAIRE EN MOLECULAIRE BIOLOGIE

Academiejaar 2021-2022

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.

Kleurfoto voorpagina: Plantenwortel door Fernan Federici

INHOUD

DEEL I: INLEIDING EN CELLEN..... FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

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 CELLENFOUT! 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.**

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.**
- 6.3.2. *Intermediaire filamenten* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
- 6.4. EXTRACELLULAIRE STRUCTUREN EN INTERCELLULAIRE VERBINDINGEN . **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 6.4.1. *Dierlijke cellen hebben een extracellulaire matrix en kunnen op verschillende manier met elkaar verbonden zijn*..... **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 6.4.2. *Plantencellen hebben een stevige celwand met plasmodesmata* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 - 6.4.3. *Gisten, schimmels en oömyceten hebben ook een celwand.* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

DEEL II: DNA-STRUCTUUR, -REPLICATIE EN -ANALYSE.....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.**

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 CEL.....FOUT! 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 EUKARYOTISCHE CELDELING.....FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 12.1. MITOTISCHE CELDELING..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

12.2.	MEIOTISCHE CELDELING	FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.
HOOFDSTUK 13 DNA-REPLICATIE IN VITRO EN SEQUENTIE-ANALYSE		7
13.1.	POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR): ZIE OOK PRACTICUM.....	7
13.2.	SEQUENTIE-ANALYSE	9
13.3.	ETHISCHE ASPECTEN VAN DNA-ANALYSE	13
HOOFDSTUK 14 MUTATIE, RECOMBINATIE & GENOOMEVOLUTIE		14
14.1.	MUTATIES EN HUN HERSTEL	14
14.1.1.	<i>Fouten bij DNA-synthese</i>	<i>14</i>
14.1.2.	<i>Spontane schade aan basen.....</i>	<i>17</i>
14.1.3.	<i>UV-schade aan DNA en NER</i>	<i>17</i>
14.1.4.	<i>Herstel dubbelstrengige (ds) DNA-breuk.....</i>	<i>18</i>
14.2.	GROTE DNA-HERSCHIKKINGEN.....	19
14.3.	GENOOMANALYSE TOONT GENOOMEVOLUTIE	21
14.3.1.	<i>Genomevolutie</i>	<i>21</i>
14.3.2.	<i>Horizontale gentransfer</i>	<i>22</i>
DEEL III: GENEXPRESSIE		24
HOOFDSTUK 15 TRANSCRIPTIE		25
15.1.	HET CENTRALE DOGMA VAN DE MOLECULAIRE BIOLOGIE.....	25
15.2.	TRANSCRIPTIE, OVERSCHRIJVEN VAN DNA-INFORMATIE NAAR RNA	26
15.2.1.	<i>RNA als boodschapper</i>	<i>26</i>
15.2.2.	<i>RNA versus DNA-moleculen</i>	<i>27</i>
15.2.3.	<i>Principe van RNA-synthese op een DNA-template</i>	<i>27</i>
15.3.	TRANSCRIPTIE IN PROKARYOTEN.....	29
15.3.1.	<i>RNA-polymerase in E. coli.....</i>	<i>29</i>
15.3.2.	<i>Het transcriptieproces in E. coli.....</i>	<i>29</i>
15.4.	TRANSCRIPTIE IN EUKARYOTEN	FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.
15.4.1.	<i>RNA-polymerasen in eukaryoten.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
15.4.2.	<i>Verschillen bij transcriptie in eukaryoten t.o.v. prokaryoten ...</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
15.4.3.	<i>Transcriptie in eukaryoten d.m.v. RNA-polymerase II.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
15.4.4.	<i>Transcriptie in eukaryoten d.m.v. RNA-polymerase I en III (enkel ter info)...</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
HOOFDSTUK 16 RNA FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.		
16.1.	MRNA, DE BOODSCHAPPER.....	FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.
16.1.1.	<i>mRNA in prokaryoten</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.1.2.	<i>mRNA in eukaryoten, algemeen</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.1.3.	<i>Interne modificatie bij eukaryote mRNAs: splicing</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.1.4.	<i>Modificaties aan de uiteinden van eukaryotische mRNAs.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.2.	RIBOSOMAAL RNA OF RRNA	FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.
16.2.1.	<i>Ribosoomstructuur.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.2.2.	<i>rRNA-structuur.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.2.3.	<i>rRNA-genen (rDNA).....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.2.4.	<i>Transcriptie en "processing" van rRNA.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.3.	TRANSFER-RNA OF tRNA.....	FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.
16.3.1.	<i>Structuur en functie van tRNA.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.3.2.	<i>Transcriptie en "processing" van tRNA.....</i>	<i>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.</i>
16.4.	KLEINE RNAS & LANGE NIET-CODERENDE RNAS (LNCRNAs).....	FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.
HOOFDSTUK 17 SPLICING, EDITING EN KATALYTISCH RNA.FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.		
17.1.	GU-AG-SPLICING BIJ DE VORMING VAN MRNA	FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 17.2. ALTERNATIEVE SPLICING BIJ DE VORMING VAN mRNA..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 17.3. ANDERE TYPES VAN INTRONS **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 17.4. TRANS-SPLICING **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 17.5. RNA-EDITING **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 17.6. EVOLUTIEVE OVERWEGINGEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 17.7. RIBOZYMES **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 18 TRANSLATIE FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 18.1. EIWITTEN ZIJN POLYMEREN VAN AMINOZUREN (EVEN HERHALEN VAN HFST. 2) **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 18.2. DE GENETISCHE CODE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 18.2.1. *Het codewoord is een triplet van nucleotiden Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 18.2.2. *Opheldering van de code Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 18.2.3. *Kenmerken van de genetische code (Figuur 18.2) Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
- 18.3. DE ROL VAN tRNA IN TRANSLATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 18.3.1. *De adaptorrol van tRNA via codon-anticodon interactie Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 18.3.2. *Aminoacylatie van het tRNA Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
- 18.4. TRANSLATIE IN PROKARYOTEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 18.4.1. *Initiatie van translatie in prokaryoten Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 18.4.2. *Elongatie van translatie in prokaryoten Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 18.4.3. *Terminatie van translatie in prokaryoten Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
- 18.5. TRANSLATIE IN EUKARYOTEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 18.6. MUTATIES EN TRANSLATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 18.7. INHIBITOREN VAN TRANSLATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 18.8. POSTTRANSLATIONELE PROCESSING VAN EIWITTEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 18.9. EIWITTRANSLOCATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 19 GENREGULATIE BASIS & PROKARYOTEN ..FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 19.1. BASISPRINCIPES CONTROLE VAN GENEXPRESSIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 19.1.1. *Waarom regulatie van genexpressie? Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 19.1.2. *Mogelijke strategieën om de hoeveelheid genproduct te reguleren Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
- 19.2. REGULATIE VAN TRANSCRIPTIE-INITIATIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 19.2.1. *Negatieve en positieve regulatie van genexpressie Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 19.2.2. *Lactose-operon in E. coli is een induceerbaar operon Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 19.2.3. *Tryptofaanoperon in E. coli is een represserbaar operon..... Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 19.2.4. *Regulatorische sequenties en DNA-bindende eiwitten Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*

HOOFDSTUK 20 GENREGULATIE EUKARYOTEN E.A.FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.

- 20.1. CONTROLE VAN TRANSCRIPTIE-INITIATIE..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 20.1.1. *Transcriptiefactoren Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 20.1.2. *Voorbeelden van transcriptionele genregulatie bij eukaryoten Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 20.1.3. *Regulatie tijdens ontwikkeling Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
- 20.2. DNA-HERSCHIKKINGEN **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
- 20.3. POSTTRANSCRIPTIONELE REGULATIE..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 - 20.3.1. *Ter hoogte van RNA-processing (vnl. eukaryoten) Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 20.3.2. *Door controle van mRNA-stabiliteit Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 20.3.3. *RNAi Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
 - 20.3.4. *Controle op niveau van translatie Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.*
- 20.4. GENREGULATIE VIA CHROMATINE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

- 20.4.1. *Chromatinestructuur* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
 20.4.2. *DNA-methylatie* **Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

DEEL IV: (EPI)GENETICA EN GENTECHNOLOGIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 21 OVERERFING 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-EXPRESSIE **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

- 22.1. *KLASSIEKE DEFINITIE VAN EEN GEN*..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**
 22.2. *MOLECULAIRE DEFINITIE VAN EEN GEN BIJ PROKARYOTEN*. **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.**

AFKORTINGEN..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

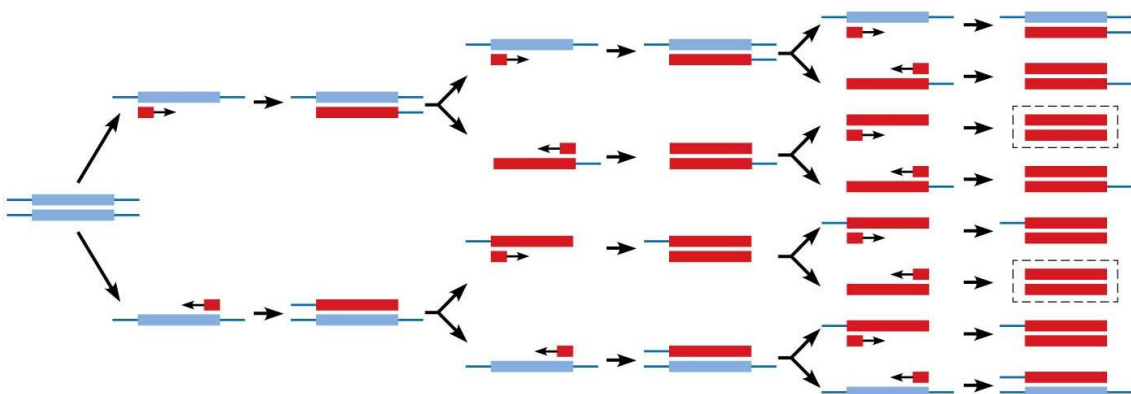
VERKLARENDE WOORDENLIJST..... **FOUT! BLADWIJZER NIET GEDEFINIEERD.**

HOOFDSTUK 13 DNA-REPLICATIE IN VITRO en SEQUENTIE-ANALYSE

13.1. 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, 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 enzym moet toegevoegd worden (de meeste enzymen verliezen hun activiteit bij hoge temperaturen), bijgevolg kan de reactie geautomatiseerd worden. PCR is een cyclus van denaturatie (95°C), binden van primers (50-60°C) en DNA-synthese (72°C, optimale temperatuur voor het thermostabiele TaqI-DNA-polymerase) die herhaald wordt.



Figuur 13.1: Exponentieel verloop van een PCR. Na elke cyclus van denaturatie en DNA-synthese wordt het aanwezige doel-DNA verdubbeld.

De reactie kan herhaald worden voor een 30-40 cycli, waarbij het DNA tussen en ter hoogte van de primers exponentieel vermenigvuldigd wordt (Figuur 13.1), 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

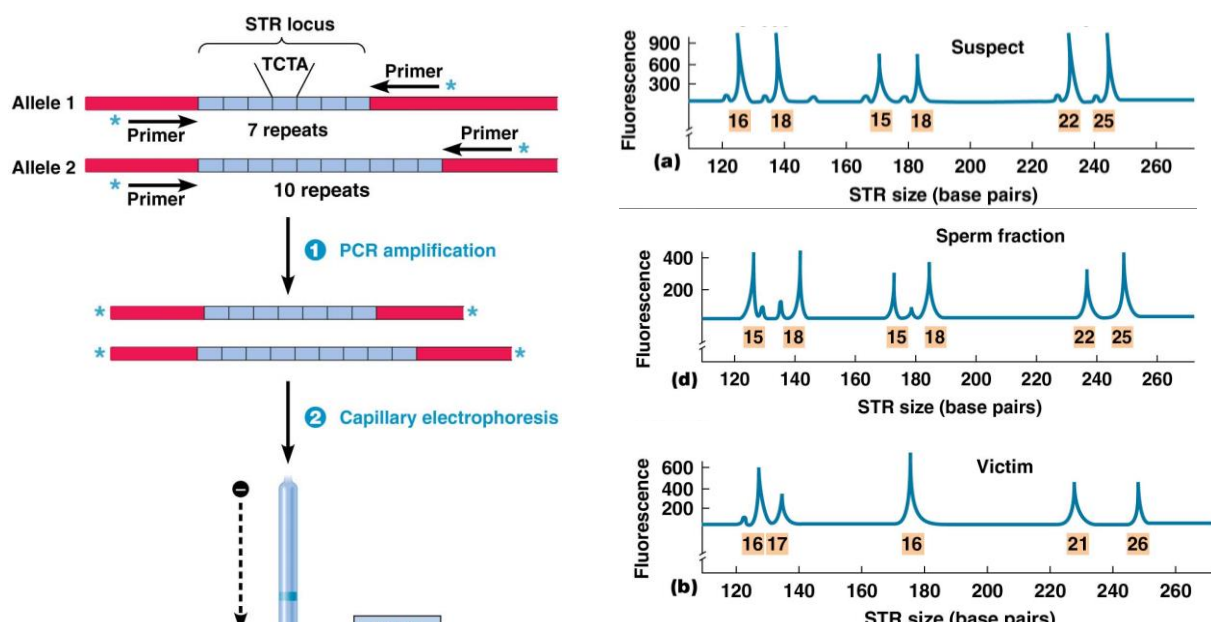
fragment moet gekend zijn, maar er zijn technieken ontwikkeld om dat te omzeilen. Door de grote gevoeligheid van de PCR-reactie moet er wel altijd opgepast worden voor contaminatie. Eén molecule die via een stofje of aerosolruppeltje in de proefbuis terecht komt kan een vals positief resultaat geven.

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 weinig of geen verschillen in DNA-sequentie vertonen tussen individuele personen. 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 14.1.1). 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.

In figuur 13.2 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) in plaats van agarose.



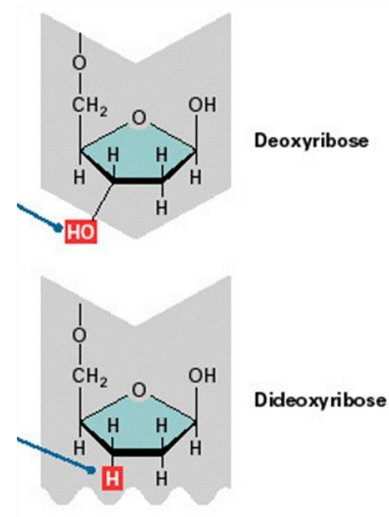
Figuur 13.2: STR-analyse via capillaire gelelektroforese. Links: Het principe voor 1 locus waarbij twee allelen van elkaar kunnen onderscheiden worden op basis van lengte van de STR. Rechts: De analyse van 3 loci bij drie verschillende stalen (cijfer in hokje nl. 15-26 = aantal motiefherhalingen) waarbij meestal 2 verschillende allelen gedetecteerd worden.

13.2. Sequentie-analyse

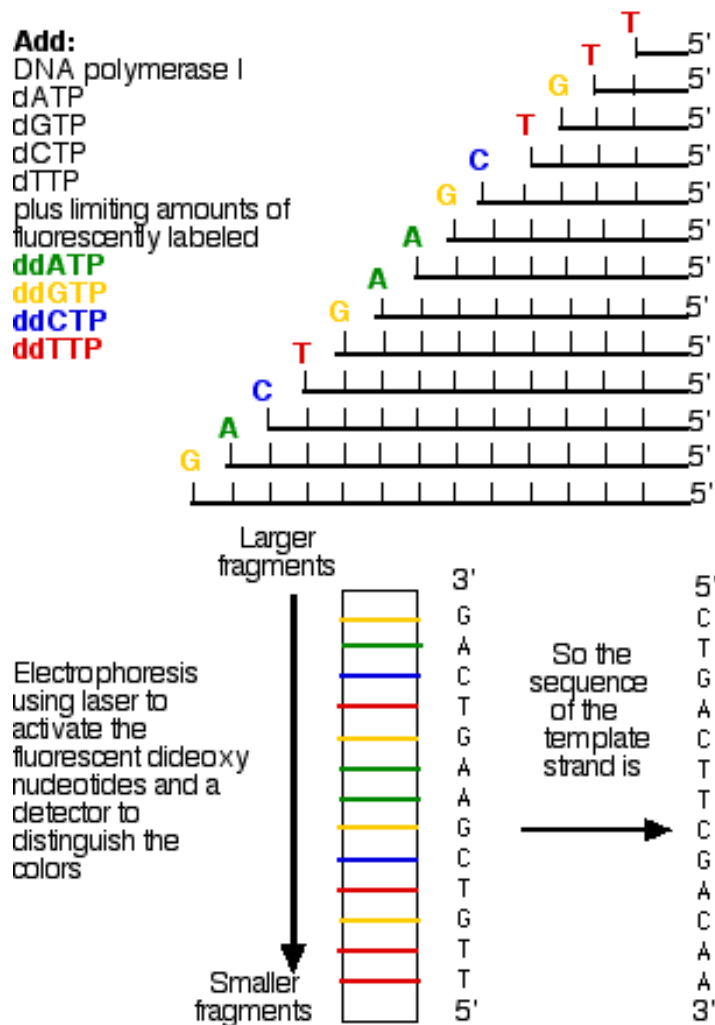
Een oudere (sinds 1977) maar nog steeds gebruikte methode voor het bepalen van de DNA-nucleotidesequentie-volgorde is de **dideoxymethode van Sanger** die gebaseerd is op DNA-synthese. Hierbij worden gelijktijdig vier analoge reacties uitgevoerd. De eerste stap is het basenparen van een primer op enkelstrengig DNA (meestal wordt vertrokken vanuit de vectorsequentie waarin het te sequencen stuk DNA is ingeplakt en waartegen dus een universele primer kan gebruikt worden). Dan wordt de DNA-synthese in de vier verschillende reacties gestart door het DNA-polymerase en de vier nucleotiden. In elk van de vier reacties wordt echter telkens ook een dideoxynucleotide (ddNTP) toegevoegd (Figuur 13.3). 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, maar 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, enz..

Figuur 13.3: structuur van een dNTP (boven, zonder base) en een ddNTP (onder, zonder base) waarbij de OH-groep ontbreekt.

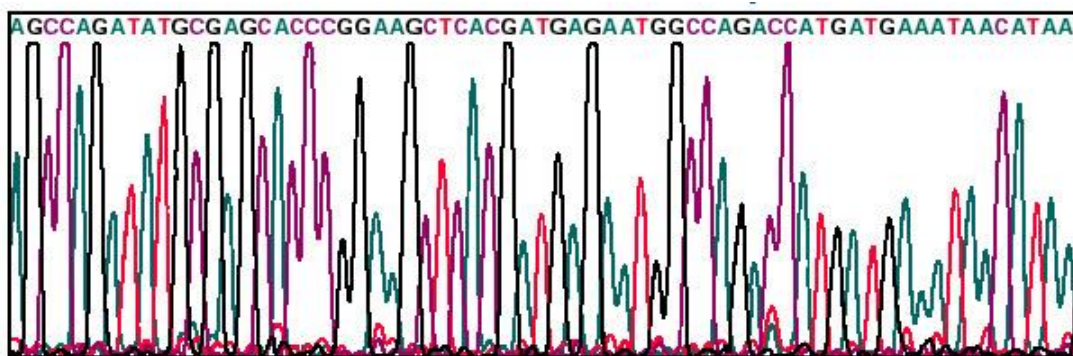
Genetics, analysis of genes and genomes, D.L. Hartl & E.W. Jones



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 algemeen gebruikte variant 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 (Figuur 13.4).



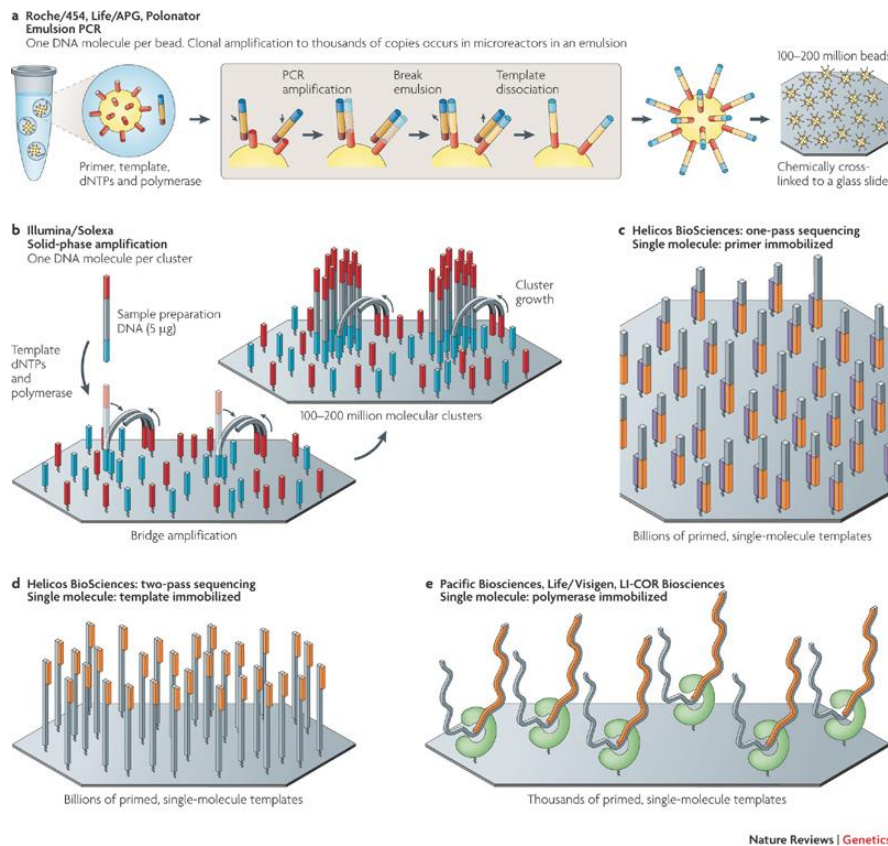
Figuur 13.4: Mechanisme van Sanger sequencer met fluorescente labeling.



Figuur 13.5: Chromatogram van Sanger-reactie.

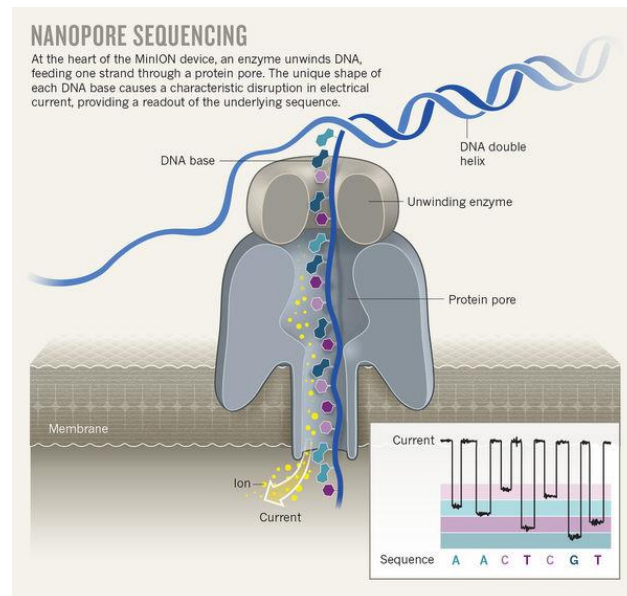
De dideoxymethode wordt nog steeds gebruikt voor het sequencen van specifieke sequenties bv. ter controle van een PCR-product of een nieuwe recombinante molecule. De output van zo'n sequencing wordt typisch voorgesteld in een chromatogram waarbij de verschillende pieken de verschillende nucleotiden weergeven in de juiste volgorde. De hoogte van de piek heeft de betrouwbaarheid van het resultaat weer (Figuur 13.5).

Er zijn intussen heel wat andere methoden ontwikkeld bv. pyrosequencing (454), illumina, die massale hoeveelheden sequenties tegelijk uitvoeren, die worden gebruikt om bv. een volledig genoom (in overlappende stukjes) te sequencen. Deze nieuwere methoden worden de **next generation sequencing** genoemd en alhoewel de details 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 product en geen gel, waardoor de kost per reactie veel lager ligt. Terwijl een Sanger-reactie enkele euro's kost per 1000 bp, kan met hetzelfde bedrag een paar miljoen basen gesequeneerd worden met deze nieuwere technieken. Het genoom van een mens kan momenteel voor een paar 1000 euro in enkele dagen gesequeneerd worden, en het wordt steeds goedkoper, terwijl de eerste genoomsequentie van de mens vele jaren geduurd heeft. Hieronder enkele voorbeelden van dragers die gebruikt worden bij de next generation sequencing (Figuur 13.6).



Figuur 13.1: Overzicht van next generation sequencingstechnieken. Bij deze methoden worden sequenties gesequeneerd op een drager en wordt geen gelelektroforese gebruikt.

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 (Figuur 13.7). Een belangrijk verschil met de meeste andere methoden is dat hier geen DNA-synthese nodig is voor de sequentiebepaling.



Figuur 13.7: Nanopore sequencer. De DNA-streng wordt door een minuscule opening getrokken waarbij de sequentie kan bepaald worden door kleine verschillen in elektrische stroom veroorzaakt door de nucleotiden die doorheen de porie migreren.

13.3. 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 vroegtijdige diagnose wat preventie of betere behandeling van bepaalde ziekten toelaat. 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.

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 14 MUTATIE, RECOMBINATIE & GENOOMEVOLUTIE

14.1. Mutaties en hun herstel

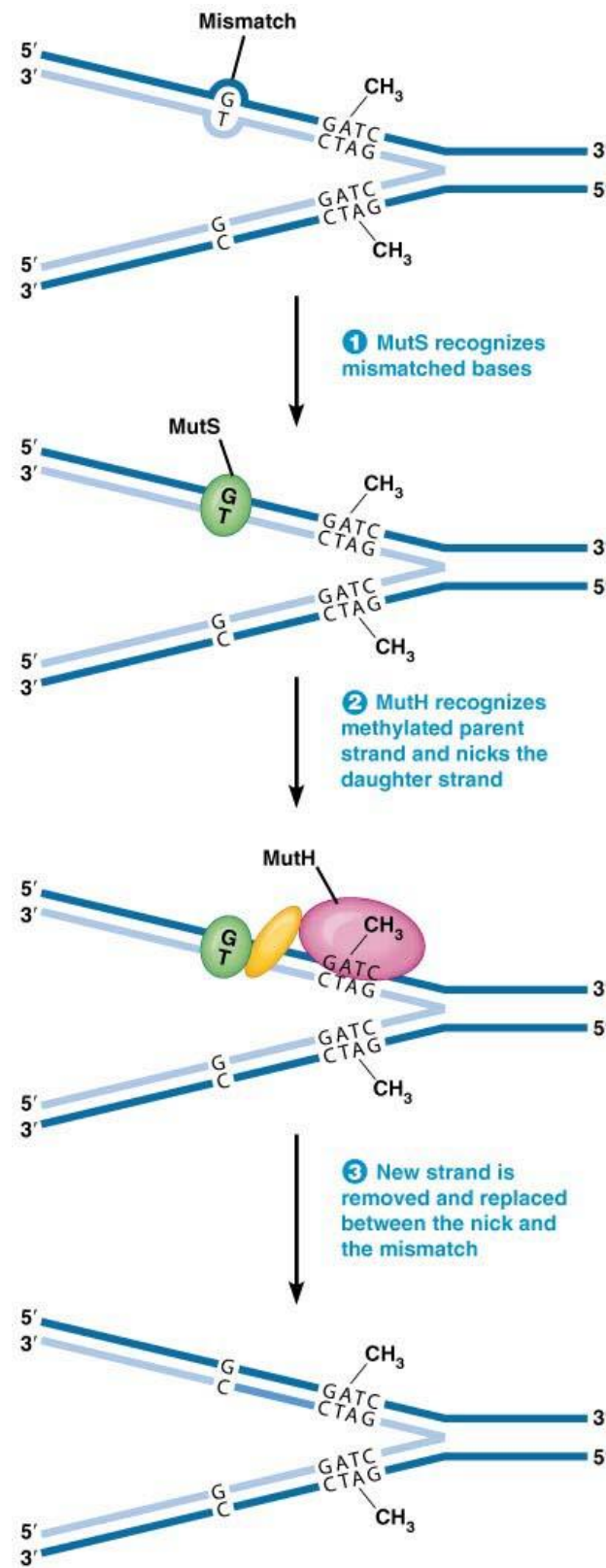
Mutaties zijn veranderingen in DNA-sequentie die soms (afhankelijk van plaats en type mutatie) aanleiding geven tot een ander fenotype. Het is door mutaties te analyseren dat genetica als wetenschap mogelijk is. Mutaties geven immers aan dat er een gen aanwezig moet zijn dat wanneer het niet mutant is – we spreken over het wild-type gen – een bepaalde functie uitoefent. Door het gen te muteren ontstaat een variant van het gen die vaak de normale functie niet meer kan uitvoeren. Voor levende organismen is het belangrijk dat de mutatie-frequentie laag gehouden wordt, want veel mutaties zijn nadelig, of zelfs lethaal. Daarom hebben cellen verscheidene enzymsystemen die DNA-mutaties of DNA-schade herstellen.

Mutaties kunnen ook neutraal zijn of voordelig, indien niet in de natuur dan misschien toch voor de mens. Deze worden dan respectievelijk behouden via natuurlijke selectie (evolutie) of artificiële selectie (veredeling of fokkerij). Een mooi voorbeeld daarvan is de mutatie in een transcriptiefactor (type MADS-box) die de ontwikkeling van de bloeiwijze controleert zodat uit de wilde kool een bloemkool kon geselecteerd worden.

14.1.1. Fouten bij DNA-synthese

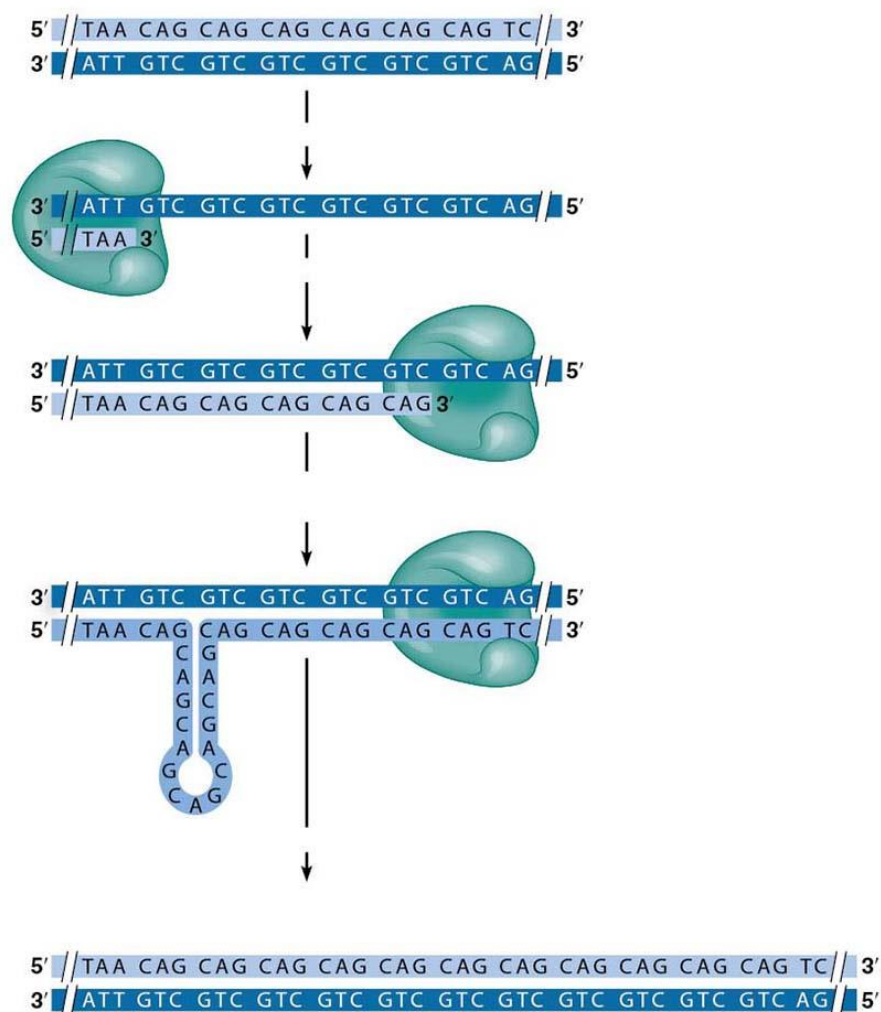
Net zoals wij tijdens het tikken van een tekst eens een foutje kunnen maken, kan dat ook gebeuren tijdens de DNA-synthese. Bij de meeste DNA-polymerasen (niet bij de meeste RNA-polymerasen) is er een **proofreading**-activiteit (3'-5' exonuclease activiteit, zie hoofdstuk 11) die de tekst onmiddellijk controleert en verbetert. Daardoor hebben DNA-polymerasen veelal een foutenfrequentie van slechts 1 per 10^7 nucleotiden. *Taq*-polymerase dat veel voor PCR gebruikt wordt heeft geen proofreadingactiviteit waardoor de foutenfrequentie kan oplopen tot ca. 1 per 10^4 (daarom worden tegenwoordig ook andere polymerasen voor PCR gebruikt zoals *Pfu* of *Vent*).

De uiteindelijke foutenfrequentie na DNA-synthese (1 per 10^{10}) ligt nog beduidend lager door mismatch-herstel. De inbouw van een foute base leidt immers tot een "**mismatch**", het niet passen van de basen in de helix. Deze mismatch wordt in *E. coli* herkend door het MutS-eiwit waarna de foute base verwijderd en vervangen wordt. Aangezien een fout ingebouwde base nog steeds een normale base is, is de vraag hoe het systeem weet welke van de twee niet op elkaar passende basen de foute is. Dat is de laatst ingebouwde, en die wordt geïdentificeerd aan de hand van methylaties op het DNA. In bacteriën zijn DNA-strengen gemethyleerd (op adenines), maar bij een nieuw gevormde streng moet dit nog gebeuren. Door de strengen te scannen op methylgroepen, weet het systeem (o.a. MutH) welke de oude en dus correcte streng is, en kan de nieuwe, foute base verwijderd worden (Figuur 14.1). In eukaryoten bestaat het adeninemethylatiesysteem niet en wordt de nieuwe streng op een andere manier geïdentificeerd (via relatie met replicatiecomplex).



Figuur 14.1: “Mismatch”-herstel van fouten die tijdens replicatie gebeurd zijn (en niet opgemerkt zijn bij proofreading). Een mismatch wordt herkend door MutS waarna een eiwitcomplex met o.a. MutH de foutieve base op de niet-gemethyleerde (= nieuwe) streng zal vervangen.

In het genoom zijn er sequenties die hypergevoelig zijn voor mutaties, zogenaamde hot-spots voor mutatie. Bekende voorbeelden daarvan zijn de **VNTR**, variable number of tandem repeats. Dit zijn herhalingen van een sequentiemotief. Als het motief erg kort is, 1-5 basen, spreekt men van een short tandem repeat (**STR**) of **microsatelliet** bv. GGGGGGGGGG = $[G]_n$ of ATCATCATCATCATC = $[ATC]_n$. De reden voor de hoge mutatiefrequentie is dat het DNA-polymerase "slipt" of "stottert" waardoor er meer of minder herhalingen van het motief geproduceerd worden in de nieuwe DNA-streng. Dit gebeurt niet in elke generatie maar over een aantal generaties ontstaan wel varianten, waardoor er in een populatie veel variatie is en de STR voor DNA-fingerprints kunnen gebruikt worden (Figuur 14.2, zie ook hoofdstuk 13). STRs in een gen zijn meestal lethaal, maar er zijn gekende erfelijke ziektes waarbij 3-base-STRs variabele ziektebeelden veroorzaken afhankelijk van het aantal herhalingen bv. de ziekte van Huntington.

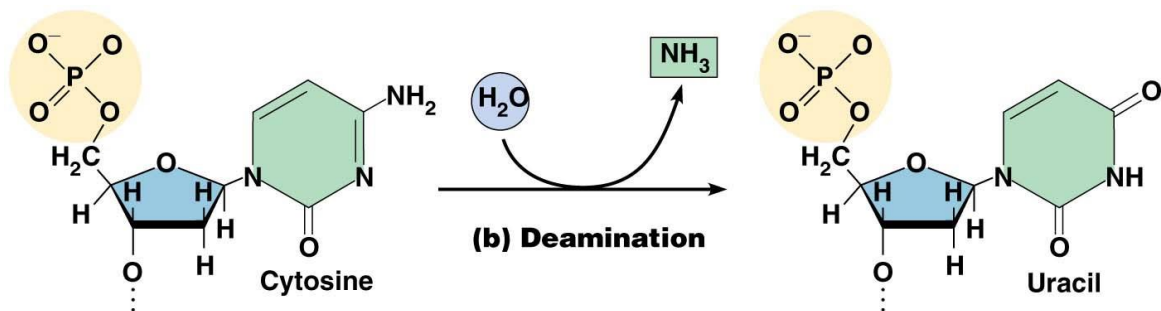


Figuur 14.2: Bij het aanmaken van een complementaire DNA-streng kan het polymerase stotteren/slippen ter hoogte van een VNTR, waardoor er meer (als nieuwe streng op zichzelf paart) of minder (als template op zichzelf paart) herhalingen ingebouwd worden.

14.1.2. Spontane schade aan basen

De basen in DNA zijn van nature niet zo stabiel, gelukkig hebben cellen enzymen om spontane schade te herkennen en herstellen. Purines (adenine en guanine) zijn gevoelig aan **depurinatie**, waarbij de volledig base spontaan gehydrolyseerd wordt van de suikerfosfaatketen. Bij menselijke cellen gebeurt dit aan een frequentie van meerdere duizenden purines die verloren gaan per cel per dag. De zo ontstane "apurinic"-plaatsen in het DNA worden hersteld via "**base-excisie-herstel**": enzymen herkennen het "gat", knippen de suikerfosfaatketen op die plaats en door DNA-synthese wordt de schade hersteld.

Een andere spontane hydrolysereactie is **deaminatie** (verwijderen van een aminogroep) van basen die gebeurt bij adenines, guanines maar vooral cytosines. Als cytosine gedeamineerd wordt, ontstaat uracil, en dit wordt herkend als een niet-DNA-base waardoor herstel geactiveerd wordt (**base-excisie-herstel**) (Figuur 14.3). De hypothese is dat T onstond in DNA (ipv U in RNA) om deze schade makkelijk te kunnen herkennen.

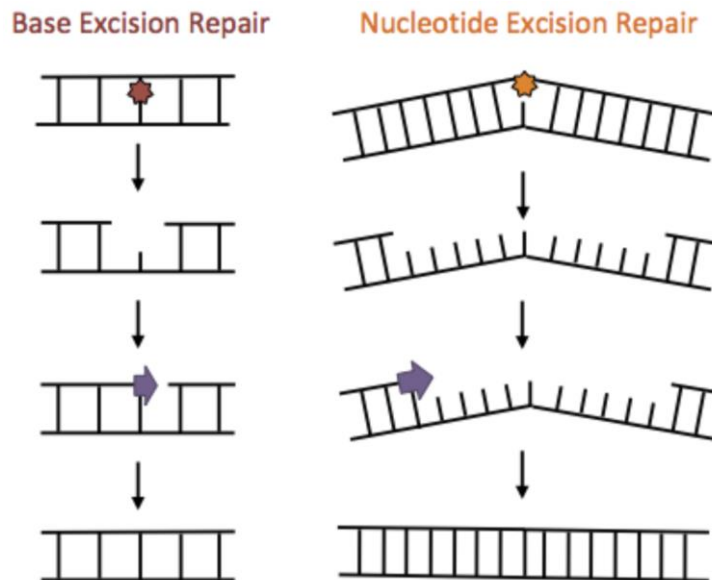


Figuur 14.3: Deaminatie van cytosine naar uracil.

14.1.3. UV-schade aan DNA en NER

UV-licht veroorzaakt meerdere types van schade in DNA, maar een belangrijk deel ervan is de vorming van thymine-dimeren, waarbij naast elkaar gelegen thymines covalent gekoppeld worden en de DNA-helix daardoor verstoren. Onmiddellijk herstel is mogelijk via het fotolyase, een enzym dat de thymines terug losmaakt van elkaar, met behulp van lichtenergie. Als dat niet efficiënt genoeg is om alle thymine-dimeren te verwijderen, kan het **nucleotide-excisie-herstelsysteem** (nucleotide excision repair of NER) in actie komen. Terwijl het base-excisieherstel-systeem één of enkele basen verwijdert en vervangt, zal nucleotide-excisieherstel een veel groter stuk verwijderen om zo de schade goed te kunnen herstellen (Figuur 14.4).

NER kan ook allerlei andere schade aan DNA herstellen bv. veroorzaakt door chemische stoffen. Mutaties in NER-enzymen veroorzaken Xeroderma pigmentosum, een ziekte waarbij de aangetaste personen een extreme gevoeligheid aan zonnestralen vertonen en met hoge frequentie huidkanker ontwikkelen.



Figuur 14.4: Verschil tussen base-excisie (links) and nucleotide-excisie (rechts).

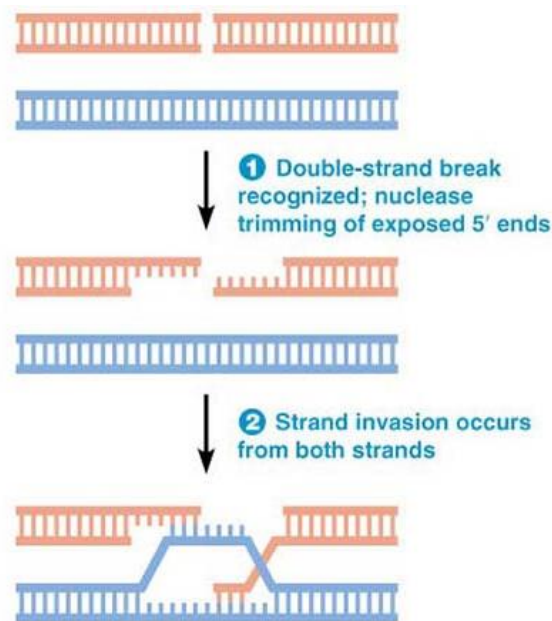
Opm. Bekende mutagene “chemische” stoffen zijn o.a. de mycotoxines die door schimmels geproduceerd worden zoals aflatoxines door *Aspergillus flavus* en fumonisines door *Fusarium* species. Fumonisin in maïs zijn gecorreleerd met een hogere frequentie aan slokdarmkanker, aflatoxines met leverkanker vooral in Afrikaanse landen waar gebrekkige gewasbescherming leidt tot een hogere concentratie van schimmel in maïs, wat daar een hoofdbestanddeel van het dagelijks voedsel vormt.

14.1.4. Herstel dubbelstrengige (ds) DNA-breuk

Een ander belangrijk type van DNA-schade zijn de dubbelstrengige (ds) breuken, die per toeval kunnen optreden (door trekkrachten op het DNA) of door U.V. of radioactieve straling of door intercalerende mutagene stoffen, enz.. Een chromosoom dat gebroken is zal verloren gaan en moet dus hersteld worden, zelfs al is dat niet op een perfecte manier. Er kunnen algemeen 2 grote types herstel onderscheiden worden:

1. **NHEJ = Non-Homologous End Joining:** aan elkaar plakken van niet-homologe DNA-uiteindjes. Dit proces is niet erg precies, het zorgt er gewoon voor dat er geen losse uiteinden meer zijn, maar tijdens het plakken kunnen basen verwijderd of toegevoegd worden, of verkeerde stukken aan elkaar gezet worden.
2. **Homologie-gestuurd herstel (Figuur 14.5):** DNA-synthese op basis van de homologe sequentie, kan leiden tot DNA-uitwisseling (homologe recombinatie) tussen chromosomen of tot genconversie (waarbij sequentie van het ene chromosoom gekopieerd wordt op het ander). Dit proces is veel preciezer aangezien de schade hersteld wordt via DNA-synthese op basis van de homologe sequentie.

Bij prokaryoten en eencellige eukaryoten is homologe recombinitie zeer efficiënt, bij meercellige eukaryoten is dit type recombinitie grotendeels beperkt tot de meiose (hoofdstuk 12) en gebeurt het herstel van ds-breuken vooral via NHEJ.



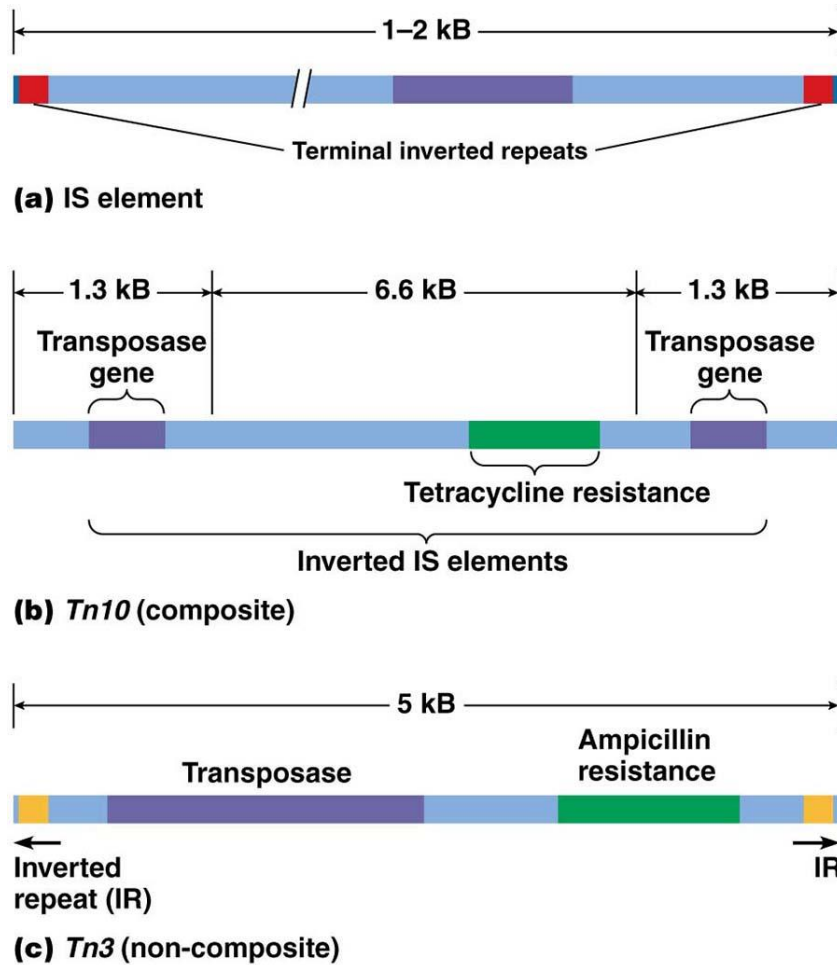
Figuur 14.5: Herstel op basis van homologe recombinitie. De bovenste sequentie is gebroken. 5' uiteinden worden weggeknipt om zo overhangende 3' uiteinden te verkrijgen. Homologe sequenties (onderste) worden gebruikt als template om de gaten in het DNA te herstellen.

14.2. Grote DNA-herschikkingen

Bij DNA-herstel via NHEJ komen niet enkel vaak kleine foutjes voor (insertie en/of deletie van enkele basen), maar ook grote herschikkingen bv. aan elkaar zetten van verkeerde stukken van verschillende chromosomen (translocatie); of tussenvoegen van grote stukken DNA (insertie) of verdwijnen van een groot stuk DNA (deletie).

Indirect gerelateerd aan DNA-herstel gebeuren er ook grote herschikkingen door bewegingen van **transposons** of springende genen. Deze transposons kunnen niet alleen zelf bewegen in het genoom maar door de breuken die ze veroorzaken ook andere DNA-herschikkingen zoals translocaties of deleties teweegbrengen. Transposons zijn ontdekt in maïs door Barbara McClintock midden vorige eeuw (Nobelprijs 1983) maar bleken al snel in alle levende organismen aanwezig te zijn, zowel in prokaryoten als eukaryoten. In bacteriën dragen ze vaak antibioticumresistenties die ze al springend helpen verspreiden. Transposons zijn "parasitair DNA" die kunnen variëren van een heel eenvoudige structuur, bv. IS = insertiesequentie: bevat enkel het gen voor transposase en de uiteinden die erdoor herkend worden, tot zeer complexe combinaties (Figuur 14.6). Andere transposons zijn essentiële elementen verloren (bv. *AluI*, zie 14.3.1) en kunnen enkel nog vermeerderd worden met de hulp van intacte transposons.

Transposons kunnen springen via DNA (cut&paste of copy&paste) zoals de Tn3 of via RNA dat in DNA omgezet wordt (retrotransposons zoals *AluI*) en zo in het genoom terecht komt.



Figuur 14.6: Transposons.

A: Meest simpele vorm van een transposon dat enkel de info draagt om zichzelf te kunnen verplaatsen (gen voor transposase en omgekeerde herhalingen aan uiteinden die door transposase herkend worden).

B & C: Meer complexe transposons die naast het transposase extra genen bevatten zoals een antibioticumresistentie.

14.3. Genoomanalyse toont genoomevolutie

De bedoeling van een genoomproject is de sequentie te analyseren van alle genen en tenslotte het volledige genoom van een bepaald organisme te bepalen. Zo is in eerste instantie het volledige genoom bepaald van o.a. de bacterie *Escherichia coli*, de plant *Arabidopsis thaliana*, de nematode *Caenorhabditis elegans*, het fruitvliegje *Drosophila melanogaster*, gist, rijst en ook van de mens. In het voorbije decennium is de hoeveelheid gesequeneerde genomen exponentieel toegenomen. Genomen worden in stukjes gesequeneerd die eerst in kaart gebracht worden om ze vervolgens te assembleren (samen plakken) of men sequeneert willekeurig bekomen stukjes die daarna via sequentie-overlap aan elkaar gezet worden.

14.3.1. Genoomevolutie

Terwijl de vroegere classificatie van levende organismen enkel op fenotypische kenmerken gebaseerd was, is de schat aan genomische informatie tegenwoordig een meer directe en krachtiger methode om organismen te gaan vergelijken. Daarbij is het duidelijk dat bepaalde genen weinig veranderen in evolutie omdat ze zeer essentiële celfuncties vervullen bv. het ribosomaal RNA. Het andere uiterste zijn niet-coderende DNA-sequenties die heel veel mutaties kunnen tolereren.

Variaties in het DNA kunnen ontstaan door simpele mutaties bv. SNPs maar ook door grotere veranderingen zoals translocaties (verplaatsing van stukken chromosomen) of duplicaties (verdubbeling van genen). Deze grotere veranderingen ontstaan door niet-homologe recombinaties waarbij ongerelateerde sequenties uitgewisseld worden. Als er breuken optreden in het DNA zal de cel dit proberen te herstellen om te overleven en dit herstel gebeurt door losse DNA-uiteinden aan elkaar te plakken, dus niet op basis van homologie. Daarnaast bestaan er ook transposons, dit zijn functionele DNA-eenheden die als een soort parasieten in het DNA zitten en kopieën van zichzelf maken, zo zijn er in het menselijk genoom ongeveer een miljoen kopieën van het *Alu*-element. Transposons kunnen ingedeeld worden in DNA-transposons en retrotransposons die zich vermenigvuldigen via een RNA-intermediair, waarvan sommige in structuur op retrovirussen lijken en andere niet (zoals *Alu*).

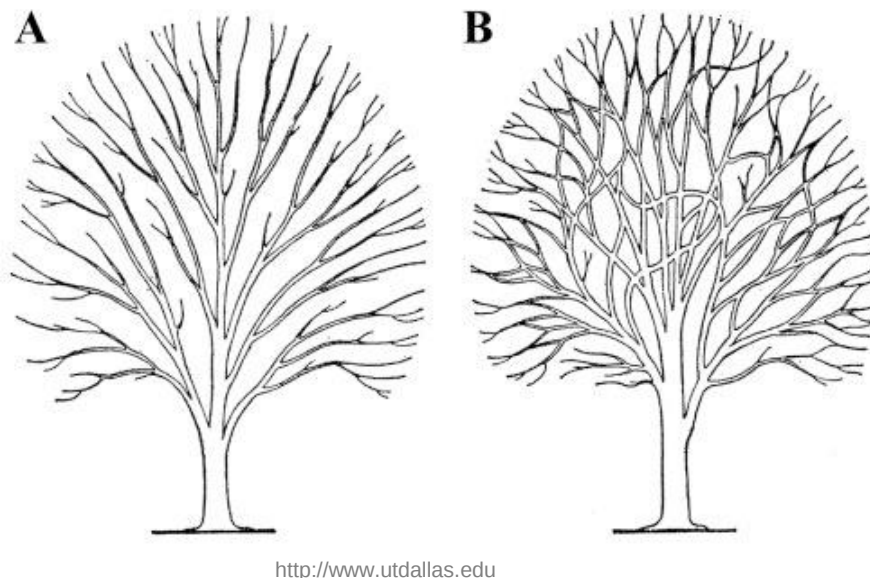
Nieuwe genen kunnen tijdens evolutie ontstaan door een kleine mutatie maar ook door herschikken van DNA-segmenten. Opeenvolgende duplicaties van genen leidt tot genfamilies, waarbij de verschillende leden van een genfamilie een enigszins andere functie kunnen krijgen door mutatie. Bij meercellige eukaryoten zijn die genfamilies zeer belangrijk geworden voor celdifferentiatie.

Met de nieuwe analysetechnieken kan men veel sneller en goedkoper dan vroeger volledige genomen sequencen. Op die manier kan men nu achterhalen wat er met het DNA gebeurt over generaties heen bv. tijdens plantenveredeling. Zo heeft men ontdekt dat de bekende IR64-rijstcultivar (een "rijstras") een heleboel kleinere mutaties en ook translocaties heeft in vergelijking met de ouderlijnen die gebruikt werden tijdens het veredelingsproces. Planten die bekomen werden via mutagenese (mutatieveredeling) blijken op vele duizenden plaatsen veranderingen te vertonen. Een interessante vorm van genoomevolutie is laterale of horizontale gentransfer.

14.3.2. Horizontale gentransfer

Doorgeven van DNA van ouders op nakomelingen is door iedereen gekend, dit is de verticale gentransfer. Men weet al heel lang dat bacteriën niet enkel DNA doorgeven aan hun dochtercellen maar ook binnen hun soort en zelfs tussen species DNA uitwisselen. Twee bacteriecellen die in dezelfde omgeving voorkomen kunnen DNA uitwisselen via conjugatie (via plasmideoverdracht), transfectie (via bacterieel virus) of transformatie (DNA-opname). Dit fenomeen wordt horizontale gentransfer (HGT) genoemd en neemt bij bepaalde bacteriën zodanige proporties aan dat het soms moeilijk wordt om nog van een species te spreken (wegens te veel tussenvormen met gemengd DNA). In het laboratorium kan men dit via de recombinante DNA-techniek perfect nabootsen: men haalt DNA-stukjes uit de ene bacterie om ze in een andere bacterie te introduceren (veelal via transformatie).

In de voorbije decennia is men bij de genoomanalyse van eukaryoten ook op voorbeelden van horizontale gentransfer gestoten. Soms zijn ze enkel af te leiden uit het feit dat nauw verwante organismen bv. bepaalde insectensoorten gelijkaardige genomen hebben behalve een bepaald gen dat bij de ene soort wel en bij de andere soort niet aanwezig is. Bij vergelijking van dat gen met de databank blijkt dit dan zeer sterk te gelijken op een bacterieel of een schimmelgen. De enige logische conclusie lijkt dan dat dit gen vanuit het micro-organisme door het insect opgenomen is. Het is in de meeste gevallen onduidelijk hoe dit kan gebeuren want dit gen moet bij de transitie wel tot in de voortplantingscellen geraken om in de nakomelingen doorgegeven te worden. Het is echter intussen al zoveel keer opgemerkt dat men de evolutionaire boom nu niet meer tekent als een dichotoom vertakkende plant maar eerder als een structuur waarbij er connecties zijn tussen de takken zodat een netwerk gevormd wordt (Figuur 14.7).



Figuur 14.7: A: Dichotoom vertakkende boom (enkel verticale gentransfer).

B: Netwerkvormende boom (houdt rekening met verticale EN horizontale gentransfer).

Enkele duidelijke voorbeelden van horizontale gentransfer in eukaryote genomen:

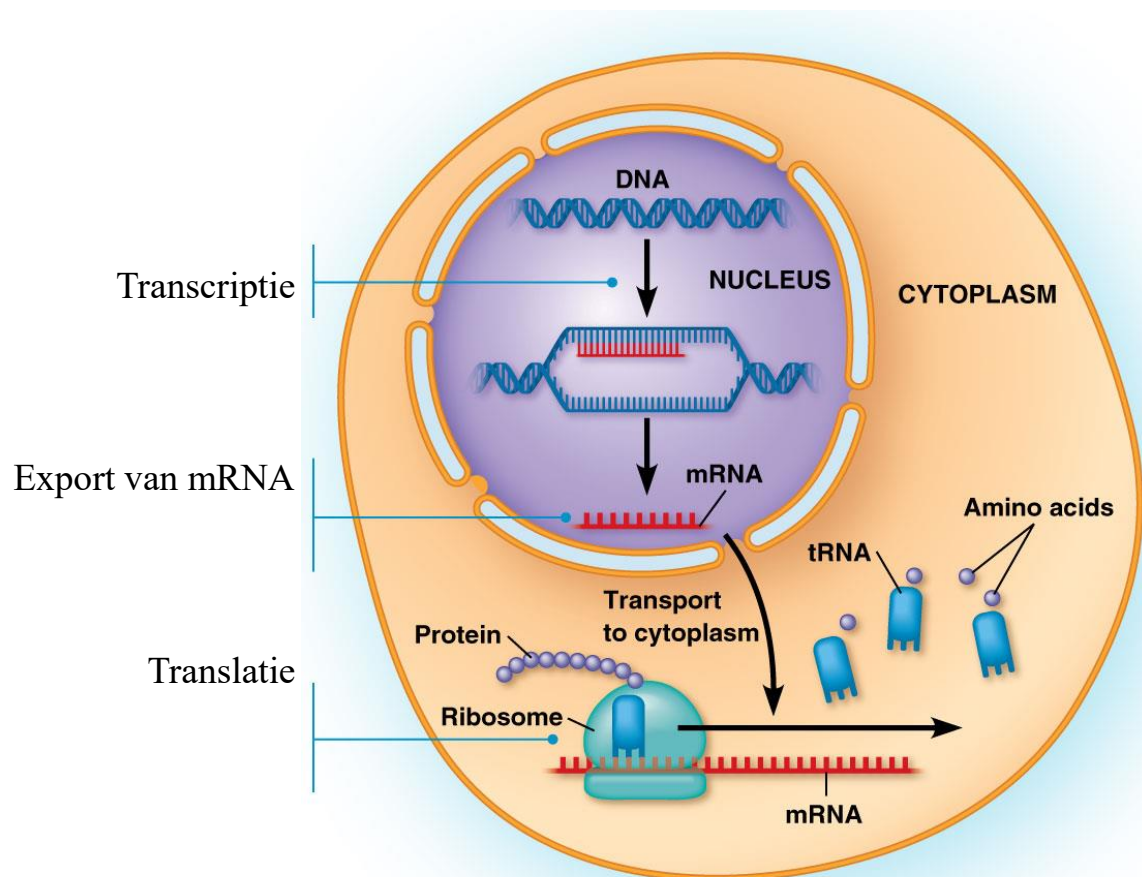
- een stuk van ca. 100 Kb van *Wolbachia* (normaal een endosymbionte bacterie) zit midden in een chromosoom van de kever *Callosobruchus chinensis*;
- bepaalde bladluizen kunnen een oranje rode kleurstof maken dankzij carotenoïdebiosynthesegenen die van een schimmel afkomstig blijken;
- plantenparasitaire nematoden kunnen cellulose en andere celwandbestanddelen afbreken via enzymen die heel sterk op enzymen van bacteriële plantenpathogenen lijken;
- een stukje (T-DNA) van een *Agrobacterium* plasmide is van nature aanwezig in verschillende plantensoorten (*Nicotiana tabacum*, *Linaria vulgaris*, *Ipomoea batatas*,...).

De laatste voorbeelden (van planten die T-DNA bevatten) vormen een speciale categorie omdat voor dit type van horizontale gentransfer perfect gekend is welk mechanisme hier aan de grondslag van ligt. *Agrobacterium* is immers een zeer goed bestudeerde bacterie waarvan geweten is dat ze een stukje van haar eigen DNA (het T-DNA) kan overdragen naar plantenchromosomen waarna uit die "getransformeerde" cel terug een plant kan geregenereerd worden. Dit is immers het principe dat in het laboratorium gebruikt wordt om genetisch gewijzigde planten te maken.

Heterschikken van DNA en het overschrijden van soortengrenzen wordt door sommige personen als onnatuurlijk gezien, maar de moderne genomanalyse leert ons dat DNA zich ook in de natuur herschikt en over soortengrenzen heen kan uitgewisseld worden.



DEEL III: Genexpressie



© 2017 Pearson Education, Ltd.

Stroom van genetische informatie (eukaryote cel)

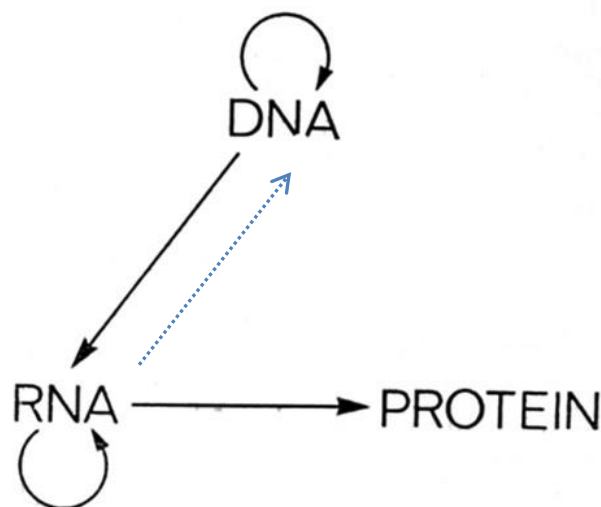
HOOFDSTUK 15 TRANSCRIPTIE

15.1. Het centrale dogma van de moleculaire biologie

Francis Crick postuleerde in 1958 het centrale dogma van de moleculaire biologie, namelijk dat de informatiestroom in een cel slechts in 1 richting kan verlopen: DNA maakt RNA en dat produceert eiwit (Figuur 15.1). DNA kan ook (met behulp van eiwitten) DNA maken, de DNA-polymerasen leveren hierbij geen informatie maar vermenigvuldigen de informatie in het DNA, ze zijn DNA-afhankelijk. Ook RNA kan vermenigvuldigd worden (bv. bepaalde virussen vermeerderen zo hun RNA-genoom aan de hand van RNA-afhankelijke RNA-polymerasen). De vorming van RNA gebeurt door RNA-polymerasen en de mRNAs worden dan door de ribosomen vertaald naar eiwitten.

Intussen is dit schema aangepast maar de grote lijnen blijven overeind. Op basis van een eiwit kan nooit RNA of DNA gemaakt worden. De productie van RNA op basis van DNA (transcriptie) heeft wel zijn tegenhanger omdat op basis van RNA door reverse transcriptase DNA kan gemaakt worden (bv. door retrovirussen).

Heel veel RNAs hebben geen functie om verder vertaald te worden, namelijk de ncRNAs (niet-coderende RNAs). Vroeger kende men daarbij al de ribosomale RNAs en de transfer-RNAs maar intussen zijn er onnoemelijk veel bijkomende vormen van ncRNAs ontdekt.



Crick's 1958 version of the
"central dogma" of biology from
Crick (1970, Figure 3, p. 562).

Figuur 15.1: Het centrale dogma in de moleculaire biologie (volle lijn). DNA kan zichzelf repliceren en kan omgezet worden naar RNA (transcriptie). RNA kan ook zichzelf repliceren (bv. RNA-virussen) en kan vertaald worden naar een aminozuursequentie (translatie). Later is ontdekt dat RNA ook terug kan omgezet worden naar DNA, bv. bij retrovirussen (reverse transcriptie, stippellijn).

15.2. Transcriptie, overschrijven van DNA-informatie naar RNA

15.2.1. RNA als boodschapper

Als de meeste genen bij eukaryoten in de kern gelokaliseerd zijn, en eiwitsynthese gebeurt in het cytoplasma, is het evident dat de informatie van het DNA moet overgebracht worden naar het cytoplasma. Dit gebeurt door een **boodschapper RNA of mRNA** (messenger RNA), die via het proces van transcriptie van het DNA afgeschreven wordt. Ook bij prokaryoten gebeurt genexpressie via dergelijke intermediaire mRNA- moleculen. Op die manier kan de informatie in het DNA beter beschermd worden en kan eiwitsynthese efficiënt gebeuren. Er is ook geregleerde genexpressie mogelijk aangezien het mRNA meestal niet erg stabiel is en de hoge turnover de cel toelaat om snel te reageren op wijzigende omstandigheden.

Behalve de mRNA-moleculen die bij de translatie vertaald worden naar eiwitten en dus enkel een intermediaire functie hebben, zijn er ook RNA-moleculen die op zichzelf eindproducten zijn. Dit zijn veelal stabielere RNAs die meestal een structurele rol hebben, maar soms ook een enzymatische werking of regulatorische functie hebben. De **ribosomale RNAs of rRNAs** vormen een belangrijk onderdeel van de ribosomen, de **transfer RNAs of tRNAs** brengen de aminozuren aan bij eiwitsynthese en dan zijn er nog een aantal kleinere RNAs (o.a. snRNAs) die een verscheidenheid aan functies vervullen. De manier waarop deze verschillende RNAs geproduceerd worden is essentieel hetzelfde, de verschillen zitten hem vooral in de manier waarop de initiële transcripten "geprocessed" of afgewerkt worden. Recent is men er zich meer en meer bewust van dat er ook zeer veel lange niet-coderende RNAs (lncRNAs) zijn met veelal regulatorische functie.

Experimenten die de aanwezigheid van mRNA aantonen

1956: eerste bewijs voor bestaan van mRNA-moleculen.

Een eerste bewijs voor het bestaan van mRNA werd gevonden in prokaryoten. Bij een infectie van *E. coli* door de (bacterio)faag T2 werd aangetoond dat zeer snel een grote hoeveelheid nieuw RNA gevormd wordt, dat qua samenstelling analoog aan T2 en verschillend van *E. coli* is. Later werd aangetoond (met de faag T4) dat het nieuw geproduceerde RNA complementair is aan het faag-DNA en niet aan *E. coli* DNA.

1961: "pulse-chase" experiment met [³H]-uridine

Door cellen te groeien in [³H]-uridine (bouwsteen van RNA, bevat uracil) kan de vorming van RNA in de kern en het transport naar het cytoplasma gevisualiseerd worden door autoradiografie. Een korte incubatie (bv. 15 minuten) in medium met de radioactieve isotoop resulteert in cellen met alle radioactiviteit in de kern. Wanneer deze incubatie gevolgd wordt door bv. een uur verdere groei op niet-radioactief medium, blijkt alle radioactiviteit zich in het cytoplasma te bevinden.

15.2.2. RNA versus DNA-moleculen

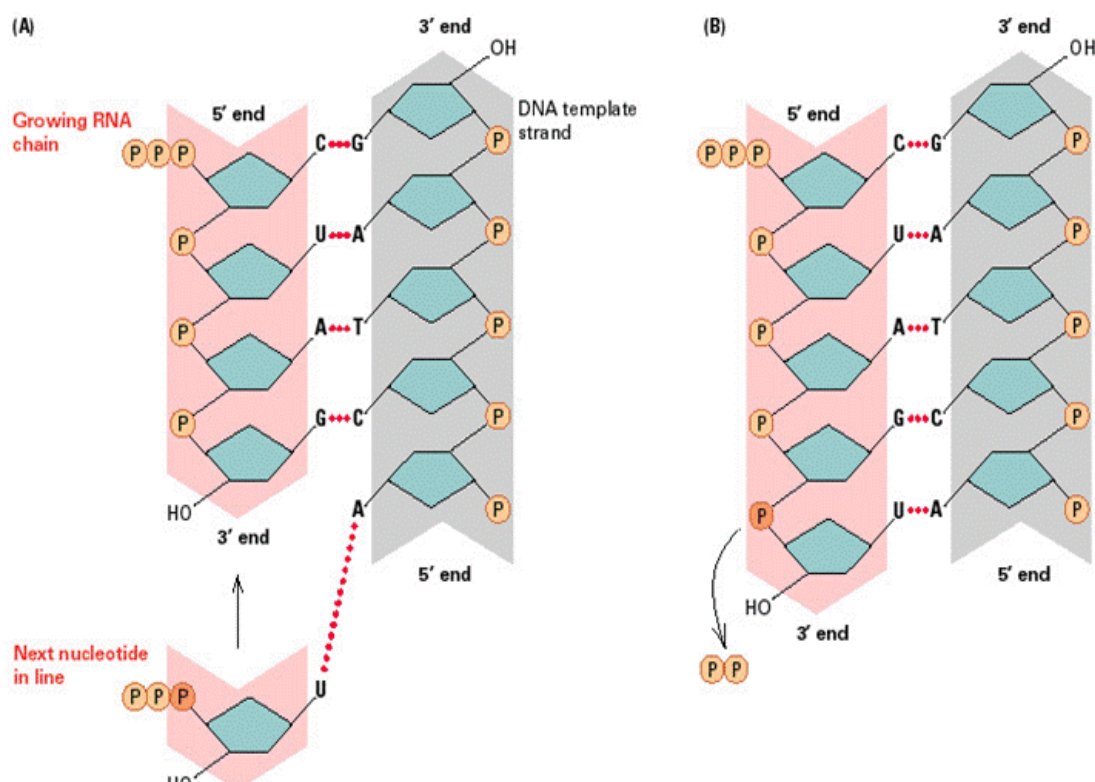
DNA is dus niet het enige nucleïnezuur dat aangetroffen wordt in levende cellen. Een nauwverwant nucleïnezuur is het RNA dat ook een polynucleotide is, maar er zijn een aantal belangrijke verschillen:

- het suiker in RNA is **ribose** in plaats van 2-deoxyribose;
- in plaats van thymine is er **uracil**, die analoog met adenine basenpaart;
- RNA is meestal als een enkele streng aanwezig, wat niet betekent dat er geen basenparen voorkomen, de RNA-streng vouwt meestal op zichzelf en vormt intramoleculaire basenparen tussen complementaire delen van de RNA-streng (vorming van secundaire structuren).
- RNA kan dus in tegenstelling tot DNA zeer verschillende structuren vormen.

15.2.3. Principe van RNA-synthese op een DNA-template

Het proces van RNA-synthese is zeer analoog aan DNA-synthese:

- synthese gebeurt van 5' naar 3', terwijl template van 3' naar 5' afgelopen wordt;
- hierbij wordt de 3'OH-groep van de laatst aangehechte nucleotide gebruikt om de volgende nucleotide via een fosfodiësterverbinding in te bouwen;
- de basenpaar-complementariteit bepaalt telkens welke base ingebouwd wordt;
- als bouwstenen voor inbouw in de RNA-molecule worden nucleotide-trifosfaten gebruikt, waarbij 2 fosfaten afgesplitst worden (Figuur 15.2).

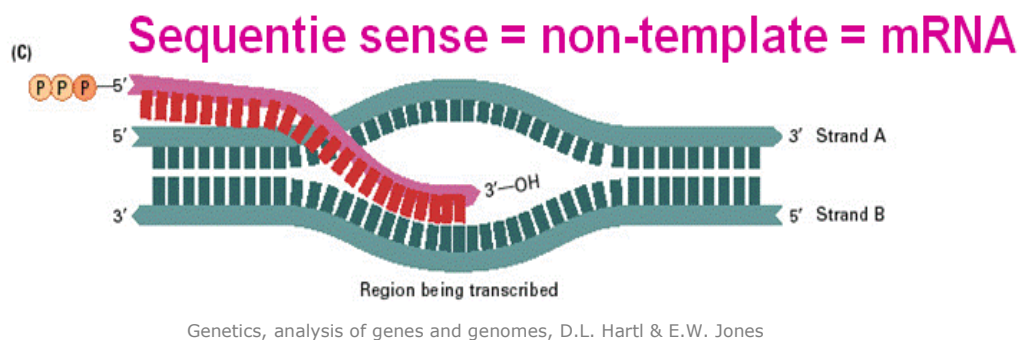


Figuur 15.2: Transcriptie = productie van een RNA-molecule (5' naar 3') waarbij één streng van het DNA door het RNA-polymerase afgelopen wordt van 3' naar 5'.

Er zijn natuurlijk een aantal belangrijke verschilpunten:

- in plaats van deoxyribonucleotiden, worden ribonucleotiden ingebouwd;
- slechts één streng van het DNA wordt afgeschreven, deze wordt de "template" streng genoemd; het transcript wordt de **sense** RNA-molecule genoemd, de streng die daarmee complementair is is de **antisense** streng. Naargelang het gen wordt ofwel de ene of de andere streng van de DNA dubbelstreng afgeschreven;
- RNA-synthese heeft geen nood aan een primer om te starten;
- er gebeurt geen "proofreading" en de polymerasen hebben geen nuclease-activiteit.

Andere benamingen voor "template"/"non-template" streng zijn coderende/niet-coderende streng en "sense"/"antisense" streng. Bij sense/antisense is verwarring mogelijk afhankelijk of men deze definities op DNA-RNA of RNA-eiwitniveau interpreteert. Algemeen wordt "sense" nu wel gebruikt als de mRNA of de DNA-streng die met het mRNA overeenkomt, de "antisense" streng is dan complementair aan het mRNA (Figuur 15.3).



Figuur 15.3: Transcriptie van een gen produceert een enkelstrengige molecule die als sense (=RNA met sequentie als A en complementair aan B in figuur) beschouwd wordt omdat die streng een functie heeft (rechtstreeks als RNA of via vertaling bij mRNA). In bepaalde gevallen kan een antisense RNA geproduceerd worden bv. via recombinant DNA, dat is dan de complementaire streng van het normale RNA.

15.3. Transcriptie in prokaryoten

15.3.1. RNA-polymerase in *E. coli*

Iedere *E. coli*-cel bevat ongeveer 7000 RNA-polymerase-moleculen waarvan er 2000 tot 5000 tegelijkertijd transcriptie kunnen uitvoeren. Het enzym is opgebouwd uit twee α , een β , een verwante β' en een σ -polypeptide. Deze versie van het enzym ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) wordt het 'holo'-enzym genoemd en verschilt van het 'core'-enzym ($\alpha_2\beta\beta'$) dat geen σ -sub-eenheid bevat. De twee versies van het enzym hebben een verschillende rol tijdens de transcriptie. Bovendien heeft elke subeenheid een eigen specifieke functie.

15.3.2. Het transcriptieproces in *E. coli*

Initiatie

Het RNA-polymerase herkent het begin van een gen op basis van welbepaalde DNA-sequenties. Deze DNA-regio die de bindings- en startsignalen bevat voor het RNA-polymerase wordt de **promotor** genoemd. Gezien de promotor asymmetrisch is, wordt daardoor de richting van transcriptie bepaald, en daarmee ook de streng die zal overgeschreven worden (aangezien deze altijd van 3' naar 5' afgelopen wordt). Bij vergelijking van verschillende promotorsequenties valt op dat er geconserveerde gebieden voorkomen waarin weinig verandering getolereerd wordt. De meest voorkomende sequentie van nucleotiden op een specifieke positie in een functioneel DNA-segment wordt aangeduid als de consensus-sequentie.

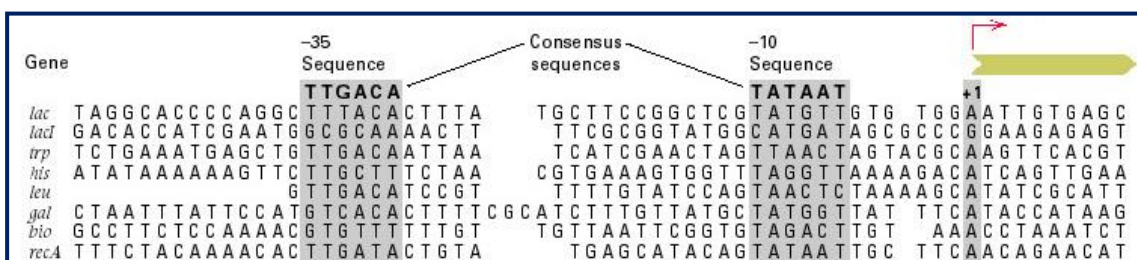
De promotor-consensus bij *E. coli* bestaat uit:

- ▷ de **-35 box**: 5' TTGACA 3'

deze box wordt door het RNA-polymerase herkend, dat er vervolgens op bindt.

- ▷ de **-10 box**: 5' TATAAT 3' (Pribnow-box of **TATA-box**)

ter hoogte van deze (AT-rijke) DNA-sequentie zal het RNA-polymerase de DNA-duplex openen om een transcript te beginnen vanaf +1 (Figuur 15.4).



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

Figuur 15.4: Vergelijking van promotorsequenties van verschillende genen van *E. coli*.

De -35 en TATA-box (die op ca. -10 ligt) en de transcriptiestartplaats (+1) zijn aangeduid in de figuur.

Eerst wordt een gesloten promotorcomplex gevormd (binding polymerase), dat overgaat in een open promotorcomplex (openritsen van helix t.h.v. de "TATA-box").

Het RNA-polymerase van *E. coli* is een multifunctioneel enzym dat instaat voor het openen van de DNA-duplex, voor de juiste complementaire basenparing in de polymerisatiereactie en het zorgen voor de terminatie van de reactie. Daarnaast vervullen de verschillende subeenheden ook nog een zelfstandige functie bij de initiatie van het transcriptieproces:

σ : herkenning van de promotor

α : helpt binding op de promotor

β : binden van de NTP's, het antibioticum rifampicine bindt op deze subeenheid en verhindert initiatie.

β' : binding op de template

De functie van de σ -sub-eenheid is herkenning van de promotor (-35 box) en binding van het RNA-polymerase op de promotor. Nadat de **σ -factor** zijn functie vervuld heeft, wordt hij losgelaten zodat het RNA-polymerase langs het template kan verder schuiven. De meeste bacteriële promotoren worden herkend door de **σ_{70} -factor**, maar er zijn ook alternatieve σ -factoren die onder bepaalde omstandigheden geactiveerd worden bv. hiteschok, sporevorming bij *Bacillus* en dan een specifieke reeks van genen afschrijven.

De plaats waar transcriptie start (meestal een purine) wordt +1 genoemd. De termen "upstream" of **stroomopwaarts** en "downstream" of **stroomafwaarts** worden gebruikt om respectievelijk DNA-sequenties aan te duiden die voor of na de initiatieplaats van transcriptie liggen. De upstream sequenties worden met negatieve getallen aangeduid (merk op dat 0 niet gebruikt wordt) en de downstream sequenties met positieve getallen. De termen up- en downstream kunnen trouwens ook gebruikt worden om ten opzichte van andere herkenningspunten te oriënteren bv. upstream van het stopcodon.

Promotoren waarop het RNA-polymerase in alle omstandigheden kan binden, worden constitutief genoemd. Promotoren die slechts kunnen gebruikt worden in de aan- of afwezigheid van bepaalde proteïnen of signalen, noemt men gereguleerde promotors. Sterke promotoren zijn DNA-sequenties waar het RNA-polymerase een hoge affiniteit voor heeft en waar dus veelvuldig transcriptie zal starten. Het RNA-polymerase zal minder binden op zwakke promotoren en daar zullen dus minder transcripten per tijdseenheid geïnitieerd worden. De sterkte van de promotor wordt bepaald door de exacte sequentie van en rond de -35 en -10 boxen.

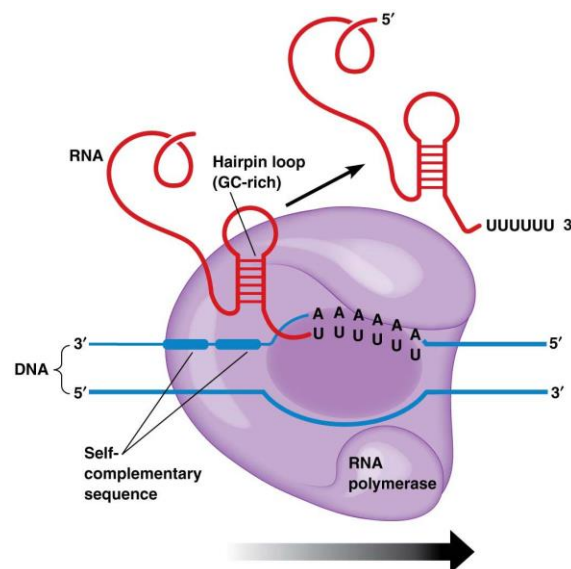
Elongatie

Na initiatie van transcriptie laat de σ -factor los en wordt de RNA-synthese door het "core" enzym uitgevoerd. Hierbij gebeurt slechts een zeer plaatselijke ontwinding van de DNA-helix (ca. 17 basenparen). Tijdens het inbouwen van de nucleotiden in het RNA ontstaat plaatselijk een korte DNA-RNA-helix (ca. 10 basenparen). Het RNA-polymerase heeft zowel DNA-ontwindende als herwindende activiteit, waarbij dus continu de DNA-helix vooraf aan de polymerisatieplaats ontwonden wordt en na RNA-synthese terug hersteld wordt. De snelheid van RNA-synthese is niet constant en bedraagt in *E. coli* gemiddeld een 40-tal nucleotiden per seconde.

Terminatie

Wanneer het RNA-polymerase een terminatiesignaal tegenkomt, stopt de RNA-synthese. Bij *E. coli* en andere prokaryoten hebben veel terminatoren een zeer specifieke structuur namelijk een GC-rijke DNA-sequentie in de vorm van een palindroom (omgekeerde herhaling), gevolgd door een reeks van een zestal AT-basenparen. Door het palindroom kan een "hairpin" of "stemloop" gevormd worden in het RNA, waardoor het RNA-polymerase vertraagt, en de DNA-RNA-helix ter hoogte van de AT-basenparen losgeraakt (Figuur 15.5).

Een andere klasse van terminatoren is **rho-afhankelijk**. Rho is een helicase dat het zich vormende RNA wegduwt van het DNA en op die manier transcriptie stopt.

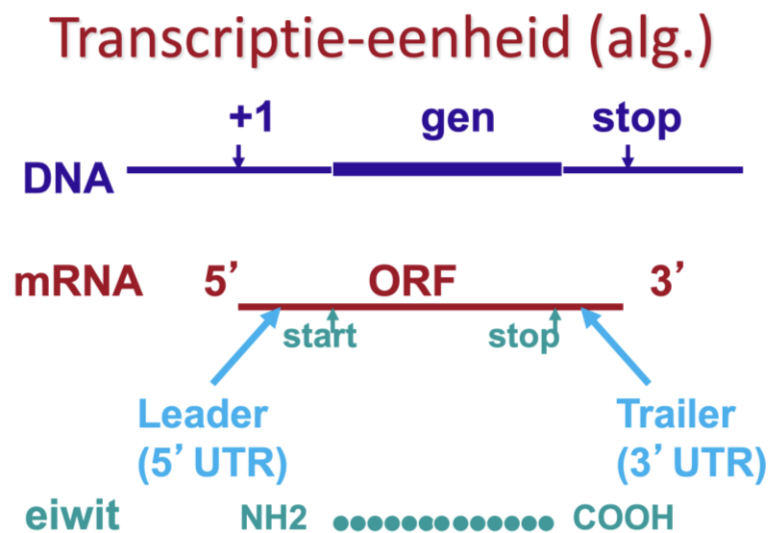


Figuur 15.5: Terminatie van transcriptie: Het RNA-polymerase vertraagt eens de hairpin-structuur in het RNA gevormd is en zal uiteindelijk volledig los komen.

Belangrijke definitie: **transcriptie-eenheid**

Een transcriptie-eenheid is een DNA-regio die vanaf een promotor afgeschreven wordt tot aan een terminator. Indien een transcriptie-eenheid één enkel gen omvat, is de lengte van het transcript toch langer dan enkel de informatie die nodig is om het overeenkomstige eiwit te coderen. De sequentie die vooraf aan het coderende DNA/RNA gelegen is, wordt de "leader"* of **5'UTR** (untranslated region) genoemd en de DNA/RNA-regio downstream van de coderende sequentie gelegen de "trailer" of **3'UTR**. (Figuur 15.6).

[* niet te verwarren met "leading" streng in Hfst 11]



mRNA = monocistronisch bij eukaryoten, wordt ook nog geprocessed -> stabielere mRNA.
 Polycistronisch bij prokaryoten.

Figuur 15.6: Schema van een transcriptie-eenheid van een eiwitcoderend gen.

Bij prokaryoten zitten genen vaak in een **operon**, dat als 1 geheel afgeschreven wordt en dus meerdere genen per transcriptie-eenheid bevat (polycistronisch, zie verder). Indien een transcriptie-eenheid meerdere genen omvat (bv. ook bij rRNA-genen), worden de sequenties tussen de genen "spacers" genoemd.

Bij eukaryoten is er altijd één eiwitcoderend gen per mRNA (monocistronisch, zie verder), en ook daar is er een 5'UTR of leader en een 3'UTR (trailer). Bij eukaryoten komen meestal introns voor in het DNA en het primaire transcript, maar door processing worden die verwijderd en zijn dus afwezig in het mRNA. In tegenstelling tot de eiwitcoderende genen, liggen de rRNA-genen (net zoals bij prokaryoten) bij eukaryoten ook met meerdere op één RNA.