

Biologie van de micro-organismen

Deel Biologie

Bachelor of Science in de industriële wetenschappen

Editie 2020



INHOUDSTAFEL

VOORWOORD

HOOFDSTUK I: INLEIDING

1. De ontdekking van de cellen	1
2. De wetenschap van de verschijningsvormen van het leven.	1
2.1. Wat betekent “het leven”?	1
2.2. De verschillende kenmerken van het leven.	4
2.2.1. De structuur van een organisme van atoom tot celstructuur.	4
2.2.1.1. De bioelementen :	4
2.2.1.2. De hiërarchische organisatie van de materie:	4
2.2.2. Het metabolisme.	7
2.2.3. Reproductie en erfelijkheid:	8
2.2.4. De evolutie (met als pijlers mutatie en selectie):	9

HOOFDSTUK II: CLASSIFICATIE EN NOMENCLATUUR VAN DE ORGANISMEN

1. Inleiding.	1
2. De indeling van de biosfeer.	2
2.1. Het tweerijkensysteem:	2
2.2. Het drierijkensysteem:	2
2.3. Het vierrijkensysteem:	3
2.4. Het vijfrijkensysteem:	3
2.5. Het zesrijkensysteem:	5

HOOFDSTUK III: INLEIDING TOT DE CHEMIE VAN HET LEVEN

1. Inleiding.	1
2. Het element koolstof (C).	1
3. Functionele groepen.	3
3.1. De hydroxylgroep.	3
3.2. De carbonylgroep.	4
3.2.1. Aldehyden:	4
3.2.2. Ketonen:	4
3.3. De carboxylgroep.	4
3.4. De aminogroep.	5
4. De chemische bindingen.	5
4.1. Inleiding.	5
4.2. De covalente binding.	5
4.3. De ionenbinding.	5
4.4. De waterstofbinding.	6
4.5. Van der Waals-bindingen.	7

5. De koolhydraten.	8
5.1. Monosacchariden.	8
5.2. Oligo- en polysacchariden.	10
5.2.1. Disacchariden.	10
5.2.2. Polysacchariden.	11
5.2.2.1. Zetmeel.	11
5.2.2.2. Cellulose.	12
6. De lipiden.	13
6.1. Oliën en vetten.	13
6.2. Fosfolipiden.	14
7. De aminozuren, de peptiden en de polypeptiden (proteïnen).	16
7.1. Inleiding.	16
7.2. De aminozuren.	16
7.3. De polypeptiden.	18
7.4. De proteïnen.	18
7.4.1. De primaire structuur.	19
7.4.2. De secundaire structuur.	19
7.4.3. De tertiaire structuur.	20
7.4.4. De quaternaire structuur.	20
7.4.5. Eigenschappen van proteïnen.	21
7.5. Indeling en eigenschappen van aminozuren en de eventuele gevolgen voor de proteïnen.	21
8. De nucleïnezuren.	22
8.1. De nucleotiden en nucleosiden.	22
8.2. De nucleïnezuren.	23
8.2.1. De structuur van DNA.	24
8.2.2. De structuur van RNA.	25
8.2.2.1. Transfer RNA	25
8.2.2.2. Messenger-RNA	25
8.2.2.3. Ribosomaal-RNA	25
8.2.3. De nucleïnezuren zijn hoogst belangrijke stoffen voor het levend organisme.	26

HOOFDSTUK IV: DE PROKARYOTEN

1. Inleiding.	1
2. De structuur van de prokaryote cel.	1
2.1. Het genetisch materiaal.	1
2.2. Het cytoplasma.	2
2.2.1. De ribosomen.	2
2.2.2. De mesosomen.	3
2.3. Het cytoplasmamembraan of plasmalemma.	3
2.4. De celwand.	6
2.5. Het kapsel.	6
2.6. De pili en flagellen.	6

3. Voeding, groei en deling van een prokaryotisch organisme.	7
3.1. De voeding.	7
3.1.1. De essentiële elementen:	7
3.1.2. De opname van de voedingsstoffen.	8
3.1.2.1. De vrije diffusie:	8
3.1.2.2. De versnelde diffusie:	8
3.1.2.3. Het actief transport:	9
3.1.2.4. Transport met groepstranslocatie:	9
3.2. Groei en deling.	10
3.2.1. Het verloop van de bacteriegroei.	10
3.2.1.1. De lag-fase.	11
3.2.1.2. De log-fase.	11
3.2.1.3. De stationaire fase.	11
3.2.1.4. De dode fase.	11
3.2.2. Factoren die de groei beïnvloeden.	12
3.2.2.1. De pH.	12
3.2.2.2. De temperatuur T.	12
3.2.2.3. De osmotische waarde.	12
3.2.2.4. De zuurstofconcentratie.	12
3.2.3. De groeiremstoffen.	13
3.2.4. Sterilisatie.	13
3.3. Het metabolisme.	13
3.3.1. Biochemische reacties en katalyse.	14
3.3.1.1. De energieomzettingen.	15
3.3.1.2. De reactiesnelheid en activatie-energie.	17
3.3.1.3. De enzymen.	18
3.3.1.3.1. De samenstelling.	18
3.3.1.3.2. De reactiesnelheid in functie van de omstandigheden	20
3.3.1.3.3. De inhibitie.	21
3.3.1.3.4. Nomenclatuur	21
3.3.1.4. Oxidatie-reductie.	22
3.3.1.5. Elektronen carriers	23
3.3.2. Energierijke verbindingen.	23
3.3.3. De afbraak van de koolhydraten.	24
3.3.3.1. Fermentatie	24
3.3.3.2. Respiratie of ademhaling.	25
3.3.3.3. Regeling van de enzymactiviteit	25
3.4. Erfelijkheid bij de prokaryoten.	25
3.4.1. DNA als drager van de genetische informatie.	27
3.4.1.1. Transformatie.	27
3.4.1.2. Bacteriofagen-infectie.	28
3.4.2. De realisering van de genetische informatie.	30
3.4.3. Mutaties.	31
3.4.3.1. Mutaties bij bacteriën.	31
3.4.3.2. Oorsprong van mutaties.	31

3.4.4. De biosynthese van eiwitten.	32
3.4.4.1. De genetische code.	33
3.4.4.2. De proteïensynthese.	34
3.4.4.3. Enkele opmerkingen.	37
3.4.4.4. Mutaties en de genetische code.	38
3.5. Algemene besluiten betreffende de prokaryoten.	39
3.5.1. De chemische samenstelling van prokaryotisch organisme.	39

HOOFDSTUK V: DE EUKARYOTEN

1. Structuur en functies van een eukaryote cel.	1
1.1. Het grondplasma.	2
1.2. Het plasmalemma.	2
1.3. Het endoplasmatisch reticulum.	3
1.4. De ribosomen en polysomen.	4
1.5. Het Golgi-apparaat.	6
1.6. De lysosomen.	7
1.7. De vacuole.	7
1.8. De mitochondriën.	7
1.8.1. Het stroma.	8
1.8.2. De inwendige membraan.	8
1.8.3. De gesteelde partikels.	8
1.8.4. De uitwendige membraan.	9
1.9. De plasten.	9
1.9.1. De leucoplasten.	10
1.9.2. De chloroplasten.	10
1.9.3. De chromoplasten.	10
1.10. Samenvatting.	11
1.11. De kern.	11
1.11.1. De algemene betekenis.	11
1.11.2. De structuur van de kern.	12
1.11.2.1. Inleiding.	13
1.11.2.2. De kernmembraan.	13
1.11.2.3. Het kernvocht.	14
1.11.2.4. De nucleolus.	15
1.11.2.5. Het chromatine.	15
1.11.3. Mitose.	16
1.11.3.1. De profase.	17
1.11.3.2. De metafase.	17
1.11.3.3. De anafase.	17
1.11.3.4. De telofase.	18
1.11.4. Het aantal chromosomen.	18
1.11.5. De karakterisatie van de chromosomen.	18
1.12. De celcyclus.	19
1.12.1. De G1-fase.	19

1.12.2. De S-fase.	20
1.12.3. De G2-fase.	20
1.13. De celwand.	20
2. De voortplanting en de voortplantingscellen.	20
2.1. De verschillende voortplantingswijzen.	21
2.1.1. De vegetatieve vermenigvuldiging.	21
2.1.2. De ongeslachtelijke voortplanting.	22
2.1.3. De geslachtelijke voortplanting.	22
2.2. De meiose.	23
2.2.1. De profase I	24
2.2.1.1. Het leptoteen.	24
2.2.1.2. Het zygoten.	24
2.2.1.3. Het pachyteen.	25
2.2.1.4. Het diploten.	25
2.2.1.5. De diakinese.	25
2.2.2. De metafase I.	25
2.2.3. De anafase I.	26
2.2.4. De telofase I.	26
2.2.5. De interfase I.	26
2.2.6. De profase II.	26
2.2.7. De metafase II.	27
2.2.8. De anafase II.	27
2.2.9. De telofase II.	27
2.2.10. De interfase II.	27
2.3. De biologische betekenis van de geslachtelijke voortplanting.	28
2.4. Bevruchting en reductiedeling in de ontwikkelingscyclus.	28
2.4.1. De cyclus van de haplonten.	29
2.4.2. De cyclus van de diplohaplonten.	29
2.4.3. De cyclus van de diplonten.	29
3. Genetica van de eukaryoten.	31
3.1. Inleiding.	31
3.2. De erfelijkheidswetten van Mendel.	31
3.2.1. Monohybridisme.	32
3.2.2. Dihybridisme.	35
3.2.3. Polyhybridisme.	38
3.3. Gekoppelde genen.	39
3.4. Opmerkingen betreffende het erfelijkheidsonderzoek van Mendel.	41
3.5. De geslachtschromosomen en de genen eraan gekoppeld.	42
3.6. Chromosoomafwijkingen.	44
3.6.1. Wijzigingen van het aantal chromosomen.	44
3.6.1.1. Euploidie	44
3.6.1.2. Aneuploidie.	45
3.6.2. Geslachtschromosomale afwijkingen.	46
3.6.3. Chromosoommutaties.	47
3.6.3.1. Deficiëntie.	47

3.6.3.2. Duplicatie.	48
3.6.3.3. Translocatie.	48
3.6.3.4. Inversie.	48
3.7. Multiple allelie.	48
3.8. Extranucleaire erfelijkheid.	52
3.9. Enkele begrippen van de populatiegenetica.	53
3.9.1. De wet van Hardy en Weinberg.	53
3.9.2. Inteelt.	55
3.9.3. Selectie.	55
3.9.3.1. Selectie tegen een dominant gen.	55
3.9.3.2. Selectie tegen een recessief gen.	56

Referenties

HOOFDSTUK IV: DE PROKARYOTEN

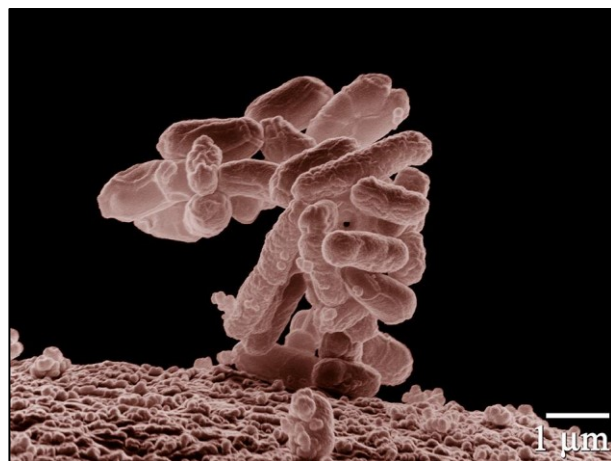
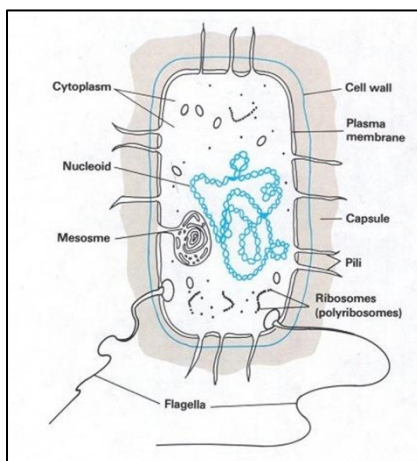
1. Inleiding.

Een overzicht van de eerder aangehaalde fundamentele levensverschijnselen kan het best gebeuren aan de hand van de bespreking van de prokaryoten. De prokaryoten zijn immers de eenvoudigste organismen en ze zijn in de evolutie op aarde waarschijnlijk als eerste ontstaan. Er is reeds een enorme hoeveelheid onderzoek uitgevoerd op de bacteriën, zodat deze het best geschikt zijn om de vele onderlinge relaties tussen de structuur, de groei, het metabolisme en de erfelijkheid te bestuderen.

Als voorbeeld voor de bestudering van de prokaryoten, wordt de bacterie *Escherichia coli* genomen, met soms een verwijzing naar een andere bacterie. *Escherichia coli* of *E. coli* is een volledig onschadelijke bacterie, die samen met nog andere soorten als commensaal leeft in de darm.

2. De structuur van de prokaryote cel.

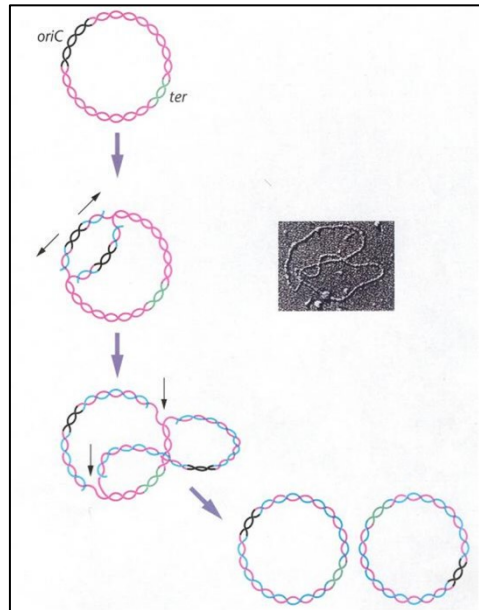
De *E. coli* is een staafvormige bacterie, ongeveer 2 μm lang en 1 μm breed. De vermenigvuldiging gebeurt zoals bij alle bacteriën door deling. De optimale groei gebeurt bij 37°C en de cellen delen om de 20 minuten. De bespreking van de cel zal gebeuren van binnen naar buiten toe.



2.1. Het genetisch materiaal.

Bij het bekijken van de bacterie met de elektronenmicroscop, kunnen één of meerdere zones bemerkt worden waar er zich genetisch materiaal bevindt. Deze zones bestaan uit zeer fijne draden. Daar de prokaryoten geen echte kern hebben, worden deze zones aangeduid als kernzones. Het bestaan van deze kernzones werd in 1963 aangetoond door John Cairns. Deze liet *E. coli* gedurende 1½ generatie groeien in aanwezigheid van ^3H -thymidine. Hierna werden de cellen voorzichtig opengebroken met lysozym, een enzym dat de celwanden oplost, en detergent dat de

cytoplasmatische membraan vernietigt. De celinhoud werd gefilterd en dit werd dan op een fotogevoelige plaat gebracht. Waar het ^3H -thymidine werd ingebouwd tekent het DNA zich af op de foto. Deze foto's bewijzen duidelijk dat de kernzone bestaat uit een ringvormige DNA-streng van ongeveer 2 nm diameter en 1,2 mm omtrek.



Het verloop van de replicatie kan door tussentijdse monsternames gevolgd worden. Hieruit blijkt dat de duplicatie gebeurt vanuit een initiatiepunt en verder schrijdt in beide richtingen tot de volledige verdubbeling van de DNA-streng (te vergelijken met het verwijderen van een binnenband uit een buitenband). De beide ringstructuren gaan nadien uit elkaar. Een tweede replicatie kan echter reeds gestart zijn noch voordat de twee ringen uit elkaar zijn.

2.2. Het cytoplasma.

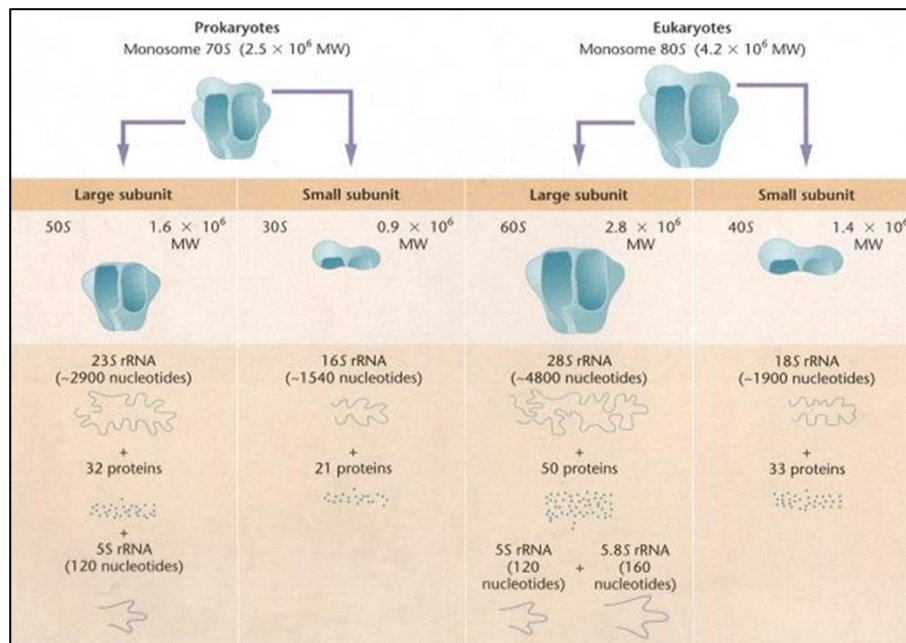
Over de structuur van het grondplasma, dit is het cytoplasma zonder al de zichtbare structuren, is weinig met zekerheid gekend. In het grondplasma zijn de meeste enzymen opgelost evenals het t-RNA en de talrijke metabolieten en organische ionen. Het meest opvallend in het cytoplasma zijn de ribosomen.

2.2.1. De ribosomen.

Van de ribosomen zijn er tussen de 10.000 en 30.000 aanwezig. Deze hebben een diameter van ± 20 nm. Ze zijn gemakkelijk te isoleren met differentiële centrifugatie. In bepaalde omstandigheden kunnen de ribosomen uiteenvallen in twee subeenheden.

De samenstelling van de *E. coli*-ribosomen is reeds vrij goed gekend.

Totaal ribosoom 70 S ¹	Subeenheid 1 30 S	16 S RNA
		21 proteïnen
	Subeenheid 2 50 S	5 S RNA
		23 S RNA
		34 proteïnen



De ribosomen vervullen een zeer belangrijke functie bij de eiwitsynthese. Zoals reeds hoger aangehaald worden er meerdere ribosomen vastgehecht op een m-RNA en vormen aldus een polysoom. Deze polysomen kunnen 4 tot 20 ribosomen bevatten. Verder in de cursus wordt hierop dieper ingegaan.

2.2.2. De mesosomen.

Bij vele bacteriën komen er instulpingen voor van de cytoplasmamembraan. Deze instulpingen worden mesosomen genoemd. De vorm kan spiraalvormig, opgerold of buisvormig zijn. Vaak werd er vastgesteld dat het DNA vastgehecht is aan de mesosomen.

2.3. Het cytoplasmamembraan of plasmalemma.

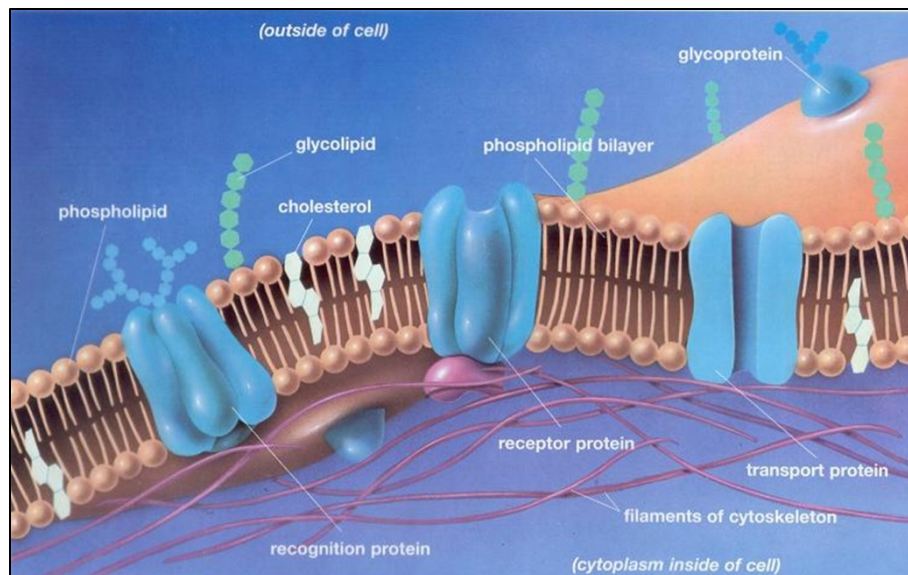
Aan de hand van permeabiliteitseigenschappen van cellen, kon het bewijs geleverd worden dat er een welomlijnde grenslaag bestond voor het cytoplasma. Deze grenslaag is het cytoplasmamembraan of plasmalemma. Elke uitwisseling van stoffen tussen de cel en haar omgeving moet door dit membraan heen gebeuren en wordt er door gecontroleerd.

In 1935 stelden James Danielli en Hugh Davson een model voor van een elementaire membraan. Deze membraan zou bestaan uit een bimoleculaire laag van fosfolipiden die aan beide zijden

¹ S = Svedberg. Dit is een centrifuge-eenheid. Deze is niet evenredig met de massa.

omgeven is door een laag proteïnen. De apolaire koolwaterstofketens van de fosfolipiden zijn naar elkaar toegekeerd en de polaire groepen (dus de fosfaatgroep en de base) liggen tegen de proteïnen aan.

Een volgende stap was het zichtbaar maken van het cytoplasmamembraan met de elektronenmicroscop. Met deze techniek worden er twee donkere lagen onderscheiden samen met een tussenliggende heldere laag.



Deze rangschikking van de fosfolipiden kon met behulp van o.a. X-stralenanalyse bevestigd worden. De afstand tussen de twee polaire lagen bedraagt 4 nm. De proteïnen, binnen een celmembraan, liggen niet alleen buiten de fosfolipiden, maar ook in het membraan, terwijl nog andere proteïnen aan een of beide zijden van het membraan uitsteken. Een deel van deze laatste proteïnen heeft daardoor een permeasefunctie bij het transport van allerlei stoffen door het membraan. Er dient eveneens opgemerkt dat de membranen niet mogen aanzien worden als strakke structuren doch eerder als een vloeibare structuur, met wijzigende samenstelling en veranderlijke proteïnebezetting.

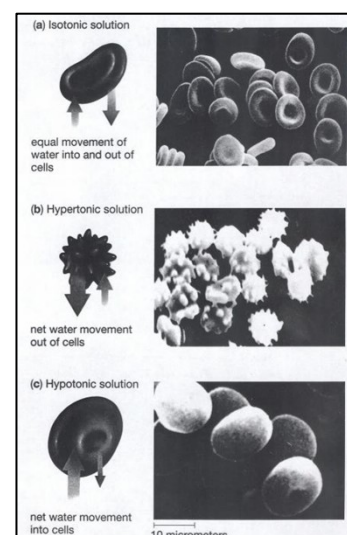
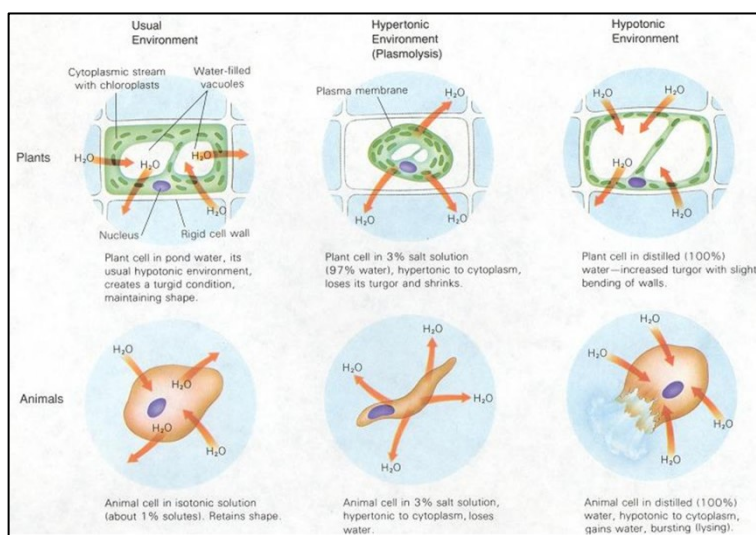
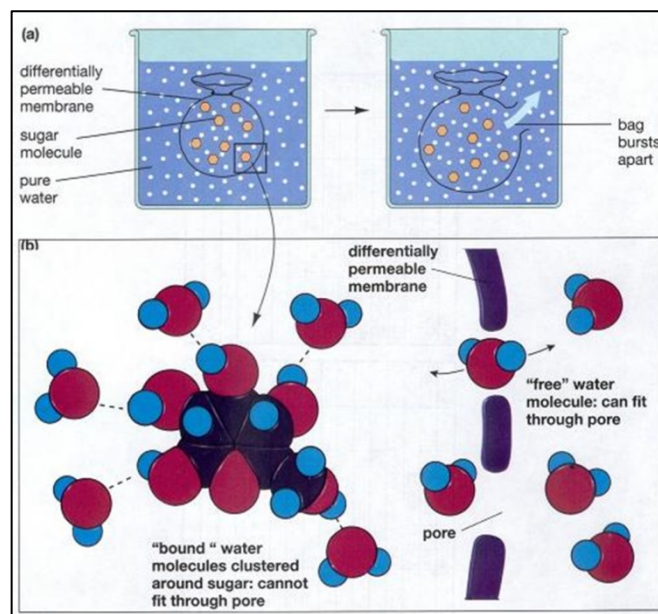
Door de cytoplasmamembraan wordt de cel een compartiment dat $\pm$ van de buitenwereld geïsoleerd is. Bepaalde moleculen en water kunnen door de membraan migreren en geven deze aldus een zekere permeabiliteit. Het cytoplasmamembraan wordt selectief doorlaatbaar genoemd. De mechanismen voor het doorlaten van de verschillende moleculen zal verderop in de cursus besproken worden.

Aangezien in de cel talrijke moleculen opgelost zijn die niet door de membraan kunnen migreren, zullen er osmotische verschijnselen optreden.

Deze osmotische verschijnselen resulteren in het feit dat wanneer bacteriën zich in een hypotonische oplossing bevinden (d.w.z. met lagere concentratie dan deze van de celinhoud zelf), er een

drijfkracht ontstaat om water op te nemen in de cel. De opname van het water wordt in de praktijk beperkt doordat de stijgende inwendige druk gecompenseerd wordt door de tegendruk geleverd door de celwand.

Het tegenovergestelde geval waarbij een bacterie zich bevindt in een hypertonische oplossing (d.w.z. een oplossing met een hogere concentratie dan deze van de celinhoud), resulteert in een uitdrijving van water uit de bacterie en daardoor in een verschrompelen van de protoplast. Het cytoplasma krimpt in en komt los van de celwand. Dit verschijnsel wordt plasmolyse genoemd. Dit proces is omkeerbaar: deplasmolyse treedt op wanneer een geplasmolyseerde cel terug in een hypotonisch milieu gebracht wordt.



2.4. De celwand.

De celwand is een dun elastisch omhulsel en is aanwezig bij praktisch alle bacteriënsoorten. In tegenstelling tot het plasmalemma is de celwand wel permeabel voor zouten en talrijke laagmoleculaire stoffen. De doorgang van grote moleculen wordt wel belet.

Een zeer belangrijke functie bestaat erin een tegendruk uit te oefenen op de celinhoud om de osmotische wateropname te beperken. Indien de celwand verwijderd wordt met behulp van enzymen, dan zijn de bekomen protoplasten slechts stabiel in een hypertoonisch of isotonisch milieu. Bevindt de protoplast zich in een hypotonisch medium dan zal de protoplast water opnemen tot hij barst (plasmolyse).

Door het oplossen van de celwand worden de metabolische processen niet beïnvloed, hetgeen duidt op het feit dat de celwand niet zo essentieel is in de fundamentele levensprocessen.

2.5. Het kapsel.

Op de celwand van *E. coli* is nog een kapsel aanwezig dat bestaat uit heteropolysacchariden. Bij sommige bacteriënsoorten is het kapsel zeer sterk ontwikkeld. Hierdoor vormen deze op agar gladde kolonies, de S-vorm. Uit deze S-vorm kan door mutatie een R-vorm ontstaan, die geen kapsel meer vormt. In vele gevallen is de S-vorm pathogeen, de R-vorm niet.

2.6. De pili en flagellen.

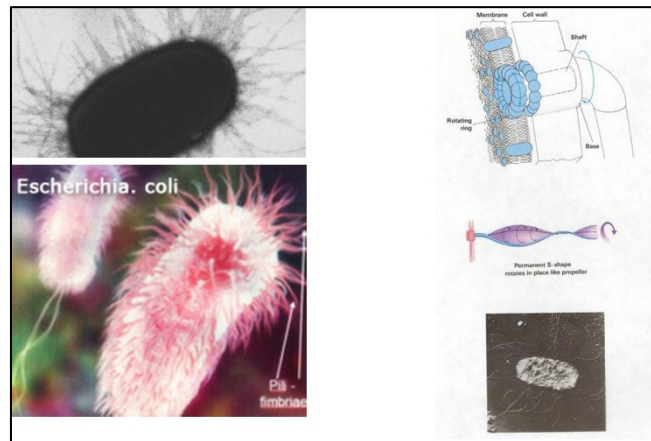
Met de elektronenmicroscopie kunnen er honderden lange dunne draden waargenomen worden op het oppervlak van *E. coli*. Deze draden worden pili genoemd. Er kunnen twee types van pili onderscheiden worden.

De gewone pili: dit zijn holle buisjes met een diameter van 7 nm

De f-pili: dit zijn eveneens holle buisjes met een iets grotere diameter van 8 nm en een inwendige diameter van 2 nm. De f-pili komen alleen voor bij ♂ bacteriën.

De pili zijn opgebouwd uit één soort eiwit nl. het piline.

Bij de meeste stammen van *E. coli* worden ook flagellen aangetroffen. Deze zijn iets breder dan de pili (10-20 nm) en staan in voor de voortbeweging van de bacteriën. Flagellen bestaan ook uit één eiwit nl. het flagelline. *E. coli* is in staat zich te bewegen naar bepaalde voedingsstoffen zoals glucose, galactose enz. (chemotaxis). Op het oppervlak van de bacterie bevinden er zich specifieke bindingsplaatsen (chemoreceptoren) voor de chemotactische stof.



3. Voeding, groei en deling van een prokaryotisch organisme.

3.1. De voeding.

3.1.1. De essentiële elementen:

Voor de groei en de daaruit voortkomende deling van een organisme, is er zowel een opname van water als een synthese van de verschillende bestanddelen van een cel noodzakelijk. Deze bestanddelen omvatten het genetisch materiaal, de ribosomen, de membranen, de enzymen enz. Hiervoor moet de cel de benodigde bouwstenen uit het milieu opnemen. De elementen die in deze bouwstenen terug te vinden zijn en absoluut vereist zijn voor de groei en deling van het organisme worden de essentiële elementen genoemd.

Het is ook niet zo dat alle elementen die in een organisme aangetroffen worden onmisbaar zijn. De celmembraan is niet in die mate selectief dat alle onnodige elementen tegengehouden worden. Indien er dus een elementaire analyse uitgevoerd wordt op een organisme, kan er niet besloten worden welke elementen essentieel zijn en welke niet. Dit kan alleen vastgesteld worden langs experimentele weg, dit door organismen te kweken op voedingsbodems of in oplossingen met gekende samenstelling.

E. coli bijvoorbeeld is in staat te groeien in een milieu met de volgende bestanddelen: K_2HPO_4 ; NH_4Cl ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; glucose; sporenelementen zoals Mn, Mo, Cu ...

De bacteriën groeien veel sneller in een zogenaamd rijk milieu, waarin talrijke soorten organische stoffen aanwezig zijn die de cel dan niet meer zelf hoeft te synthetiseren.

Als C-bron kan *E. coli* slechts organische verbindingen gebruiken zoals alle heterotrofen. Meestal is dit glucose of een andere koolhydraat, soms kan dit ook een organisch zuur zijn. Stikstof wordt meestal opgenomen onder de vorm van NH_4^+ -zouten of aminozuren.

De sporenelementen die nodig zijn, zijn meestal bestanddelen of cofactoren van enzymen zoals Zn in alkalische fosfatase.

3.1.2. De opname van de voedingsstoffen.

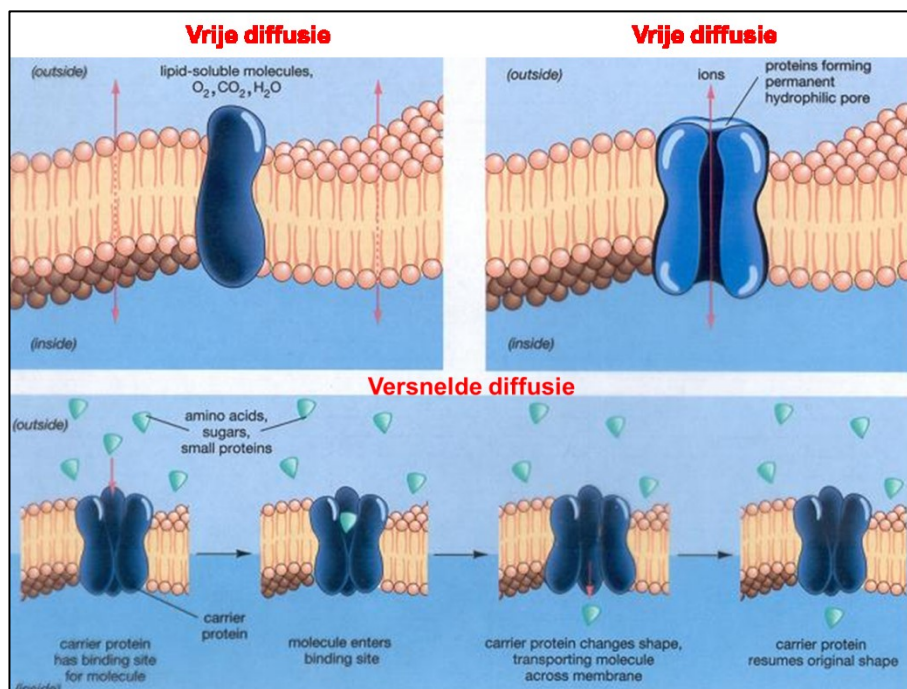
Er kunnen vier verschillende methoden van voedselopname onderscheiden worden:

- de vrije diffusie
- de versnelde diffusie
- het actief transport
- het transport met groepstranslocatie

3.1.2.1. De vrije diffusie:

Moleculen kunnen doorheen het plasmalemma dringen via het systeem van vrije diffusie. De doorgang gebeurt van de omgeving met de hoogste concentratie naar deze met de laagste concentratie van de betrokken stof. Deze doorgang is onafhankelijk van de andere stoffen. De snelheid van opname wordt bepaald door het concentratieverschil tussen het inwendige en het uitwendige van de cel en door de permeabiliteitsconstante die typisch is voor elke stof en elk membraan.

Er wordt aangenomen dat de vrije diffusie kwantitatief geen grote rol speelt bij de opname van ionen en moleculen doorheen biomembranen. Het is namelijk zo dat dit mechanisme niet selectief genoeg is en de opname door diffusie zou veel te traag verlopen om aan de behoeften van de cel te voldoen.



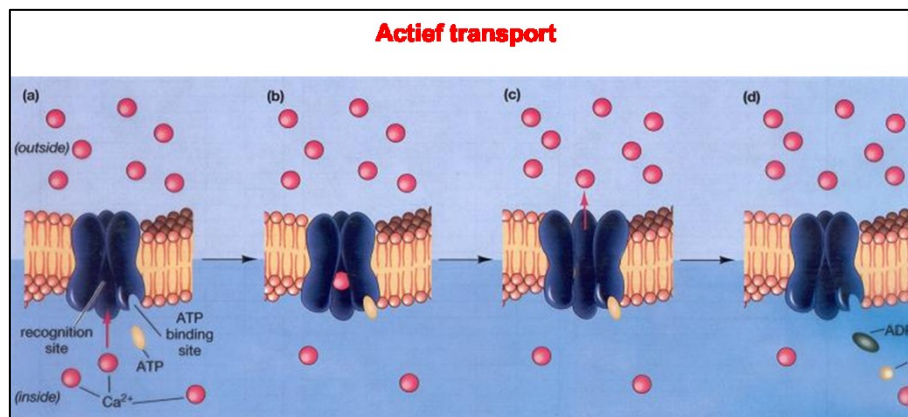
3.1.2.2. De versnelde diffusie:

Deze diffusie gebeurt eveneens exclusief in de richting van de hogere naar de lagere concentratie. De opname gebeurt met behulp van bepaalde eiwitmoleculen, permeasen genoemd of carriers. Deze versnellen de doorgang in belangrijke mate.

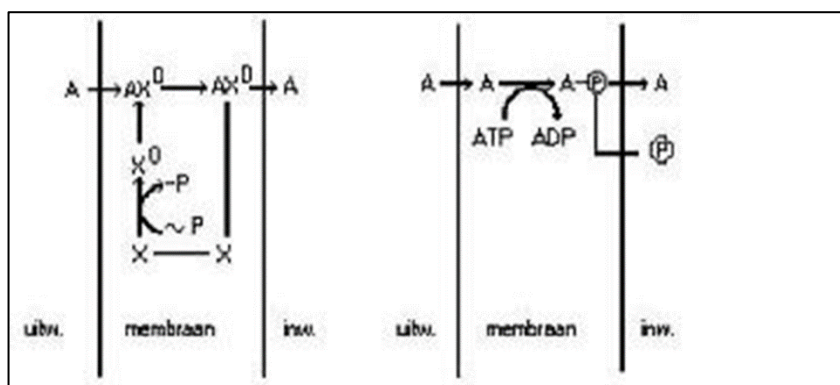
De permeasen hebben een hoge specificiteit, ze zijn dus selectief .

Versnelde diffusie vergt dus eveneens een concentratieverschil. De carrier versnelt slechts de doorgang maar wijzigt niks aan de uiteindelijke evenwichtstoestand. Het proces vergt evenmin energie.

3.1.2.3. Het actief transport:



Bij het actief transport is er in tegendeel wel energie vereist. Deze wordt geleverd onder de vorm van ATP. De migratie gebeurt hier van een omgeving met een lagere concentratie naar een omgeving met een hogere concentratie. Zo kunnen b.v. aminozuren en lactose opgenomen worden door *E. coli*. Het ATP staat waarschijnlijk in voor een conformatiewijziging van de carrier, die aldus in staat is om een substraat te binden en binnen in de cel te brengen. Een andere mogelijkheid is dat het ATP het substraat fosforyleert. Het aldus gefosforyleerd substraat zou na doorgang door het membraan terug defosforyleren. De beide mechanismen zijn geïllustreerd in de figuur.



3.1.2.4. Transport met groepstranslocatie:

In tegenstelling met de drie vorige vormen van transport is er een verschil tussen het substraat binnen en het substraat buiten de cel na transport door het membraan. In dit

vierde mechanisme behelst het transport een fosforylering van het substraat dat aldus door het membraan gaat en de cel binnen gaat.

Een voorbeeld van dit transport is het transport van glucose door een bacteriënmembraan.

3.2. Groei en deling.

Indien de voedingsomstandigheden goed zijn, dan zal na een periode van groei iedere bacteriecel een deling ondergaan. Nadat er een lengtestrekking opgetreden is, treedt er een centripetale insnoering van de celmembraan op. Deze insnoering wordt gevolgd door de vorming van de celwand en daaruit volgend het ontstaan van twee dochtercellen.

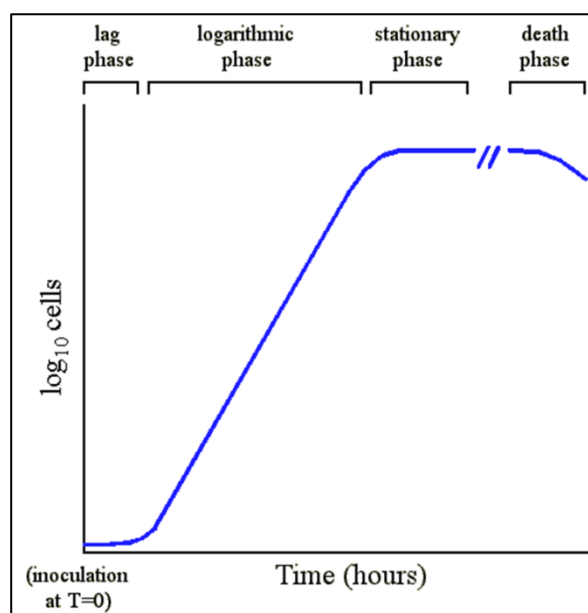
In bepaalde groeivoorwaarden bevat iedere *E. coli* een zich duplicerend chromosoom. Dit chromosoom bestaat uit een dubbel circulaire DNA-molecule. De DNA-molecule blijkt zoals reeds vroeger aangehaald verbonden te zijn met het membraan via de mesosomen. Er wordt verondersteld dat de groei van het membraan tussen de twee aanhechtspunten van de twee nieuwe DNA-moleculen verantwoordelijk zouden zijn voor het scheiden van het genetisch materiaal en dus het ontstaan van twee dochtercellen. Iedere dochtercel krijgt dus evenveel DNA mee.

3.2.1. Het verloop van de bacteriegroei.

Worden bacteriën geënt op een voedingsbodem, dan zullen deze bacteriën beginnen groeien tot alle voedingsstoffen in deze bodem opgebruikt zijn of dat de opgestapelde metabolieten de groei remmen. Deze groei kan grafisch weergegeven worden indien in abscis de tijd en in ordinaat de $\log_{10}$ (cellenaantal) uitgezet wordt.

In deze groeicurve zijn meestal vier fasen te onderkennen nl.:

- de lag-fase
- de log-fase
- de stationaire fase
- de dode fase



3.2.1.1. De lag-fase.

De aanloop- of lag-fase is de periode waarin nog niet de maximale delingssnelheid bereikt wordt. Zoals later in de cursus zal blijken, is er voor de deling een hogere concentratie van RNA vereist. Dit RNA wordt dan ingezet bij de eiwitsynthese. Naast het RNA zijn er ook ribosomen noodzakelijk voor de eiwitsynthese. Tijdens de lag-fase worden zowel de ribosomen als het RNA en de eiwitten gesynthetiseerd. De duur van deze fase is sterk afhankelijk van de toestand van de bacteriën die geënt werden op de voedingsbodem en de samenstelling van deze laatste. Indien dit een arme bodem is, dan moeten er veel nieuwe enzymen aangemaakt worden zodat alle componenten die niet in de bodem aanwezig waren zelf kunnen gesynthetiseerd worden.

3.2.1.2. De log-fase.

Tijdens de exponentiële of logaritmische fase verloopt de deling met een constante maximale waarde, die karakteristiek is voor elke bacteriesoort en afhankelijk van het voedingsmilieu. De bacteriën vermenigvuldigen zich door tweedeling zodat het aantal bacteriën toeneemt volgens een geometrische reeks: $2^0 \ 2^1 \ 2^2 \ 2^3 \dots 2^n$.

N: het aantal bacteriën na t uren.

N_0 : het aantal bacteriën op tijdstip t_0 .

g: de generatietijd.

$$\log N = \log N_0 + \frac{\log 2}{g} t$$

Zo bedraagt de generatietijd van *E. coli* bij 37°C in een rijk voedingsmedium 22 min. en in een minimaal medium met glucose 40 min.

3.2.1.3. De stationaire fase.

Tijdens deze fase kunnen de cellen niet meer zo snel delen. Deze situatie ontstaat wanneer ofwel het substraat opgebruikt is of dat de opstapeling van stofwisselingsproducten de groei remmen. Voor zover de cellen nog reservestoffen of proteïnen kunnen verbruiken, blijven de bacteriën nog levensvatbaar.

3.2.1.4. De dode fase.

Het afsterven van de bacteriën kan soms veroorzaakt worden door verdere opstapeling van metabolieten tot een toxische concentratie.

Sommige bacteriënsoorten zoals de genera *Bacillus* en *Clostridium*, kunnen in ongunstige omstandigheden sporen vormen. Een normale vegetatieve cel vormt zich meestal om tot één endospore door de vorming van een harde sporenwand. Deze sporen zijn metabolisch inactief en zeer bestand tegen warmte.

3.2.2. Factoren die de groei beïnvloeden.

De groei van een bacterie is niet alleen afhankelijk van de voedingsstoffen. Ook andere parameters kunnen de groei beïnvloeden zoals de pH, de temperatuur, de osmotische waarde en de zuurstofvoorziening. Deze verschillende factoren worden hier van nabij bekeken.

3.2.2.1. De pH.

Voor de meeste bacteriënsoorten kan gesteld worden dat zij het best overleven in een milieu met een zuurtegraad gelegen tussen de 6 en de 9. Extreme pH-waarden zowel naar boven als naar onder, werken meestal remmend de uitzonderingen niet beschouwend. Er zijn dus bacteriën die goed kunnen gedijen in een zuur of een alkalisch milieu.

Azijnzuurbacteriën op hun beurt produceren zuren door katabolische werking. Deze zuren zullen op een bepaald moment remmend gaan werken. Deze remming kan op zijn beurt geremd worden door de geproduceerde zuren te gaan neutraliseren door het toevoegen van een buffer. Dit kan natuurlijk slechts gebeuren in een kunstmatig milieu en gebeurt dus niet in de natuur.

3.2.2.2. De temperatuur T.

Voor *E. coli* is de optimale groeitemperatuur 37°C. De groei vermindert zeer sterk bij temperaturen die buiten het gebied van 20-45°C liggen. Uitzonderingen bevestigen weer de regel. Er zijn dus ook bacteriën die goed kunnen overleven bij lage of hoge temperaturen. Dit zijn respectievelijk psychrofiële en thermofiele bacteriën.

3.2.2.3. De osmotische waarde.

Meestal zijn het slechts hoge osmotische waarden van het voedingsmilieu die een remmende invloed hebben op de groei. Dit komt doordat er geen water meer opgenomen wordt door het organisme. Bij voedingsmilieus waar er een zoutconcentratie heerst van > 10% of zeer hoge suikerconcentraties, zal er groeiremming optreden. Er zijn echter ook weer bepaalde zeeorganismen die niet kunnen leven in een voedingsmilieu met een zoutconcentratie die kleiner is dan 1%. Dit zijn de zogenaamde halofiele organismen.

3.2.2.4. De zuurstofconcentratie.

De bacteriën kunnen ingedeeld worden in drie groepen volgens hun noodzaak aan O₂.

a) De obligaat aërobe: Deze bacteriën hebben noodzaak aan O₂ als elektronenacceptor. O₂ is echter zeer weinig oplosbaar in water (0.20 mmol/l bij 20°C). In een vloeistofcultuur is dit slechts ter beschikking aan het oppervlak van deze cultuur. Indien er overal bacteriën noodzakelijk zijn (bv. voor een hoog rendement), dan moet er geschud of lucht doorgeblazen worden.

b) De obligaat anaërobe: Bij deze bacteriën werkt de aanwezigheid van O_2 remmend op de groei.

c) De facultatief anaerobe: Dit zijn bacteriën zoals *E. coli* die zowel door gisting (anaeroob proces) als door ademhaling (aeroob proces) organische stoffen kunnen afbreken en aldus nieuwe bouwstenen bekomen voor de groei.

3.2.3. De groeiremstoffen.

Er kan ook een bacteriostatische of groeiremmende werking ontstaan door een hele reeks chemische stoffen. Ook een bacteriocide of dodende werking kan door bepaalde stoffen ontstaan. In beide gevallen is de toxiciteit afhankelijk van de concentratie. Hierna volgen er enkele voorbeelden.

Beschadiging kan ontstaan op het niveau van het celmembraan. Dit kan veroorzaakt worden door b.v. toluen, fenolen en detergents.

Beschadiging op het niveau van de celstructuur. Dit gebeurt door een hoge concentratie van bepaalde organische stoffen zoals alcohol.

Er kan ook een remming van de enzymenactiviteit optreden. Dit gebeurt door zware metaalionen zoals Cu, Hg, Ag ... Dit wordt uitgebreider besproken bij de enzymen.

Remming kan eveneens optreden door stoffen van biologische afkomst zoals de antibiotica.

3.2.4. Sterilisatie.

Wanneer welbepaalde micro-organismen bestudeerd worden, dan is het absoluut noodzakelijk om vooraf alle andere organismen te verwijderen uit de te gebruiken voedingsbodems. Het steriliseren of kiemvrij maken kan gebeuren met verschillende methoden zoals het bestralen met U.V.-licht, het behandelen met chemicaliën, het filtreren door een filter met kleine poriën, ...

De meest voorkomende methode is echter het steriliseren door middel van koken onder verhoogde druk (2 atm. 120°C) in een autoclaaf. De gewone vegetatieve cellen worden reeds gedood bij een temperatuur van $\pm 80^\circ\text{C}$. De bacteriënsporten kunnen echter slechts vernietigd worden bij een temperatuur van $\pm 120^\circ\text{C}$. In droge toestand zijn de bacteriënsporten nog resistenter. Om b.v. glaswerk te steriliseren moet dit verwarmd worden bij een temperatuur van 160°C gedurende minstens 2 uur.

3.3. Het metabolisme.

In elk organisme vindt voortdurend een omzetting plaats van allerlei stoffen. Het totaal van de chemische reacties die voor deze omzettingen zorgen, wordt het metabolisme of stofwisseling

genoemd. Omdat de reacties in twee groepen kunnen onderverdeeld worden, wordt het metabolisme onderverdeeld in het anabolisme en het katabolisme. De term metabolisme wordt gebruikt om te verwijzen naar alle chemische processen in de cel (Grieks: metabole = veranderen). De basis chemische elementen waaruit de cel is opgebouwd komen uit de omgeving. Ze moeten echter wel worden getransformeerd door de cel naar de karakteristieke bouwstenen. De chemische producten waaruit de cel wordt opgebouwd worden nutriënten genoemd. Omdat anabolisme resulteert in de biochemische synthese van nieuw materiaal wordt dit ook biosynthese genoemd. Biosynthese is een proces die energie nodig heeft. Elke cel heeft dus een systeem nodig om energie te verkrijgen. De energie wordt uit de omgeving gehaald. Er zijn drie bronnen van energie: licht, anorganisch materiaal en organisch materiaal. De verschillen worden in de volgende tabel schematisch weergegeven.

ANABOLISME	KATABOLISME
Opbouwstofwisseling	Afbraakstofwisseling
Assimilatie: opbouw tot lichaamseigen stoffen	Dissimilatie: uiteenvallen van de bij assimilatie gevormde producten
Vastleggen van energie in de gesynthetiseerde producten	Vrijmaken van energie: verbranding
Endergonisch proces	Exergonisch proces
Dikwijls gewichtstoename	Meestal gewichtsafname
Bv.: Koolstofassimilatie, opbouw van eiwitten uit aminozuren	Bv.: Verbranding van glucose tot CO ₂ en H ₂ O

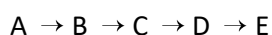
Anabolisme en katabolisme zijn nauw met elkaar verweven omdat bijna alle biochemische reacties reversibel zijn.

Groene planten, blauwgiaren en bepaalde bacteriën zijn de enige organismen die in staat zijn zelf organische stoffen uit o.a. CO₂ te synthetiseren. Het zijn autotrofe organismen, dit in tegenstelling met de niet-groene planten, de meeste bacteriën, de dieren en de mens, die heterotroof zijn. Zij moeten niet alleen anorganische stoffen opnemen zoals water, zouten en zuurstof, maar ook organische stoffen zoals koolhydraten, eiwitten en vetten. Hiervoor zijn ze direct of indirect, via dieren, aangewezen op de autotrofe organismen.

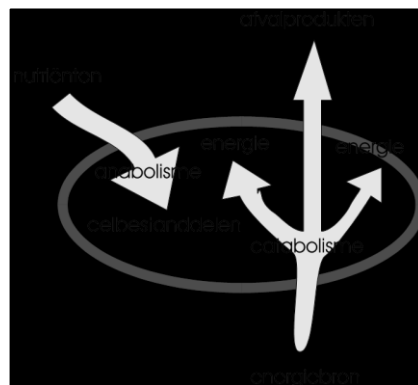
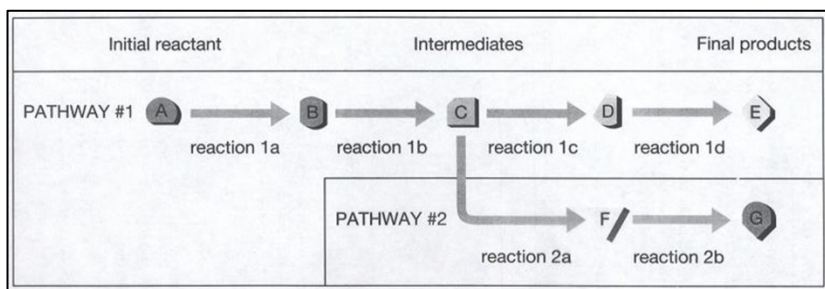
De autotrofe organismen kunnen ingedeeld worden in fotoautotrofen en chemoautotrofen.

3.3.1. Biochemische reacties en katalyse.

Alle biochemische afbraak- en opbouwreacties bestaan uit een aaneenschakeling van deelreacties. Het product van iedere deelreactie wordt gebruikt als substraat voor de volgende reactie.



Om nu een inzicht te verwerven in de voornaamste biochemische processen is het nodig enkele factoren te bespreken die determinerend zijn voor de biochemische reacties.



3.3.1.1. De energieomzettingen.

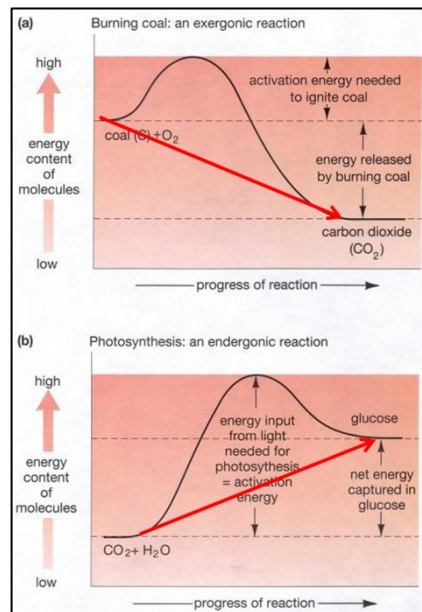
Energie is de mogelijkheid om arbeid te verrichten. Levende organismen maken gebruik van chemische energie. Chemische energie is de energie die vrijkomt wanneer organische of anorganische componenten in redox reacties worden betrokken. Energie wordt uitgedrukt in kilojoule (kJ) (1 kilocalorie = 4,184 kilojoule). Chemische reacties gaan vergezeld van een winst of verlies aan energie. Er zijn twee grootheden die de energie beschrijven bij een chemische reactie namelijk: H de enthalpie en G de vrije enthalpie. H drukt de totale energie uit. G wordt gebruikt om de energie bruikbaar voor arbeid uit te drukken. De verandering van de vrije enthalpie gedurende een chemische reactie wordt gegeven door ΔG° . De superscripts ° en ' betekenen dat de reactie gebeurt in standaard omstandigheden: pH 7, 25°C en producten in 1 mol concentraties. Wanneer ΔG° negatief is wordt energie afgegeven en gebeurt de reactie spontaan. Is ΔG° positief dan zal de reactie niet spontaan gebeuren. Hoe groter ΔG° hoe meer het evenwicht zal verschoven zijn naar de kant van de reactieproducten. De ΔG° van een reactie kan berekend worden uit het verschil tussen de vorming vrije enthalpie (G°_f) van de reactieproducten en de reagentia. G°_f is de energie nodig of vrijgegeven bij het vormen van een stof uit zijn elementen. De G°_f van elementen wordt als 0 genomen.

Elke chemische reactie gaat met energieomzettingen gepaard: bij sommige reacties komt energie vrij, bij andere is er energie vereist om de reactie te doen plaatsvinden. Meestal gaat het om energie onder de vorm van warmte en wordt er gesproken van reactiewarmte.

De energiebalans van een reactie wordt nog bepaald door een andere parameter, namelijk het toenemen van de graad van ordening of van de graad van wanorde tijdens de omzetting. Iedere toename van orde vraagt energie. De graad van wanorde binnen een systeem wordt entropie genoemd. Hoe groter de graad van wanorde hoe groter de entropie van een systeem.

Zowel de reactiewarmte als de entropie vormen een maat voor de drijfkracht van een reactie en dus voor de energie die door de reactie in gunstige voorwaarden voor het leveren van arbeid ter beschikking gesteld kan worden. Deze nuttige beschikbare energie wordt de vrije

energie genoemd. Deze is voor organismen van bijzonder belang. Ze heeft bijvoorbeeld aan hoeveel energie er bij de afbraak van een bepaalde hoeveelheid glucose in de celstofwisseling maximaal beschikbaar kan komen.



Kortweg kan gesteld worden:

Vrije energie van de reactie (drijfkracht van de reactie): vrijkomende reactiewarmte min de hoeveelheid energie die gebruikt wordt voor het bereiken van de nieuwe toestand van ordening.

Symbolisch:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Met: ΔG : vrije energie van de reactie

ΔH : reactiewarmte

ΔS : entropie

T: absolute temperatuur

Het teken Δ geeft aan dat het gaat om het verschil gemeten in de betrokken grootte tussen begin- en eindtoestand van de reactie.

Reacties waarbij energie vrijkomt worden exergonische reacties genoemd. Bij overeenkomst wordt de vrijkomende vrije energie ΔG van dergelijke reacties met een - aangeduid.

Omzettingen die toevoer van energie vereisen worden endergonische reacties genoemd en de ΔG is dan positief.

Chemische reacties verlopen alleen dan spontaan wanneer ze het ontstaan geven aan reactieproducten met een lagere energie-inhoud dan die van de uitgangsstoffen. Het zijn dus enkel de exergonische reacties die spontaan verlopen daar zij gepaard gaan met een vermindering van de vrije energie. Hoe groter het verschil in energie-inhoud, des te spontaner zal de reactie verlopen.

In de cel komen er echter ook endergonische reacties voor. Deze kunnen enkel plaats grijpen indien ze gekoppeld zijn aan een exergonische reactie die meer energie oplevert dan dat er verbruikt wordt door de endergonische reactie. De totale energiebalans van allebei de typen van reactie samen moet dus een energieoverschot vertonen. Dit overschot komt dan vrij onder de vorm van warmte. Dit alles kan verduidelijkt worden aan de hand van het volgende voorbeeld.

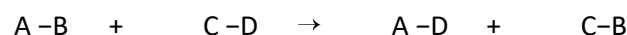
1	Glucose + H ₃ PO ₄ → glucosefosfaat	Energietoevoer: $\Delta G = +12.6 \text{ kJ/mol}$
2	ATP → ADP + H ₃ PO ₄	Energieafgifte: $\Delta G = -29.4 \text{ kJ/mol}$
3	Glucose + ATP → glucosefosfaat + ADP	Energieoverschot: $\Delta G = -16.8 \text{ kJ/mol}$

De reactie (1) is endergonisch en verloopt dus niet spontaan. De reactie (2) is exergonisch en verloopt, in aanwezigheid van het geschikte enzym, spontaan. Maar ook bij koppeling van allebei de reacties (3) blijft het proces exergonisch en kan het spontaan verlopen. Het energieoverschot komt dan vrij onder de vorm van warmte.

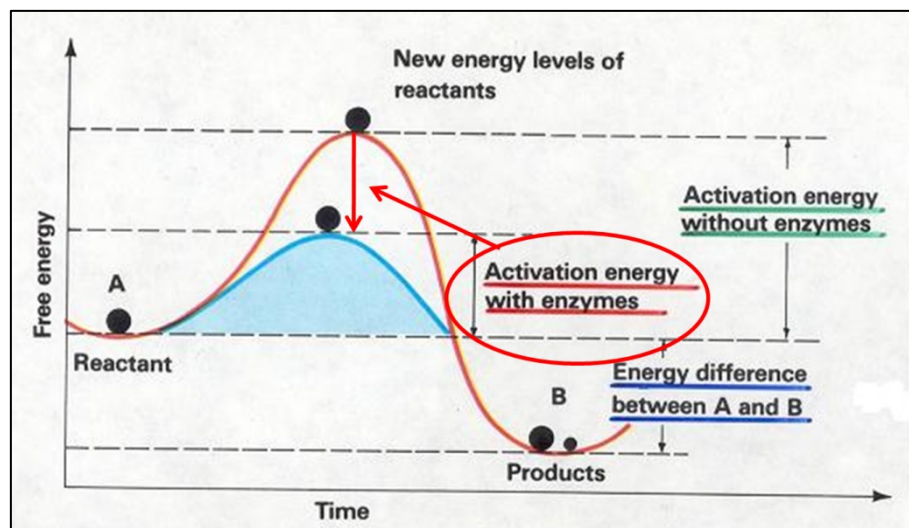
3.3.1.2. De reactiesnelheid en activatie-energie.

De neiging tot reageren, de z.g. reactiviteit, gemeten als een negatieve ΔG -waarde zegt nog niets over de snelheid waarmee de betrokken reactie zal verlopen. Hiermee wordt enkel aangegeven dat de reactie doorgaat en dat er energie bij vrijkomt. De reactiesnelheid zelf is onafhankelijk van de energieverhoudingen.

In de meeste biochemische reacties moeten covalente verbindingen verbroken worden om een nieuwe binding te kunnen vormen met een andere atoomgroep.



De reactie kan enkel starten na het toevoegen van een bepaalde hoeveelheid energie die dan ook activatie-energie genoemd wordt.



Gewoonlijk bedraagt de activatie-energie 80-120 kJ/mol. Daardoor reageren gewone organische moleculen zeer traag bij kamertemperatuur. De barrière die geschapen wordt door de activatie-energie is van enorm belang. Zonder deze barrière zou leven onmogelijk zijn daar alle reacties vlug naar evenwicht zouden verlopen. Dit wordt de metastabiele toestand genoemd. Het reactie evenwicht van organische stoffen in aanwezigheid van O₂ ligt ver naar de vorming van CO₂ en H₂O. Bij normale temperatuur reageren de meeste organische stoffen niet merkbaar met O₂. (B.v. kolen reageren niet spontaan met O₂, er is activatie-energie nodig onder vorm van een brandende lucifer.)

Anderzijds zou het leven eveneens onmogelijk zijn indien er geen middel voorhanden was om de activatie-energie van bepaalde op dat ogenblik gewenste reacties naar beneden te halen zodat deze reactie bij normale temperatuur kan doorgaan. Door gebruik te maken van katalysatoren, kan deze activatie-energie verlaagd worden. Katalysatoren brengen immers het substraat, dit is de stof waarvan ze de omzetting teweegbrengen, in een zodanige toestand dat de reactie makkelijker plaatsheeft. Katalysatoren wijzigen geenszins het reactie-evenwicht of de hoeveelheid vrijkomende energie, maar enkel de reactiesnelheid. Aangezien katalysatoren na de omzetting van het substraat onveranderd weergevonden worden en opnieuw ter beschikking staan, volstaan kleine hoeveelheden voor de omzetting van grote hoeveelheden substraat.

In de biochemische reacties zijn deze katalysatoren de enzymen.

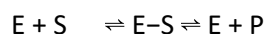
3.3.1.3. De enzymen.

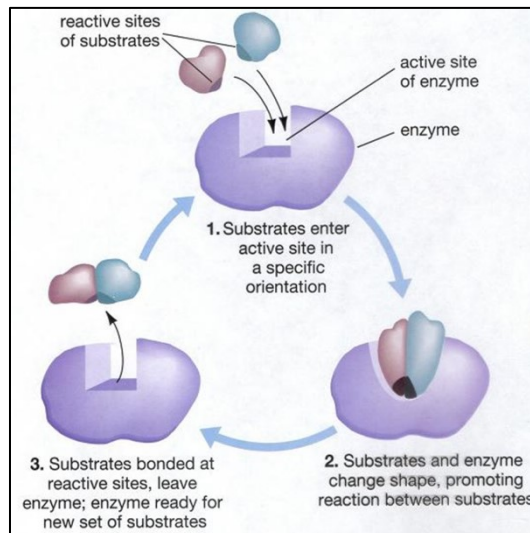
3.3.1.3.1. De samenstelling.

Enzymen zijn globulaire eiwitten. Eén enkel enzym kan per minuut tot 100.000 moleculen substraat verwerken. Het enzym katalase kan zelfs tot 5.000.000 moleculen omzetten. In vele gevallen zijn voor hun katalytische werking nog cofactoren vereist. De cofactor kan bestaan uit een metaalion of een organische molecule. Dit wordt dan co-enzym genoemd of prosthetische groep indien de verbinding gebeurt door een covalente binding. Het geheel van co-enzym en apo-enzym (het proteïne gedeelte zonder de cofactor) wordt het holo-enzym genoemd.

Bij de katalyse wordt het substraat door middel van zwakke bindingen gebonden op de actieve plaats van het enzym. Een efficiënte binding vergt dan ook meerdere contactpunten. Door de welbepaalde tertiaire structuur van het eiwit bezit de actieve plaats van het enzym een karakteristieke vorm waarop alleen passende substraatmoleculen kunnen gebonden worden. Dit principe wordt aangeduid als het sleutel-slot mechanisme.

De snelheid van een enzymatische reactie zal evenredig zijn met de concentratie van het enzymsubstraat-complex ([ES]).





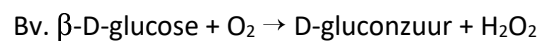
De activatie-energie van het enzymsubstraat-complex is zeer sterk verminderd. In de volgende tabel wordt er een voorbeeld gegeven.

Ontbinding van H_2O_2 :		$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
	Vereiste activatie-energie	
zonder katalysator	75 kJ/mol	
met colloïdaal platina	49 kJ/mol	
met het enzym katalase	23 kJ/mol	

Er bestaat een exponentiële verhouding tussen de reactiesnelheid en de vermindering van de activatie-energie. Een vermindering van de activatie-energie van 80 kJ/mol naar 40 kJ/mol, versnelt de reactie 500.000 x.

Dank zij de enzymen verlopen in het organisme de vereiste reacties met de gepaste snelheid op het gepaste moment bij een temperatuur die aanvaardbaar is voor het leven.

Er dient eveneens opgemerkt dat de enzymen een zeer specifieke werking hebben. Voor de ongeveer duizend gekende biochemische reacties bestaan er evenveel enzymen. Deze specificiteit kan zeer sterk uitgesproken zijn. In andere gevallen is ze dan weer minder uitgesproken.



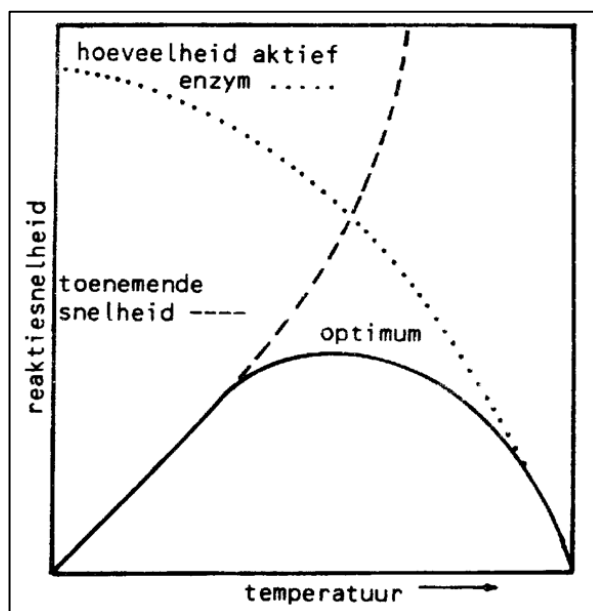
Deze reactie wordt versneld door het enzym glucoseoxidase.

Met andere substraten is de reactiesnelheid weer veel kleiner zoals aangegeven in de volgende tabel:

Substraat	Relatieve activiteit (μmol substraat/tijdseenheid)
β-D-glucose	100
α-D-glucose	< 1
2-desoxy-D-glucose	25
D-galactose	< 1
D-fructose	0

3.3.1.3.2. De reactiesnelheid in functie van de omstandigheden.

Indien de snelheid van een biochemische reactie uitgedrukt wordt in functie van de temperatuur, dan wordt er een kromme bekomen met een minimum, een optimum en een maximum. Het minimum ligt gewoonlijk in de buurt van 0°C, het optimum in de buurt van 30°C en het maximum in de buurt van 60°C. Deze cijfers zijn echter wel verschillende naargelang het enzym.



Deze kromme is het resultaat van twee tegenovergestelde effecten nl.:

- een verhoging van de temperatuur heeft een versneld effect op alle chemische reacties. Dit wordt kwantitatief uitgedrukt door de temperatuurcoëfficiënt Q_{10} die normaal 2 à 3 bedraagt van de chemische reactie.

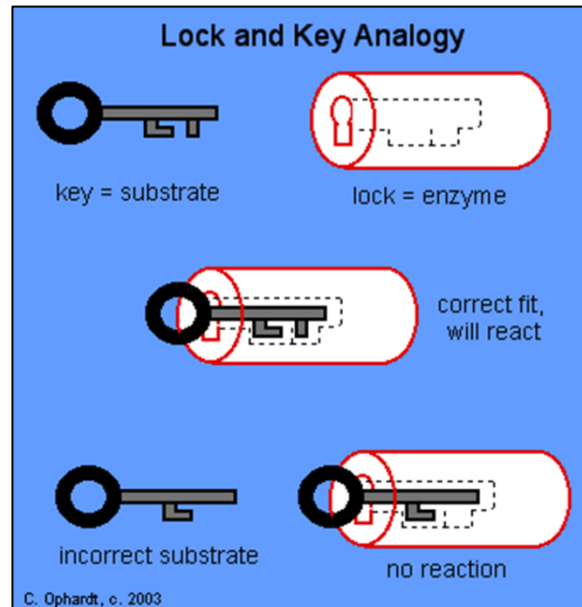
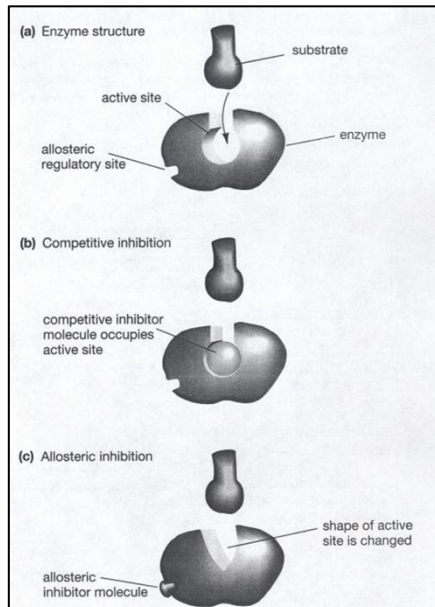
$$Q_{10} = \frac{\text{Reactiesnelheid bij } T+10^{\circ}\text{C}}{\text{Reactiesnelheid bij } T}$$

- door verhoging van de temperatuur worden vanaf een zeker punt de enzymen gedenatureerd waardoor de reactiesnelheid dan ook vrij sterk afneemt om terug tot nul te komen.

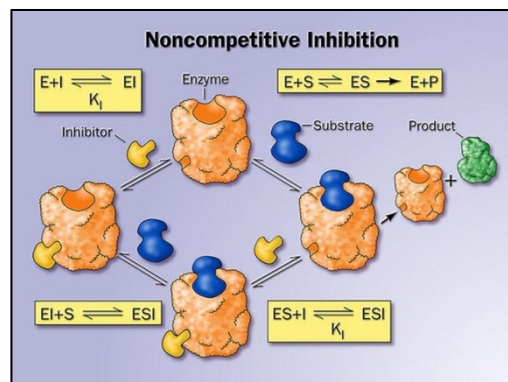
Voor de pH geldt eveneens dat er een minimum, optimum en een maximum voorkomt. De pH beïnvloedt inderdaad de ruimtelijke structuur van het enzym en de dissociatiegraad.

3.3.1.3.3. De inhibitie.

- de competitieve inhibitie: bepaalde moleculen vertonen zoveel gelijkenis met het natuurlijk substraat dat ze een tijdelijke binding met het enzym kunnen aangaan. Het enzym heeft dan echter geen katalytische werking. Het “verkeerde substraat” staat dan in competitie met het reëel substraat.



- de non-competitieve inhibitie: enzymen kunnen uitgeschakeld worden door moleculen die in een permanente binding treden met het enzym en daardoor de chemische reactie belemmeren. Dit zijn non-competitieve inhibitoren.



3.3.1.3.4. Nomenclatuur.

De nomenclatuur van de enzymen kan in drie klassen ingedeeld worden.

- De naam bestaat uit drie delen nl.
substraat-bewerking-ase
bv. barnsteenzuurdehydrogenase, glucoseoxidase.
- De bewerking is weggelaten.
substraat-ase

bv. amylase, cellulase, lipase.

- De naam is gebaseerd op de vroegere naamgeving.

bv. insuline, trypsine, pepsine.

Sedert 1960 is de eerste manier van naamgeven gestandaardiseerd. Er kunnen nu verschillende onderverdelingen gemaakt worden.

oxidoreductasen	Staan in bij de redoxreacties. Komen meestal voor bij de ademhaling.
transferasen	$AX + B \rightarrow A + BX$ bv. transaminase.
hydrolasen	Meestal reacties met H_2O . bv. amylase.
lyasen	Een reactie met splitsing die geen hydrolyse is. Komen veel voor bij het katabolisme. bv. $1C_6 \rightarrow 2C_3$
isomerasen	Maken isomeren. bv. omzetting van glucose tot fructose.
ligasen	Vormen liganden. $A + B \rightarrow AB$

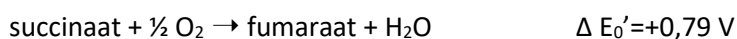
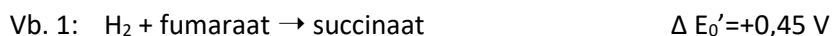
3.3.1.4. Oxidatie-reductie.

Het gebruik van energie in levende organismen betekent het gebruik maken van oxidatie - reductie reacties (redox). Oxidatie en reductie in biochemische processen betekent niet alleen elektronen transport maar is meestal verbonden met H-uitwisseling. Het is niet noodzakelijk dat er zuurstof aanwezig is om deze reacties te laten doorgaan.

De reductie potentiaal (E_0) drukt uit hoe graag een stof gereduceerd wordt, dus hoe graag het elektronen opneemt. Deze potentiaal kan gemeten worden ten opzichte van een gekozen standaard (H_2). Bij conventie worden reductiepotentialen uitgedrukt voor halfreacties geschreven met de oxidantia links, dus als reducties. Als waterstofionen voorkomen in het proces dan is de reductiepotentiaal afhankelijk van de pH.

Bij conventie in de biologie wordt de potentiaal (E_0') gegeven bij een neutrale pH (pH=7) omdat de pH van het cytoplasma gelijk is aan 7.

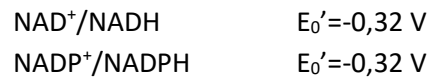
In een reactie moet altijd een elektronen donor gekoppeld worden aan een elektronen acceptor. De combinatie van twee halfreacties levert dan de totale reactie op.



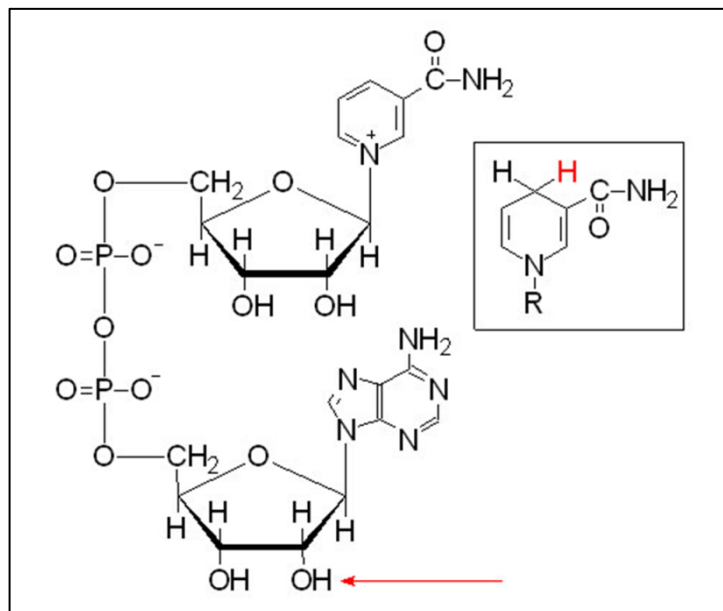
Hoe groter de "val" van de elektronen, dus hoe groter $\Delta E_0'$, hoe meer energie er vrijkomt in de reactie. M.a.w. $\Delta E_0'$ is proportioneel met ΔG° . In het katabolisme wordt de elektronen donor gezien als de energiebron, het echter is de gekoppelde reactie die zorgt voor de afgifte van energie. De energie opbrengst is dus afhankelijk van en de elektronen donor en de elektronen acceptor.

3.3.1.5. Elektronen carriers.

In de cel gebeurt de transfer van elektronen in oxidatie-reductie reacties via één of meerdere intermediären (carriers). De totale energieopbrengst verandert hierbij niet. Er bestaan twee groepen van elektronen carriers: oplosbare (diffusie) en membraan-geassocieerde. Een voorbeeld van oplosbare dragers zijn NAD^+ (nicotinamideadeninedinucleotide) en NADP^+ (NAD-fosfaat).



Alhoewel NAD^+ en NADP^+ dezelfde reductiepotentiaal hebben voorzien ze elk in specifieke functies. NAD^+ wordt gebruikt in energie-opwekkende reacties (katabolisme) en NADP^+ in biosynthetische reacties (anabolisme).



3.3.2. Energierijke verbindingen.

Een energierijke verbinding bevat één of meerdere bindingen die bij hydrolyse meer dan 20 kJ/mol vrijzetten. De binding die bij hydrolyse dit groot verlies in vrije energie levert wordt door een speciaal teken voorgesteld: $\sim$.

In deze bindingen is steeds een P of S-atoom aanwezig.

In levende wezens is ATP de chemische vorm waarin de energie beschikbaar gesteld wordt voor energieverbruikende reacties, zoals endergonische reacties, bewegingen en actief transport. De energie voor de synthese van ATP wordt bij de heterotrofen geleverd door het katabolisme, in autotrofen door de oxidatie van anorganische stoffen of door lichtenergie.

3.3.3. De afbraak van de koolhydraten.

Er werd reeds eerder aangehaald dat de afbraak van organische stoffen van essentieel belang is als bron van energie en tussenproducten voor het anabolisme. Het zijn vooral de koolhydraten die gebruikt worden als voedingsstoffen of als vertrekpunt van het katabolisme. Van alle organische stoffen komen de koolhydraten immers het overvloedigst voor omdat zij op hun beurt de voornaamste producten zijn van het fotosyntheseproces.

Heterotrofen zijn voor hun energievoorziening dus aangewezen op het katabolisme. Maar ook de autotrofen hebben het katabolisme nodig. Zij immers produceren organische stoffen waarin de energie die zij uit het licht verkregen hebben in opgeslagen is. Deze stoffen zijn voornamelijk glycogeen of zetmeel en vetten. Via het katabolisme kan het organisme uit deze reserves weer energie putten.

E. coli is een facultatief anaeroob organisme. Het is dus in staat zowel door gisting als door ademhaling voldoende organisch materiaal af te breken voor zijn energiewinning.

3.3.3.1. Fermentatie

In de afwezigheid van een externe elektronenacceptor kunnen er inwendig uitgebalanceerde oxidatie-reductie reacties worden uitgevoerd met afgifte van energie. Dit wordt een fermentatie genoemd. Er zijn verschillende vormen van fermentatie maar ze hebben allen gemeenschappelijk dat er slechts een partiële oxidatie gebeurt van de koolstofatomen en dat er slechts gedeeltelijk gebruik wordt gemaakt van de potentiële energiehoeveelheid. De oxidatie in een fermentatie is gekoppeld aan een daarop volgende reductie. Daarom is er geen externe elektronenacceptor nodig.

Een voorbeeld van fermentatie is het katabolisme waarbij glucose omgezet wordt in melkzuur.



Een ander voorbeeld is de omzetting van glucose door gist tot alcohol (in de afwezigheid van zuurstof).



De energie die vrijkomt bij de fermentatie van glucose tot ethanol en tot melkzuur wordt opgeslagen door de vorming van 2 ATP moleculen uit 2 ADP moleculen.

De stappen van glucose tot pyruvaat worden glycolyse genoemd. Het rendement van de reactie is $\pm 26\%$.

Zoals eerder aangehaald kunnen er andere fermentatieproducten worden gevormd. In totaal worden 2 ATP moleculen gevormd (4 gevormd - 2 verbruikt) per omgezette glucose molecule. Voor NAD^+ is het netto resultaat nul: gelijk verbruik en aanmaak. Dit is ook nodig

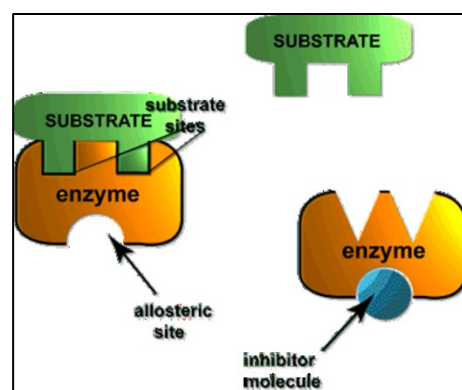
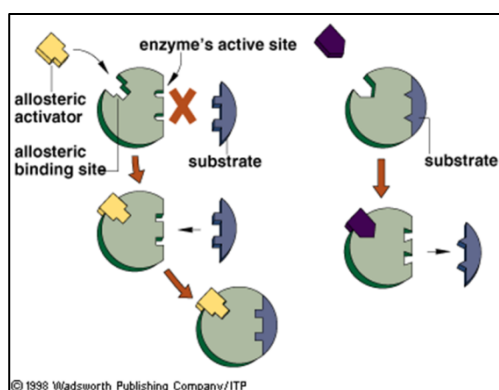
omdat de cel slechts beschikt over een beperkte hoeveelheid NAD^+ . Aangezien de koolstof atomen slechts zeer gedeeltelijk zijn geoxideerd en de verandering in reductiepotentiaal tussen de elektronendonor en acceptor klein is, is de totale energieopbrengst laag. Dit proces kan sterk verbeterd worden door gebruik te maken van externe elektronen acceptoren.

3.3.3.2. Respiratie of ademhaling.

Het proces waarbij een component wordt geoxideerd en waarbij er gebruik wordt gemaakt van O_2 of een andere elektronenacceptor noemt respiratie. De energieopbrengst is groter dan bij de fermentatie omdat de koolstof meer wordt geoxideerd (tot CO_2) en het elektronentransport gebruikt wordt om ATP te produceren.

3.3.3.3. Regeling van de enzymactiviteit.

Niet alle processen in een cel gaan met de zelfde snelheid door. Dit omdat bepaalde producten slechts in kleine hoeveelheden nodig zijn. Voor sommige processen is het noodzakelijk dat ze soms niet doorgaan en op andere momenten wel. Dit betekent dat er een regeling moet gebeuren van de enzymen die deze processen laten gebeuren. Er zijn twee grote mogelijkheden om op het niveau van de enzymen een regeling uit te voeren. Een eerste mogelijkheid is de hoeveelheid enzym controleren (of zelfs de afwezigheid). Dit gebeurt door inductie en repressie op het genniveau. De tweede mogelijkheid is de activiteit regelen van een enzym. Aangezien enzymen zorgen voor een vlugge instelling van het evenwicht van een reactie zal naarmate de concentratie aan product groter wordt de omzettingssnelheid dalen. Dit wordt productinhibitie genoemd. Als dit product echter in volgende stappen wordt verwijderd werkt dit systeem niet. Daarom worden veel systemen gecontroleerd door feedback inhibitie. Hierbij wordt een totale pathway geregeld omdat het eindproduct de werking van het eerste enzym inhibeert.



3.4. Erfelijkheid bij de prokaryoten.

Vorm en samenstelling van organismen blijven gedurende opeenvolgende generaties nagenoeg constant. Ouders en afstammelingen, en afstammelingen onderling, vertonen naast de fundamentele

gelijkenissen ook zekere verschillen. Er kan dus besloten worden dat er van generatie tot generatie informatie wordt doorgegeven. De overdracht van informatie vindt plaats door middel van genen.

Een gen is een erfelijk deeltje d.w.z. de stoffelijke drager van de aanleg van een erfelijke eigenschap. Alle genen samen van een organisme, dus de totale erfelijke aanleg, wordt het genotype genoemd. De eigenschappen die worden waargenomen, dus de verschijningsvorm, wordt het fenotype genoemd.

Het onzichtbare genotype leidt tot een bepaald fenotype. Hierbij speelt het milieu een belangrijke rol. Onder het milieu wordt verstaan: het geheel van uitwendige omstandigheden zoals voeding, opvoeding, bemesting, zonlicht, temperatuur². Wijzigingen die optreden onder invloed van het milieu zijn modificaties. Modificaties zijn niet erfelijk. Zo zullen bij bacteriën flagellen ontbreken op een vaste voedingsbodem en worden er enzymen geïnduceerd naar gelang het voedingsmedium.

Er mag ook niet besloten worden dat wanneer de fenotypen gelijk zijn, de genotypen gelijk zijn. De omgekeerde situatie is echter wel waar: twee verschillende fenotypen in eenzelfde milieu bezitten een verschillend genotype. De bacterie *Serratia marcescens* is normaal rood gekleurd bij een temperatuur die lager is dan 37°C en kleurloos bij een hogere temperatuur. Er bestaan echter ook stammen die in alle omstandigheden kleurloos zijn. Bij 37°C gekweekt vormen de beide genotypen hetzelfde kleurloze fenotype.

<i>Serratia marcescens</i>			
	pig ⁺	pig ⁻	
Temp. > 37°C	kleurloos	kleurloos	= fenotype ≠ genotype
Temp. < 37°C	rood	kleurloos	≠ fenotype ≠ genotype

Het milieu heeft natuurlijk niet altijd invloed op de vorming van het fenotype vanuit het genotype. Zo zijn bloedgroep en oogkleur voorbeelden van erfelijke eigenschappen waarop het milieu geen invloed heeft.

Tijdens de ontwikkeling van het organisme zal het fenotype voortdurend veranderen, in tegenstelling tot het onveranderlijke genotype. Het genotype en dus ook enigszins de toekomst van het organisme, ligt reeds vast vanaf het moment dat de twee ouderorganismen hun erfelijke informatie laten versmelten. Wanneer er toch een verandering plaats heeft in het genotype, wordt er gesproken van een mutatie.

² Wanneer een aardappelplant te weinig zonlicht ontvangt, zal de plant zich nauwelijks kunnen ontwikkelen. Het fenotype zal er anders uitzien dan dat van een andere aardappelplant (die dezelfde aanleg heeft) en die zich onder zeer gunstige omstandigheden heeft kunnen ontwikkelen.

Wanneer een kind aanleg heeft om pianovirtuoos te worden zal het mede van de opvoeding afhangen of deze aanleg later tot uiting komt. Zonder muziekonderricht en instrumentarium zal dit waarschijnlijk nooit gebeuren. Omgekeerd zal het wel duidelijk zijn dat wanneer er geen muzikale aanleg is, een kind zelfs met het beste muzikale onderricht, nooit tot een virtuoos zal uitgroeien.

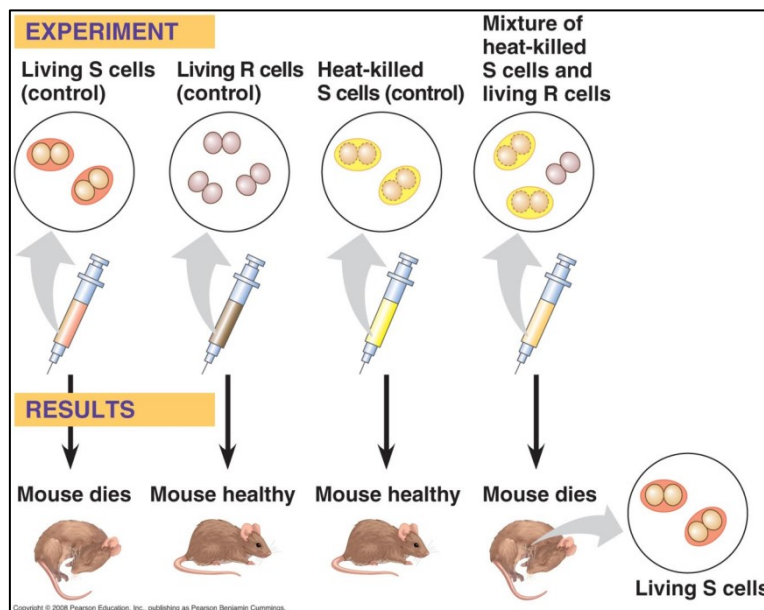
Er kan dus gesteld worden dat wat er genotypisch niet in zit, er fenotypisch nooit kan uitkomen.

3.4.1. DNA als drager van de genetische informatie.

De eigenschappen van een levend wezen berusten op de erfelijke aanleg ervan. Daarom moeten de genen op de chromosomen aanwijzingen, inlichtingen bevatten voor het tot stand komen van deze eigenschappen. Als stoffelijke drager van deze eigenschappen komen alleen maar de eiwitten en de nucleïnezuren in aanmerking³. Tot rond 1950 dachten de meeste onderzoekers dat de genetische informatie bevat lag in de structuur van eiwitten. Twee klassiek geworden experimenten toonden echter duidelijk aan dat DNA het erfelijk materiaal is. Deze twee experimenten kunnen aangeduid worden met de termen transformatie en bacteriofageninfectie.

3.4.1.1. Transformatie.

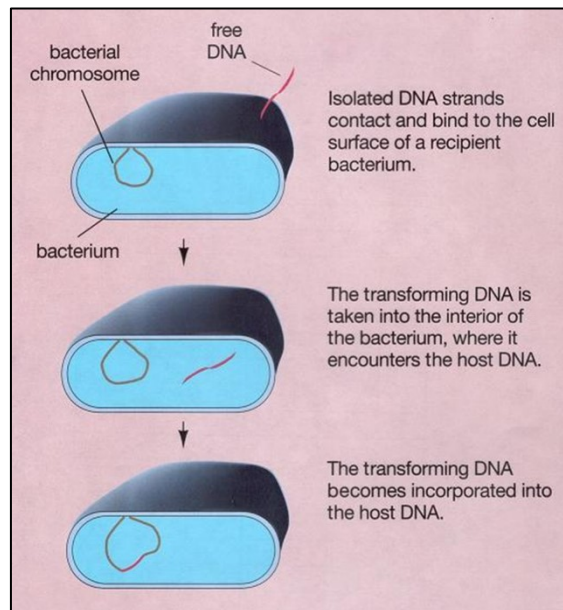
Van de bacterie *Diplococcus pneumoniae* is de pathogene S-vorm gekend (S = smooth = met kapsel). Wanneer nu een proefdier ingespoten wordt met een niet-pathogene vorm nl. de R-vorm, dan vertoont dit dier ook geen ziekteverschijnselen. Door GRIFFITH werd in 1928 aangetoond dat er wel ziektesymptomen optreden wanneer niet-pathogene bacteriën samen met een dode pathogene cultuur (gesteriliseerd bij hoge temperatuur) ingespoten wordt. Uit dit zieke proefdier kan er een pathogene S-vorm geïsoleerd worden. De R-stam wordt dus door iets uit de dode S-stam getransformeerd in een pathogene S-vorm.



Door AVERY werd in 1944 aangetoond dat de stof die verantwoordelijk is voor de transformatie van de R-vorm het DNA is. Uit de S-vorm werd er zuiver DNA geïsoleerd en gevoegd bij levende bacteriën van de R-vorm. Enkele bacteriën van deze R-stam worden getransformeerd in S-bacteriën en alle nakomelingen hiervan hebben de S-vorm. Indien het

³ Het was de onderzoeker MORGAN die tot deze conclusie kwam na experimenten op de *Drosophila* of fruitvlieg in het begin van deze eeuw (zie ook verder in deze cursus).

DNA behandeld werd met DNase trad er geen transformatie op. Uit dit alles kan er geconcludeerd worden dat het DNA verantwoordelijk is voor de transformatie.

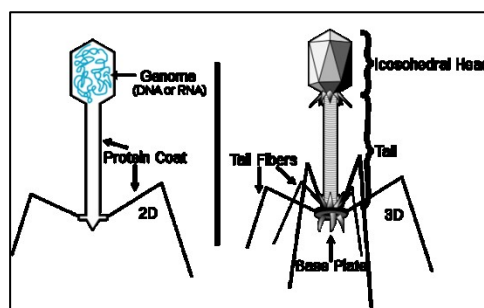


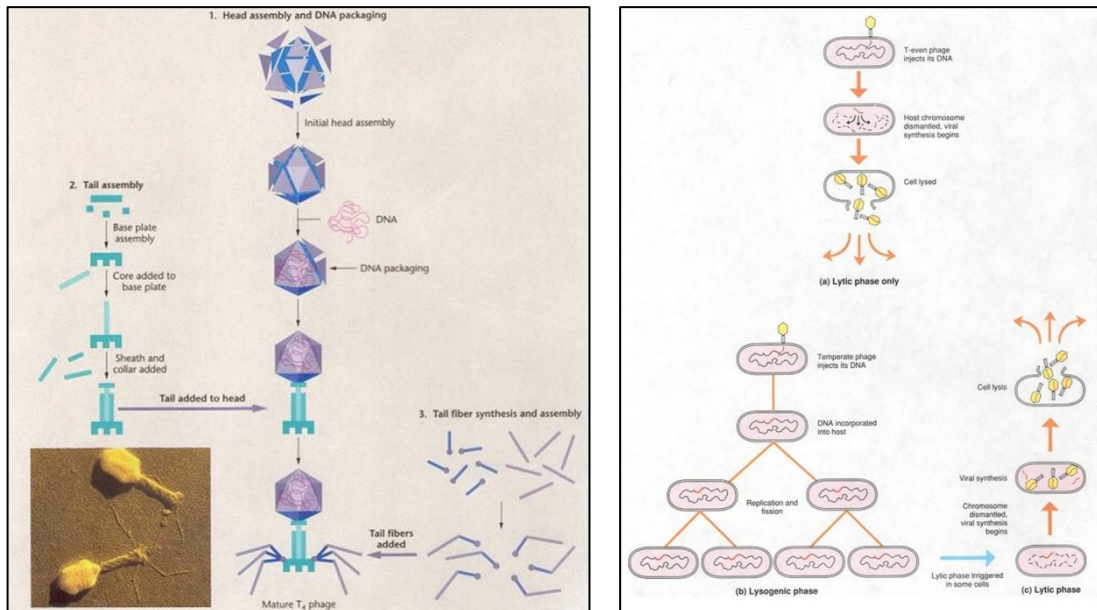
Een kenmerk van een organisme werd dus gerealiseerd in een ander organisme door de overdracht van DNA uit het eerste in het tweede. Dit kenmerk wordt bestendig in de opeenvolgende generaties. Het blijkt dus duidelijk dat het overgedragen DNA verantwoordelijk is voor dit kenmerk m.a.w. het erfelijk materiaal is.

Bij de bacteriesoorten waar transformatie mogelijk is zijn alle kenmerken vatbaar voor transformatie.

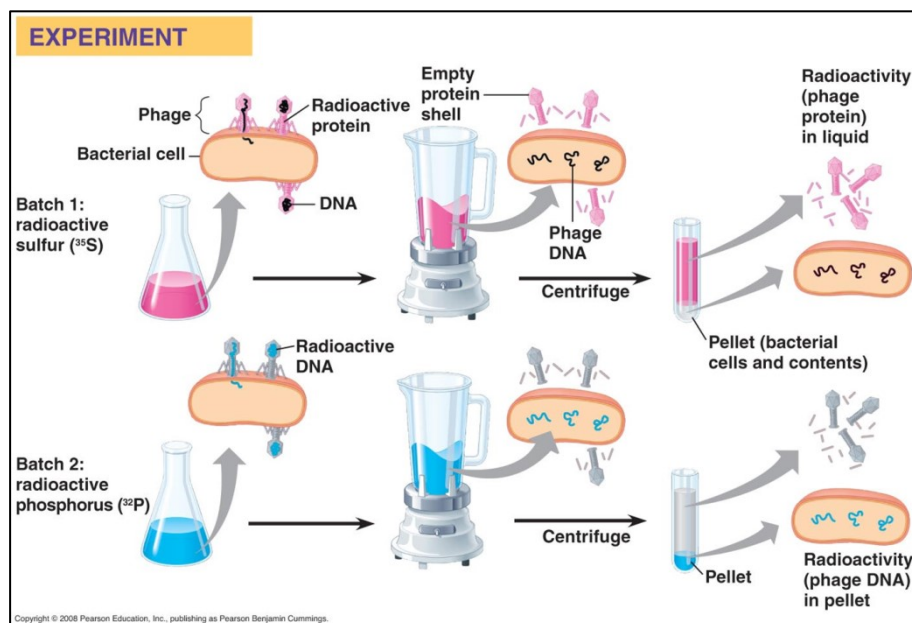
3.4.1.2. Bacteriofagen-infectie.

Bacteriofagen (bacteriënvirussen) bestaan enkel uit nucleïnezuren en proteïnen. Bij sommige (b.v. T-fagen) zit het DNA als een opgerolde draad in een kop, omgeven door een proteïnenmantel. De staart is een holle proteïnen cilinder.





In de infectiefase gaat het virus zich met de staart op b.v. een *E. coli* vestigen. Het virus-DNA dringt door de holle staartcilinder en de bacteriewand de bacterie binnen. Dan begint de vegetatieve fase. Het virus-DNA vermenigvuldigt binnen de bacterie gebruik makend van de bouwstenen die normaal bestemd waren voor de synthese van het bacterieel DNA. Dit laatste wordt afgebroken. De eiwitsynthese in de bacterie zal nu ook een ander doel krijgen nl. het aanmaken van de proteïnen die nodig zijn om nieuwe virussen te bouwen. Aldus worden er nieuwe individuen gevormd en na ± 20 min. zal de celwand openbreken en er een honderdtal virussen vrijkomen om evenveel nieuwe gastheren te infecteren.



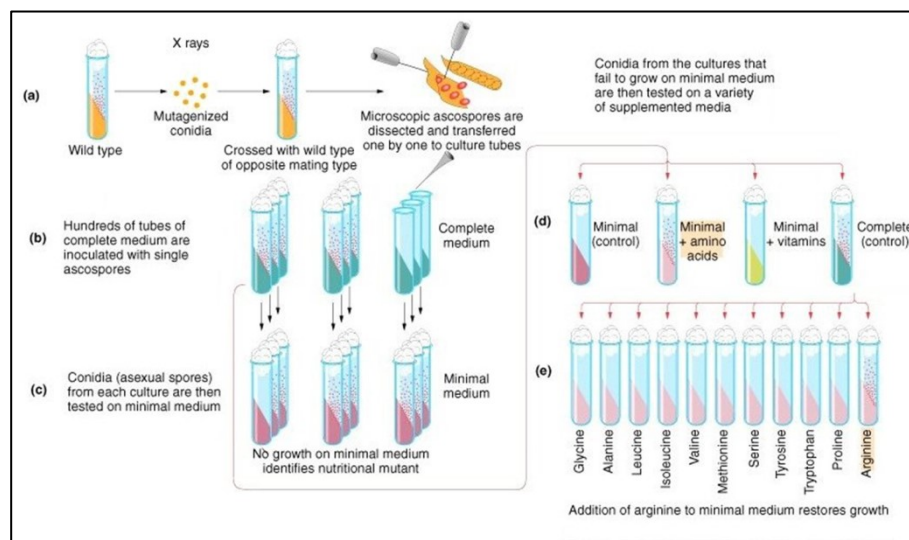
Als bewijs is het nu belangrijk te kunnen aantonen dat enkel het virus-DNA opgenomen wordt en niet de proteïnen. Dat dus het DNA zowel de informatie bevat om DNA en proteïnen aan te maken. In 1952 werd door Alfred Day Hershey en Martha Chase aangetoond dat alleen het DNA binnendringt in de bacterie. Hiertoe werden bacteriën

geïnficeerd met fagen terwijl radioactief P en S in het voedingsmilieu aanwezig waren. De fagen die na bacteriolyse vrijkomen zijn met radioactief P gemerkt in hun DNA en met radioactief S in hun proteïnen. Dergelijke dubbel-gemerkt fagen worden nu ingezet voor de infectie van bacteriën in een niet-radioactief milieu. Na infectie worden de bacteriën ontleed op radioactieve stoffen. Er blijkt enkel radioactief P te ontdekken. Dit wijst erop dat enkel het DNA is binnengedrongen.

3.4.2. De realisering van de genetische informatie.

De eenheid van genetische informatie is het gen. Oorspronkelijk werd een gen gedefinieerd als een erfelijkheidsfactor die instaat voor een bepaald waarneembaar kenmerk.

Een eerste inzicht in het werkingsmechanisme van de genen werd bekomen door de experimenten van George Wells Beadle en Edward Lawrie Tatum (1941). Na het behandelen van *Neurospora* met X-stralen of U.V.-stralen bleken sommige organismen niet meer te kunnen groeien op een minimaal medium. Deze mutanten konden enkel groeien na toevoeging van een bepaalde stof b.v. een aminozuur of een vitamine. Dit betekende dat na de mutatie het organisme dit aminozuur of vitamine niet meer kon synthetiseren.



Beadle en Tatum formuleerden de één gen = één enzym hypothese volgens welke ieder gen zou instaan voor de synthese van een enzym. Ondertussen is echter door meerdere onderzoeken aangetoond dat vele enzymen samengesteld zijn uit meerdere polypeptideketens. Ook wordt de synthese van meerdere niet-enzymatische proteïnen door genen bepaald.

Daarom is het ook beter om te stellen dat één gen = één polypeptide. D.w.z. dat een gen een gedeelte van een DNA-molecule is die de sequentie van een polypeptideketen bepaalt. Daarbij zijn er ook nog genen die overgeschreven worden maar niet vertaald in proteïnen, zoals de genen voor ribosomaal en transfer-RNA.

Reeds zeer vroeg werd het duidelijk dat DNA niet direct instaat voor de synthese van proteïnen. De nucleotidesequentie wordt eerst “overgeschreven” in boodschapper of messenger-RNA. Met behulp van ribosomen en t-RNA wordt de nucleotidesequentie “vertaald” in een aminozuresequentie en dus in een polypeptide. Dit wordt de translatie genoemd.

3.4.3. Mutaties.

Zoals reeds hoger aangehaald kunnen mutaties gedefinieerd worden als plots optredende veranderingen in het genotype. Met mutaties wordt er meestal een genmutatie bedoeld d.w.z. een verandering in de structuur van een gen, die een functiewijziging of een verlies van de activiteit tot gevolg heeft.

Sommige mutaties zijn echter te wijten aan een verandering in chromosoomstructuur nl. een verlies, een verdubbeling of een omkering van een chromosoomstuk dat vaak meerdere genen bevat. Bij eukaryoten kan een verandering van het chromosoomaantal eveneens aan de basis liggen van mutaties (zie later in de cursus).

Mutaties zijn zeer belangrijk voor de geneticus. Een gen kan namelijk slechts bestudeerd worden naar functie en localisatie indien de gewijzigde of gemuteerde vorm ervan gekend is. Het oorspronkelijke type wordt het wild-type genoemd en de variëteit de allelen. Er kunnen meerdere varianten van een gen gekend zijn: multiple allelie b.v. de bloedgroepen (zie later in de cursus).

3.4.3.1. Mutaties bij bacteriën.

Waar bij hogere organismen hoofdzakelijk mutaties gekend zijn die morfologische veranderingen tot gevolg hebben, worden bij bacteriën vooral biochemische mutanten gebruikt, die meestal behoren tot de volgende groepen:

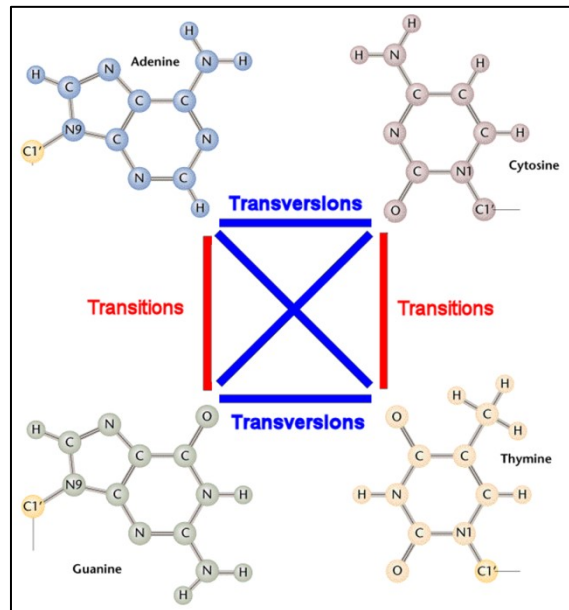
Auxotrofen	Het vermogen om een bepaalde stof zelf te synthetiseren is verloren gegaan.
Resistente tegen antibiotica	Enkele bacteriën kunnen overleven indien een kolonie behandeld werd met een antibiotica.
Resistente tegen fagen	Een bacteriofaag kan zich niet meer vastzetten op de celwand daar deze door mutatie gewijzigd is.
Allerlei	Fout in het regulatiesysteem, temperatuurgevoelige mutaties, ...

3.4.3.2. Oorsprong van mutaties.

Genmutaties zijn toe te schrijven aan basewijzigingen in het DNA die als volgt kunnen geklasseerd worden:

- vervanging van een basenpaar in de DNA-helix komt het meest voor. Deze mutaties kunnen vrij gemakkelijk terug muteren naar het wild-type. Deze mutaties zijn een transitie of een transversie. Bij de eerste wordt er een purine vervangen door een purine of een pyrimidine

door een pyrimidine, bij de tweede wordt een purine vervangen door een pyrimidine of omgekeerd.



- Insertie of deletie betreft het inlassen of verdwijnen van één of meerdere baseparen. Deze mutaties zijn zeldzamer, maar kunnen met bepaalde chemicaliën geïnduceerd worden. Terugmutatie is hier veel minder waarschijnlijk.

Mutaties die in normale ontwikkelingsvoorwaarden plots optreden zijn spontane mutaties. De frequentie van deze spontane mutaties is zeer laag en bovendien verschillend voor de individuele genen.

Over de oorzaak van mutaties is weinig gekend. Wellicht zijn ze te verklaren door fouten bij de DNA replicatie.

Mutaties kunnen geïnduceerd worden door U.V.-stralen, X-stralen, hoogenergetische neutronen en protonen, evenals door een uitgebreid aantal chemische stoffen. Met deze mutagenen kan weliswaar de frequentie van de mutaties in het algemeen verhoogd worden maar niet selectief een bepaald gen tot mutatie gebracht worden.

3.4.4. De biosynthese van eiwitten.

Reeds zeer vroeg werd er gezocht naar de relatie tussen DNA en proteïnen. Het zijn beiden zeer grote moleculen waarvan de aard wordt bepaald door de volgorde van bepaalde elementen in de moleculen. Een DNA-molecule wordt gekenmerkt door een bepaalde volgorde van de nucleotiden, terwijl in de proteïnen de volgorde van de aminozuren bepalend is. Door bepaalde experimenten is gebleken dat de volgorde van de nucleotiden in DNA-moleculen maatgevend is voor de rangschikking der aminozuren in de geproduceerde proteïnen. Dit wordt de genetische code genoemd (zie 3.4.4.1.).

De synthese van de complexe macromoleculen kan dus herleid worden tot een informatieprobleem, nl. hoe worden de aminozuren in een bepaalde volgorde aaneengeregen tot een polypeptide. Toch blijft de eiwitsynthese een complexe reactie omdat er geen affiniteit bestaat tussen aminozuren en nucleïnezuren. Aminozuren kunnen zich niet zomaar in een bepaalde volgorde gaan binden. Dit probleem wordt opgelost door een zogenaamde RNA-matrijs (m-RNA) en het t-RNA. Gezien elk t-RNA specifiek is voor 1 aminozuur, moeten er minstens 20 t-RNA's zijn. In feite bestaan voor bepaalde aminozuren twee of meer verschillende t-RNA's.

3.4.4.1. De genetische code.

Er zijn 20 verschillende aminozuurmoleculen. Het is natuurlijk onmogelijk dat de 4 verschillende basen in staat zijn om deze 20 aminozuren een bepaalde rangschikking te geven in het eiwitmolecuul. Zelfs indien er uitgegaan wordt van doubletten (twee basen voor 1 aminozuur), kunnen er maximaal maar 16 aminozuren gecodeerd worden. Indien de codering verloopt via tripletten, dan zijn wel alle 20 aminozuren te coderen.

Aantal basen voor 1 aminozuur	Maximaal aantal aminozuren te coderen.	Mogelijk
1 base	$4^1 = 4$	Neen
doubletten	$4^2 = 16$	Neen
tripletten	$4^3 = 64$	Ja

Met behulp van de vier basen zijn 64 tripletten mogelijk. Na verschillende experimenten kon het volgende genetische woordenboek samengesteld worden.

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G
		Third letter				

Als bewijs dat het wel degelijk een basentriplet is dat de code bepaalt kan hier het voorbeeld van de rastermutaties gegeven worden.

Het eiwit X wordt bepaald door de volgende codefrequentie:

... CAU G*CG GAG GUU UAC GCU ...

Onderstel dat door een gemanipuleerde mutatie er 1 base kan verwijderd worden nl. G*. De frequentie ziet er dan als volgt uit:

... CAU CGG AGG* UUU ACG CU. ...

Dit zal vertaald worden in een eiwit X₁ dat totaal zal verschillen van eiwit X. Een tweede en derde mutatie leveren respectievelijk de volgende frequenties op die op hun beurt de eiwitten X₂ en X₃ zullen opleveren.

...CAU CGG AGU UU*A CGC U.. ...

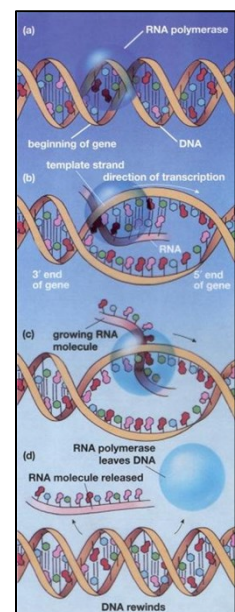
...CAU CGG AGU UAC GCU ...

Het eiwit X₂ zal eveneens sterk verschillen van het oorspronkelijk eiwit X. Eiwit X₃ integendeel zal slechts op twee plaatsen een ander aminozuur hebben en ook 1 aminozuur minder. De rest van de keten is echter totaal onveranderd.

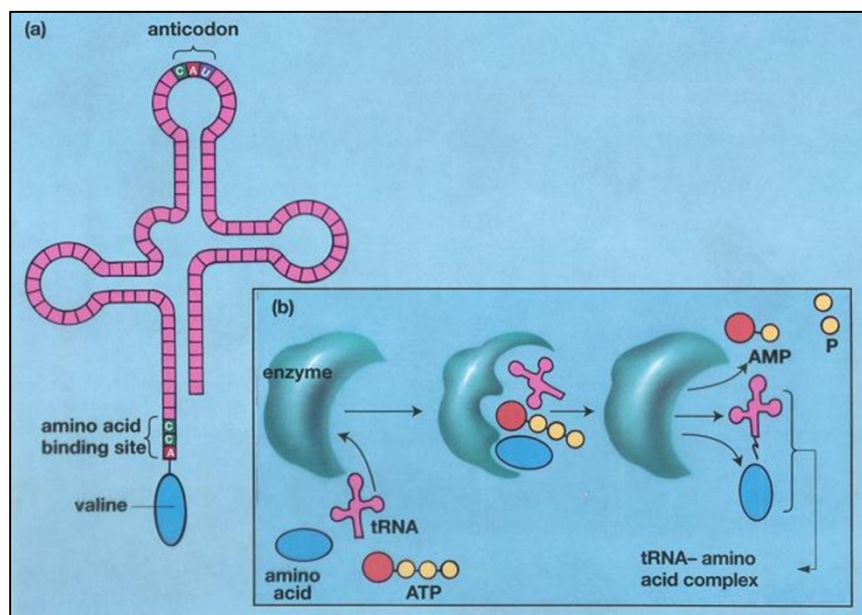
3.4.4.2. De proteïensynthese.

In de proteïensynthese kunnen verschillende stappen onderscheiden worden.

- Transcriptie: De genetische informatie moet doorgegeven worden. Dit gebeurt niet onder de vorm van DNA maar wel onder de vorm van RNA. Het DNA dient als "blauwdruk" voor de synthese van RNA. Een RNA-molecule is te beschouwen als een complementaire keten van een DNA-polynucleotideketen, met die restrictie dat tegenover de base A geen base T maar een base U staat. In tegenstelling met een DNA-molecule bestaat een RNA-molecule uit één streng en is de pentose ribose i.p.v. desoxyribose. Dit gevormde RNA is het boodschapper RNA (b-RNA) of messenger RNA (m-RNA).

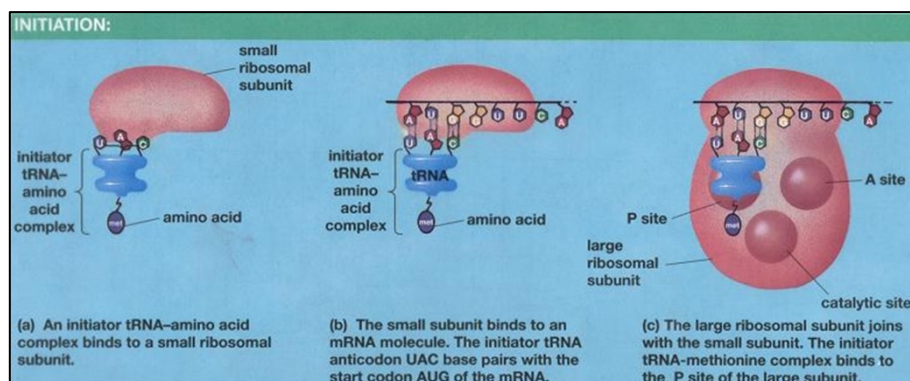


- Activatie van de aminozuren: Een t-RNA dat eveneens gecodeerd werd door het DNA, draagt een bepaald triplet. Ieder t-RNA neemt een specifiek aminozuur op dat als het ware hoort bij het triplet. De binding van een aminozuur aan een specifiek t-RNA gebeurt onder de invloed van enzymen. Ieder van deze 20 enzymen bezit een bindingsplaats voor ATP en daarenboven twee specifieke bindingsplaatsen respectievelijk voor een aminozuur en voor het t-RNA. Het aminozuur wordt gedragen op het uiteinde van het t-RNA-klaverblad. Alle t-RNA-moleculen hebben in één van de lussen een sequentie van drie basen die complementair is aan een bepaald codon (dit is een triplet op het m-RNA). Deze sequentie op het t-RNA wordt het anticodon genoemd. Zo draagt het t-RNA met triplet GUA het aminozuur histidine.



- Opbouw van de polypeptiden:

-- De kleine subeenheid van een ribosoom gaat zich vestigen op het m-RNA. De bevestiging gebeurt op het eerste codon. Dit codon wordt het startcodon genoemd en is steeds AUG. Uit bovenstaande tabel blijkt dit de code te zijn voor het aminozuur methionine.

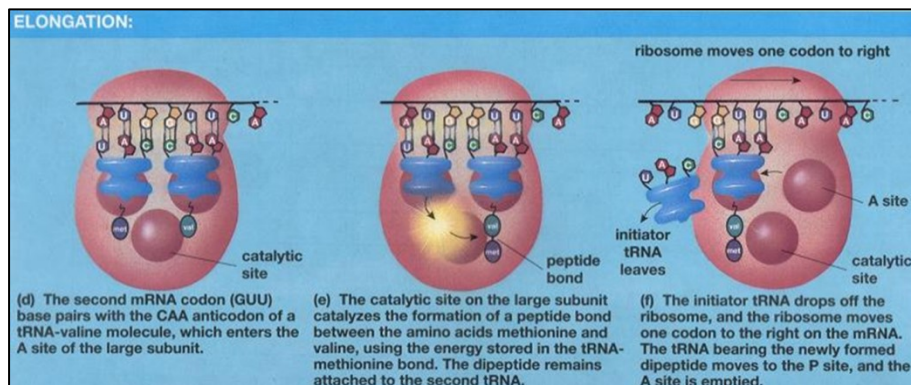


-- Het methionine-t-RNA-complex gaat zich vervolgens vestigen op het codon via zijn anticodon. Deze binding gebeurt op de P-plaats van het ribosoom. Op de vrije aminogroep van het methionine is er een formylgroep ($-\text{CH}=\text{O}$) gebonden. Dit is noodzakelijk opdat in de

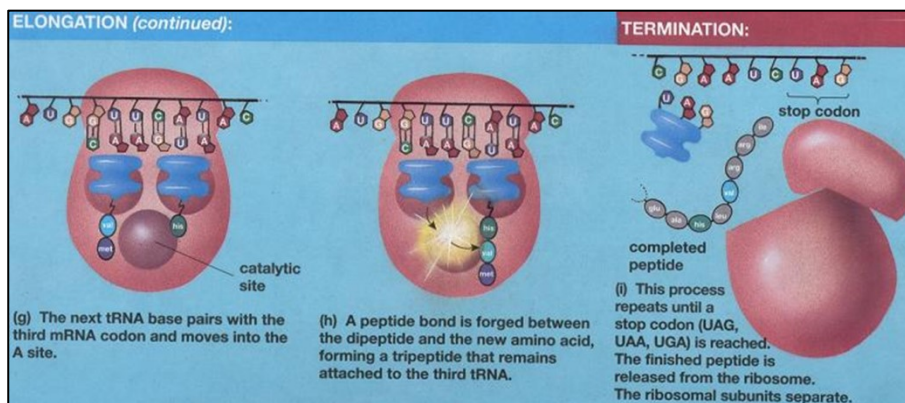
volgende stappen wel degelijk de carbonylgroep van het methionine met de aminogroep van het tweede aminozuur een peptidebinding zou aangaan en niet omgekeerd.

-- Vervolgens bindt de grote subeenheid van het ribosoom zich op de kleine subeenheid. Het ribosoom is aldus compleet. De aflezing van het m-RNA kan beginnen.

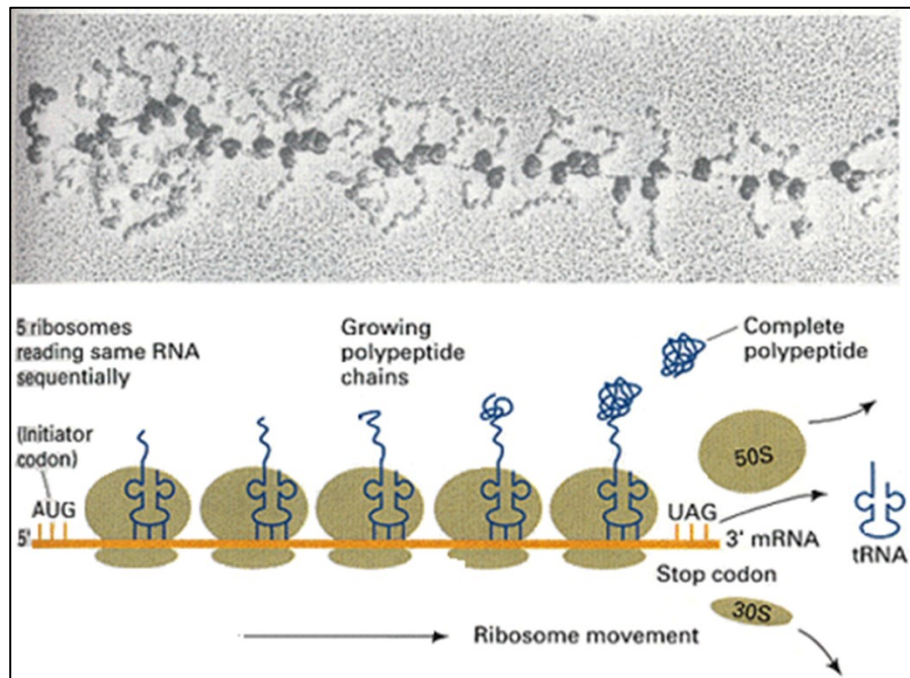
-- Het passende aminoacyl-t-RNA vestigt zich op het tweede codon op de A-plaats. De peptidebinding tussen de carbonylgroep van het eerste aminozuur en de aminogroep van het tweede aminozuur komt tot stand en het eerste aminozuur laat het t-RNA los. Deze overgang van RNA naar eiwit is de translatie.



-- Het ribosoom gaat verschuiven zodat het eerste t-RNA los komt van het ribosoom, het tweede t-RNA met de twee aminozuren op de P-plaats (P van Peptideketen) komt en een derde codon zich binnen het ribosoom bevindt op de A-plaats (A van Aminozuur). Een derde t-RNA kan aldus een derde aminozuur aanbrengen dat vervolgens een peptidebinding zal vormen met het tweede aminozuur, waarna het ribosoom weer doorschuift.



-- deze cyclus gaat door tot er een stopcodon in het ribosoom verschijnt. Op die plaats komt de polypeptideketen vrij. Tijdens de vorming op het ribosoom kan reeds de driedimensionale vorm van de polypeptideketen gevormd worden. Bij actieve eiwitsynthese zijn de ribosomen geaggregeerd in polysomen. Dit duidt erop dat er meerdere ribosomen terzelfder tijd op het m-RNA actief zijn. Identieke polypeptideketens worden dus tegelijkertijd gevormd.



m-RNA kan ook polycistronisch zijn d.w.z. dat de informatie voor verschillende polypeptideketens op één streng m-RNA gelegen zijn, en er dus verschillende eiwitten tegelijkertijd gevormd worden.

3.4.4.3. Enkele opmerkingen.

- Volgens de huidige beschikbare gegevens blijkt de code, ontcijferd voor *E. coli*, universeel te zijn. Dit betekent dat alle organismen dezelfde code voor eiwitsynthese bezitten.

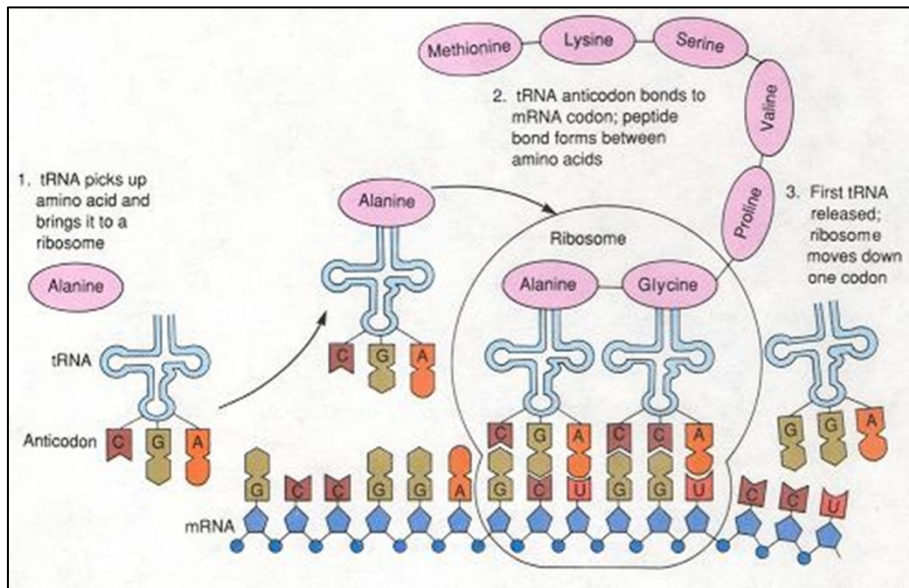
- Het startcodon voor de polypeptideketen is AUG dat codeert voor methionine of beter formylmethionine. Niet alle proteïnen hebben als eerste aminozuur methionine. Daarom wordt dit eerste en soms meerdere aminozuren meestal afgesplitst.

- Het startcodon bepaalt de binding van het m-RNA met de kleine subeenheid van het ribosoom. Het bepaalt eveneens hoe het m-RNA afgelezen wordt. Bij faseverschuiving worden nl. verkeerde tripletten afgelezen.

- Onder voorbehoud van een paar uitzonderingen bestaan er twee of meer codons voor een bepaald aminozuur. De code is gedegenerieerd. Deze degeneratie is niet willekeurig: d.w.z. er is een bepaalde functionele orde in de betekenis van de verschillende codewoorden.

De twee eerste basen van het codon zijn meestal specifiek voor het aminozuur, terwijl de derde base U of C kan zijn, ofwel A of G (uitgezonderd Try en Met), ofwel U,C,A of G (b.v. Ser, Val, Ala, Gly). De twee eerste codes zijn determinerend.

Er bestaat eveneens een relatie tussen de codewoorden en de R-groepen van de aminozuren. Zo behoren alle codons waarvan de tweede letter U is, tot aminozuren met een hydrofobe R-groep (b.v. Fen, Leu, Ileu, Val). Alanine en glycine, twee gelijkaardige aminozuren, hebben de letter G als eerste letter in hun codons.



3.4.4.4. Mutaties en de genetische code.

Het is in vele gevallen mogelijk het gewijzigde proteïne van een mutant te isoleren en aminozuursequentie te vergelijken met deze van het wild-type. Er werd bijna steeds vastgesteld dat er slechts één aminozuur vervangen is door een ander. B.v. hemoglobine en hemoglobine S⁴ verschillen voor hun code slechts op één plaats nl. de code voor aminozuur 6 is veranderd in GUA i.p.v. GAA.

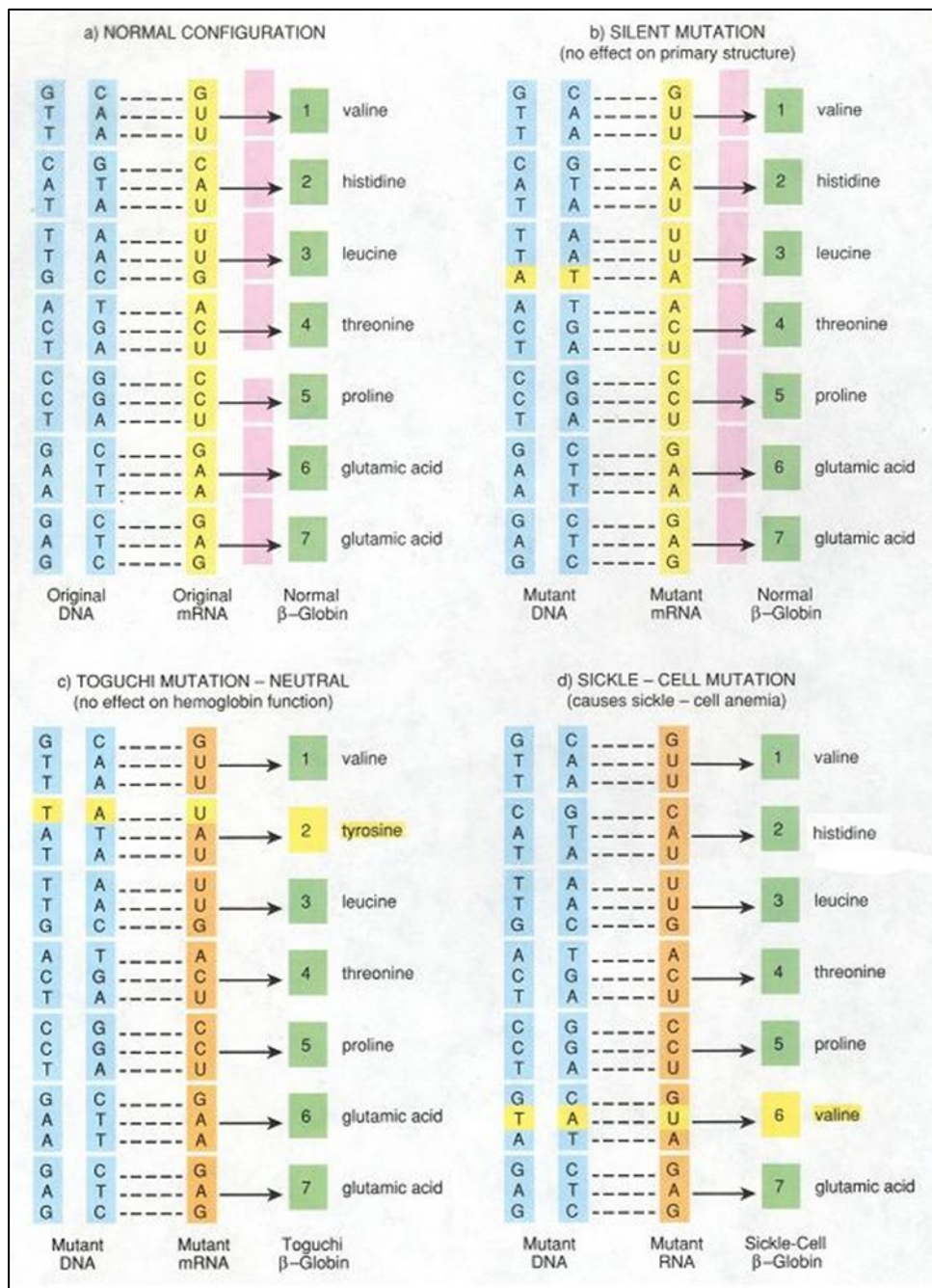
De degeneratie van de code beschermt het organisme ook gedeeltelijk tegen de gevolgen van mutaties.

- Zonder degeneratie zouden slechts 20 tripletten coderen voor een aminozuur. De andere 44 zouden nonsens opleveren. Een mutatie zou dus 2 op 3 x aanleiding geven tot een stopcodon.

- Transitie van A naar G en omgekeerd en van C naar T en omgekeerd blijven meestal zonder effect als zij optreden in de derde positie van de code. Dit zijn de stille mutaties.

- De verwantschap tussen de codons maakt dat aminozuren vaker vervangen worden door verwante aminozuren. Daarmee wordt bedoeld dat polaire door polaire en apolaire door apolaire aminozuren vervangen worden. De structuurwijziging voor het eiwit is dan ook meestal minimaal.

⁴ Deze mutatie heeft aanleiding tot sikkelcelanemie. D.w.z. dat de rode bloedlichaampjes door de witte bloedlichaampjes aangetast worden. Deze mutatie heeft wel als voordeel dat de personen in kwestie beter bestand zijn tegen malaria (zie later in de cursus) indien de mutatie heterozygoot is. Bij homozygote mutatie krijgen de dragers een bloedziekte die er voor zorgt dat de bloedvaten verstopt geraken hetgeen bij mannelijke dragers kan leiden tot o.a. priapisme.



3.5. Algemene besluiten betreffende de prokaryoten.

3.5.1. De chemische samenstelling van prokaryotisch organisme.

Een prokaryotisch organisme blijkt voor $\pm 3/4$ uit water te bestaan en slechts voor $\pm 1/4$ uit D.S. Deze D.S. bestaat op zijn beurt voor 50% uit proteïnen. De rest zijn hoofdzakelijk koolhydraten, lipiden en aminozuren.

Het aantal proteïnen in een organisme kan benaderend berekend worden op de volgende manier. Het dubbel circulair DNA heeft een lengte van $\pm 1,2 \text{ mm} = 1,2 \cdot 10^6 \text{ nm}$. De baseparen liggen op $0,34 \text{ nm}$ van elkaar. Dit betekent dat er $\pm 3,5 \cdot 10^6$ baseparen in het DNA aanwezig

zijn. Een proteïne heeft een gemiddeld M.M. van 40.000 en een aminozuur van 120. D.w.z. dat er ± 333 aminozuren per proteïne zijn. Nu heeft 1 aminozuur een tripletcode nodig, of 333 aminozuren (= 333 tripletten) hebben $999 \approx 1.000$ basen nodig. Het DNA bevat 3,5 106 basen, hetgeen betekent dat er 3.500 proteïnen kunnen gevormd worden. Niet alle informatie op het DNA dient om proteïnen te vormen. Daaruit kan besloten worden dat ± 2.500 (70%) proteïnen zullen gevormd worden. Hiervan zijn er ± 1.500 of 60% gekend. Dus $\pm 60\%$ van de biochemische reacties is gekend. De 100% is dus haalbaar. Er dient opgemerkt te worden dat het kennen van een reactie niet inhoudt dat ook de regulatie van de reactie gekend is.

Component	% tot. Gewicht	Gem. MM	$\pm$ aantal/cel	#soorten moleculen
H ₂ O	70	18	$4 \cdot 10^{10}$	1
Anorg. Ionen	1	40	$2,5 \cdot 10^8$	20
Koolhydraten	3	150	$2 \cdot 10^8$	200
Aminozuren	0,4	120	$3 \cdot 10^7$	100
Nucleotiden	0,4	300	$1,2 \cdot 10^7$	200
Lipiden	2	750	$2,5 \cdot 10^7$	50
Kleine moleculen	0,2	150	$1,5 \cdot 10^7$	200
Proteïnen	15	40.000	10^6	2.000 à 3.000
DNA	1	$2,5 \cdot 10^9$	4	1
RNA	6			
r-RNA 16S		550.000	$3 \cdot 10^4$	1
r-RNA 23S		1.100.000	$3 \cdot 10^4$	1
r-RNA 5S		30.000	$3 \cdot 10^4$	1
t-RNA		25.000	$4 \cdot 10^5$	40
m-RNA		1.000.000	10^3	1.000