

*(Cover picture adapted from Gary J. Pielak PNAS 2005)*

# BASISCONCEPTEN van de MOLECULAIRE BIOLOGIE

Sarah Gerlo & Bert Callewaert

## Contents

1	Grondleggers van de moleculaire biologie. ....	4
1.1	Inzichten in de natuur van het erfelijk materiaal. ....	4
1.1.1	De wetten van Mendel. ....	4
1.1.2	Chromosomen zijn de dragers van erfelijke kenmerken. ....	6
1.1.3	DNA is het "transforming principle". ....	10
1.2	Een model voor de structuur van DNA. ....	13
1.3	Het centrale dogma. ....	15
2	De structuur van DNA. ....	17
2.1	De primaire structuur van DNA. ....	17
2.2	De secundaire structuur van DNA. ....	19
2.3	Denaturatie en renaturatie. ....	22
2.4	De tertiaire structuur van DNA. ....	26
3	Genoom organisatie en evolutie. ....	27
3.1	Vele genoomsequenties zijn ontrafeld. ....	27
3.2	Variaties in genoomorganisatie. ....	28
3.3	Eukaryote genomen bevatten veel repetitief DNA. ....	32
3.4	Extrachromosomaal DNA en horizontale gentransfer. ....	34
3.5	Genenclusters. ....	40
3.6	Het menselijk genoom project. ....	43
3.7	Polymorfisme binnen het menselijk genoom. ....	45
3.8	Genoomsequenties van hominiden. ....	48
3.9	Condensatie van het genoom. ....	49
4	DNA replicatie. ....	54
4.1	DNA replicatie is semi-conservatief. ....	54
4.2	DNA replicatie gebeurt meestal bidirectioneel. ....	55
4.3	DNA polymerasen catalyseren DNA synthese van 5' naar 3'. ....	59
4.4	Multi-eiwit moleculaire machines verzorgen DNA replicatie. ....	60
4.5	Topo-isomerasen relaxeren 'supercoiled' DNA. ....	64
4.6	Specifieke kenmerken van eukaryote DNA replicatie. ....	66
4.7	Laboratoriumtechnieken gebaseerd op DNA replicatie. ....	68
4.7.1	Sanger sequencering. ....	68
4.7.2	De polymerase ketting reactie (Polymerase chain reaction; PCR). ....	70
5	DNA schade en herstelmechanismen. ....	77

5.1	Mutaties en DNA schade.....	77
5.2	Mutaties op nucleotide niveau. ....	78
5.3	Structurele beschadiging van de dubbele helix. ....	80
5.4	DNA herstelmechanismen .....	82
5.4.1	‘Mismatch-repair’ .....	82
5.4.2	‘Base excision repair’ .....	83
5.4.3	‘Nucleotide excision repair’ .....	84
5.4.4	‘Non-homologous End Joining’ (NHEJ).....	85
5.4.5	Homologe recombinatie.....	86
5.4.6	Geadapteerd CRISPR_CAS9 systeem als toolbox om gericht genomisch varianten te introduceren. ....	88
6	Het ontstaan van genetische variatie. ....	93
6.1	Puntmutaties.....	93
6.2	Genherschikkingen.....	94
6.2.1	Transposons.....	94
6.2.2	Retrotransposons en retrovirussen. ....	96
6.2.3	Meiose.....	100
6.2.4	Homologe recombinatie (bis). ....	101
6.2.5	Antichaamdiversiteit: somatische recombinatie .....	102
6.3	Variaties op chromosoomniveau.....	104
6.4	Variaties op genoom niveau. ....	105
7	Transcriptie en RNA maturatie.....	106
7.1	De structuur van RNA. ....	106
7.2	De boodschapper tussen DNA en eiwit is RNA.....	109
7.3	De basiskenmerken van transcriptie.....	111
7.4	Transcriptie bij prokaryoten.....	112
7.4.1	De promoter. ....	112
7.4.2	Het RNA polymerase.....	114
7.4.3	Regulatie van transcriptie. ....	116
7.4.4	Transcriptie terminatie.....	120
7.5	Transcriptie bij eukaryoten.....	120
7.5.1	Eukaryoten hebben meerdere RNA polymerasen. ....	121
7.5.2	Eukaryote CIS-elementen .....	122
7.5.3	Eukaryote TRANS-factoren.....	124
7.5.4	DNA condensatie en transcriptie regulatie.....	131

7.5.5	Transcriptie door RNA polymerase I en III en mitochondriale transcriptie. ....	136
7.5.6	Transcriptie terminatie. ....	136
7.6	mRNA maturatie.....	137
7.6.1	Basiskenmerken.....	137
7.6.2	5' Capping.....	138
7.6.3	3' Polyadenylatie.....	140
7.6.4	mRNA splicing (RNA sequentie-koppeling).....	141
7.6.5	mRNA editing.....	148
7.6.6	mRNA transport.....	149
7.6.7	Regulatie van mRNA stabiliteit.....	151
7.6.8	RNA interferentie.....	151
7.7	rRNA en tRNA maturatie.....	158
7.7.1	rRNA maturatie.....	158
7.7.2	Maturatie van tRNA. ....	159
8	Eiwitsynthese en eiwitadressering.....	161
8.1	De genetische code gekraakt.....	161
8.2	Het ribosoom. ....	163
8.3	De eiwitsynthese.....	165
8.3.1	tRNAs en aminoacyl-tRNA synthetasen.....	166
8.3.2	Het translatieproces.....	170
8.4	Gereguleerde eiwitafbraak.....	180
8.5	Eiwitadressering.....	183
8.5.1	Sortering van eiwitten aangemaakt op vrije ribosomen.....	185
8.5.2	Sortering via het ER en Golgi.....	188
8.5.3	Endocytose en sortering van opgenomen eiwitten.....	204
8.5.4	Adressering van eiwitten voor lysosomale afbraak.....	208

# 1 Grondleggers van de moleculaire biologie.

---

De intrigerende molecule die aan de basis ligt van de ontwikkeling van de moleculaire biologie is **desoxyribonucleïnezuur** (of kortweg **DNA**). Gedurende lange tijd waren discussies over DNA voorbehouden voor onderonsjes tussen wetenschappers, maar met de bekendmaking van de eerste kladversie van het humane genoom in 2001 werd DNA ook in lekenkringen een populair gespreksonderwerp. DNA is vandaag de dag een geliefkoosd onderwerp in boeken, series en films en nieuwe ontwikkelingen inzake DNA manipulatie vormen een belangrijke ethische uitdaging voor onze moderne maatschappij.

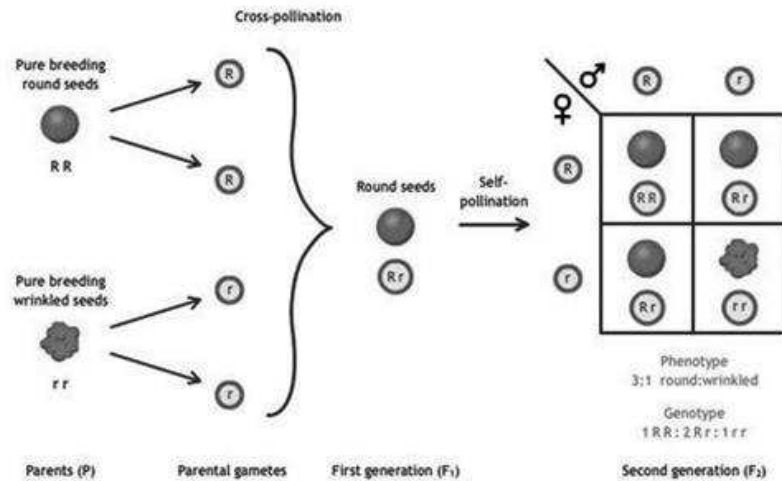

In dit hoofdstuk zullen we trachten een kort overzicht te geven van de belangrijkste mijlpalen in de ontwikkeling van de moleculaire biologie. Dit overzicht is absoluut niet volledig en vele wetenschappers die essentiële bijdragen hebben geleverd, worden hier niet vernoemd.

## 1.1 Inzichten in de natuur van het erfelijk materiaal.

---

### 1.1.1 De wetten van Mendel.

Reeds in de klassieke oudheid werd nagedacht over hoe fysieke kenmerken van generatie op generatie worden doorgegeven en klassieke filosofen, waaronder Aristoteles, bedachten verschillende originele theorieën om uit te leggen waarom kinderen op hun ouders lijken. De link tussen DNA en erfelijkheid werd echter pas gelegd in het midden van de 20ste eeuw en was geïnspireerd op de herontdekking van het botanisch onderzoek van de Tsjechische monnik **Gregor Johann Mendel**. In een Augustijns klooster bestudeerde Mendel erwtenplanten (*Pisum sativum*) om te achterhalen hoe eigenschappen van de ene generatie op de volgende worden doorgegeven. Erwtenplanten doen normaal aan zelfbestuiving. Door de meeldraden (mannelijke voortplantingsorganen) van bepaalde bloemen weg te knippen en de stampers te bestuiven met pollen van andere planten, veroorzaakte Mendel artificiële kruisbestuiving. De ouderplanten (de P-generatie) in Mendel's experimenten waren steeds 'zuivere lijnen', d.w.z. dat alle nakomelingen die door zelfbestuiving werden gevormd, dezelfde karakteristieken hadden als de ouderplanten. De variatie in de kenmerken die Mendel bekeek was steeds discontinu: witte of paarse bloemen, groene of gele erwten, gladde of gerimpelde zaden. Meer continu veranderende karakteristieken (bijv. zaadgewicht) werden genegeerd. Een typische proef bestond erin twee planten met verschillende karakteristieken (vb. gladde of gerimpelde zaden, Fig. 1.1) te kruisen en na te gaan hoe de eerste generatie nakomelingen, de **F<sub>1</sub>-generatie** (F komt van het Latijnse filium/filia: zoon/dochter) er uitziet. Wanneer slechts één kenmerk gevolgd wordt, spreekt men van een **monohybride** kruising. Mendel liet de nakomelingen van de F<sub>1</sub>-generatie bovendien door zelfbestuiving een **F<sub>2</sub>-generatie** vormen.

	Round	Wrinkled
1.	45	12
2.	27	8
3.	24	7
4.	19	16
5.	32	11
6.	26	6
7.	88	24
8.	22	10
9.	28	6
10.	25	7
<b>Total</b>	<b>336</b>	<b>107</b>

Fig. 1.1. Voorbeeld van het resultaat van een monohybride kruising van Mendel. (Boven : <https://www.sciencelearn.org.nz/images/2480-inheritance-of-a-single-trait-in-peas>; Onder: <https://www.biology-pages.info/M/Mendel.html>)

Een kruising van planten met gladde en gerimpelde zaden leverde Mendel in de F<sub>1</sub>-generatie enkel gladde zaden op. Dit resultaat verwierp de hypothese dat de kenmerken van nakomelingen zouden ontstaan door ‘vermenging’ van de kenmerken van de beide ouders, een gangbare erfelijkheidstheorie in die tijd. Er werden immers nooit “matig gerimpelde” zaden gevonden. Wat was er dan gebeurd met de genetische informatie van de gerimpelde zaden in de F<sub>1</sub>-generatie? Ze ging niet verloren, want in de F<sub>2</sub>-generatie doken plots weer gerimpelde zaden op, en wel in een opmerkelijke 3:1 ratio (bij Mendel: 336 ronde : 107 gerimpelde, zie Fig. 1.1.). Mendel redeneerde dat de erfelijke factor voor gerimpelde zaden niet verdween in de F<sub>1</sub>-planten, maar niet tot uiting kwam. Hij noemde de ronde textuur **dominant** en de gerimpelde **recessief**. Hij bekwam gelijkaardige resultaten met 6 andere kenmerken van de erwtenplant.

Op basis van de resultaten die hij vergaarde, formuleerde Mendel zijn drie erfelijkheidswetten:

- 1) **De uniformiteitswet die** stelt dat alle individuen in de eerste generatie nakomelingen van raszuivere (homozygote) ouders uniform zijn en het dominante fenotype vertonen.
- 2) **De splitsingswet of wet der segregatie** die stelt dat bij de vorming van de gameten, de gepaarde erfelijkheidsdeterminanten zich zodanig splitsen (segregeren) dat de kans dat een gameet één van beide determinanten bevat dezelfde is.
- 3) **De onafhankelijkheidswet** die stelt dat bij de vorming van gameten de segregatie van beide leden van een paar van erfelijkheidsdeterminanten onafhankelijk is van de segregatie van andere paren van erfelijkheidsdeterminanten.

Hoewel Mendel de term **gen** nooit gebruikt heeft, zijn de erfelijkheidsdeterminanten of elementen (origineel in het Duits: 'Zellelemente') die hij beschreef in feite gelijkwaardig aan wat wij vandaag onder genen verstaan.

Mendel publiceerde de resultaten van zijn onderzoek in 1865 in een eerder obscuur tijdschrift. Aanvankelijk zag de wetenschappelijke wereld (inclusief Mendel zelf) het immense belang van de resultaten niet in. Pas een halve eeuw later zouden botanici Hugo de Vries (Nederland), Karl Correns (Duitsland) en Erich Von Tschermak (Oostenrijk) zijn publicatie van onder het stof halen en de principes van Mendel onafhankelijk herontdekken.

### **1.1.2 Chromosomen zijn de dragers van erfelijke kenmerken**

Op het einde van de 19de eeuw nam het microscopisch onderzoek en met name de cytologie een hoge vlucht. Het is in deze tijdsgeschiedenis dat de Duitse anatoom **Walther Flemming** zich toelegde op het ontwikkelen van cytologische kleuringen om de intracellulaire componenten van cellen zichtbaar te maken. Hij ontwikkelde onder andere een kleuring waarmee hij het fibreuze materiaal in de celkern, dat hij **chromatine** (voor kleurbaar materiaal) noemde, kon bestuderen. Op basis van de studie van cellen in verschillende stadia van de celdeling toonde hij voor het eerst het bestaan van **chromosomen** aan en leidde hij de exacte sequentie van chromosombewegingen tijdens de **mitose** af. Hij merkte bovendien op dat de chromosomen tijdens de mitose gesplitst worden en dat de gesplitste chromosomen verdeeld werden over de dochtercellen, een belangrijke doorbraak in het erfelijkheidsonderzoek (Fig. 1.2).

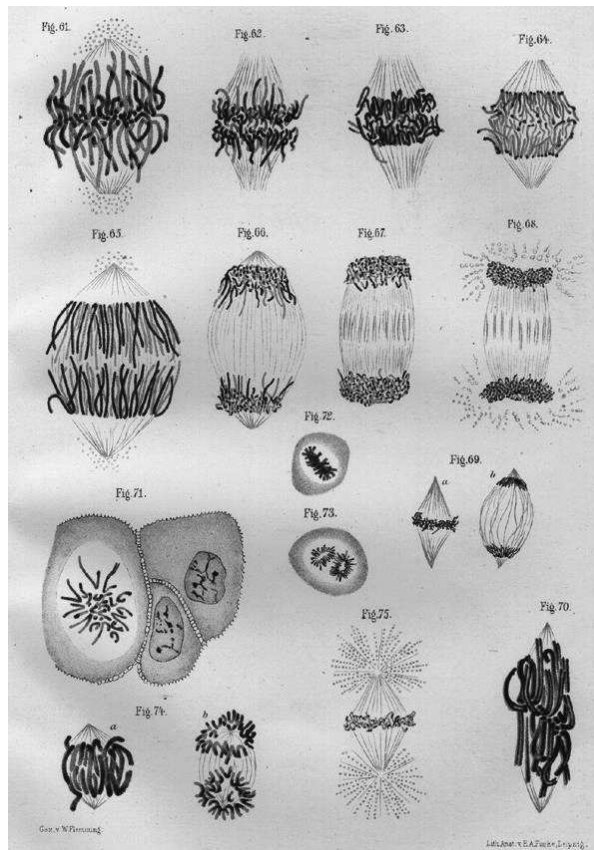


Fig. 1.2. Tekening van de mitose door Walther Flemming (Flemming, W. Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung; F. C. W. Vogel, Leipzig, 1882).

**Theodor Boveri**, een Duitse embryoloog en expert in de cytologie, bouwde verder op het werk van Flemming. Hij gebruikte de spoelworm (*Ascaris megalocephala*) als experimenteel model omdat *Ascaris* embryo's grote cellen hebben en slechts twee paar chromosomen. Boveri ontdekte dat bij de maturatie van de eicellen van de spoelworm het aantal chromosomen van vier naar twee werd gereduceerd en beschreef daarmee voor het eerst de **meiose**. Boveri gebruikte ook de zee-egel als experimenteel model en deed *in vitro* fertilisatie-experimenten waarmee hij aantoonde dat eicellen en zaadcellen een halve set van het aantal chromosomen dat in somatische cellen aanwezig is bezitten (ze zijn **haploïd**). Een volledige chromosomenset (**diploïd**) werd bekomen na de bevruchting. In zijn experimenten merkte Boveri ook op dat afwijking van het normaal aantal chromosomen (te veel of te weinig) aanleiding gaf tot ontwikkelingsdefecten.

Het werk van Boveri werd verfijnd door de Amerikaan **Walter Sutton**, die sprinkhanen (*Brachystola magna*) als modelsysteem gebruikte. Hij toonde aan dat de sprinkhaan 11 paar chromosomen had, die konden onderscheiden worden op basis van hun grootte, en daarnaast één ongepaard chromosoom, dat bepalend is voor het geslacht. Sutton postuleerde dat de chromosomen stabiele structuren zijn, die over generaties heen bewaard blijven, en hij beschreef in detail het gedrag van de verschillende chromosomen doorheen de verschillende stadia van de meiose. De belangrijkste contributie van



Sutton is echter dat hij zich realiseerde dat zijn observaties consistent waren met de bevindingen van Mendel, die recent herontdekt waren, en hij zo de rol van chromosomen in de erfelijkheid aantoonde. Dit wordt geïllustreerd door een extract uit Sutton's baanbrekend artikel uit 1902: *"I may finally call attention to the probability that the association of paternal and maternal chromosomes in pairs and their subsequent separation during the reducing division as indicated above may constitute the physical basis of the Mendelian law of heredity"*.

Sutton merkte ook op dat de positionering van de homologe chromosomen tijdens de metafase volledig willekeurig was en er dus geen paternale en maternale zijde bij de celdeling ontstond. Elk chromosoom gedroeg zich dus onafhankelijk van de andere, wat voor een deel de grote genetische variatie kan verklaren die kenmerkend is voor de geslachtelijke voortplanting. Zo wordt voor elke gameet het aantal mogelijke chromosomale combinaties bepaald door het aantal chromosomen in het organisme. Het verloop van de meiose en hoe deze overeenkomt met de wetten van Mendel (segregatie, onafhankelijke hergroepering) is voorgesteld in Fig. 1.3.

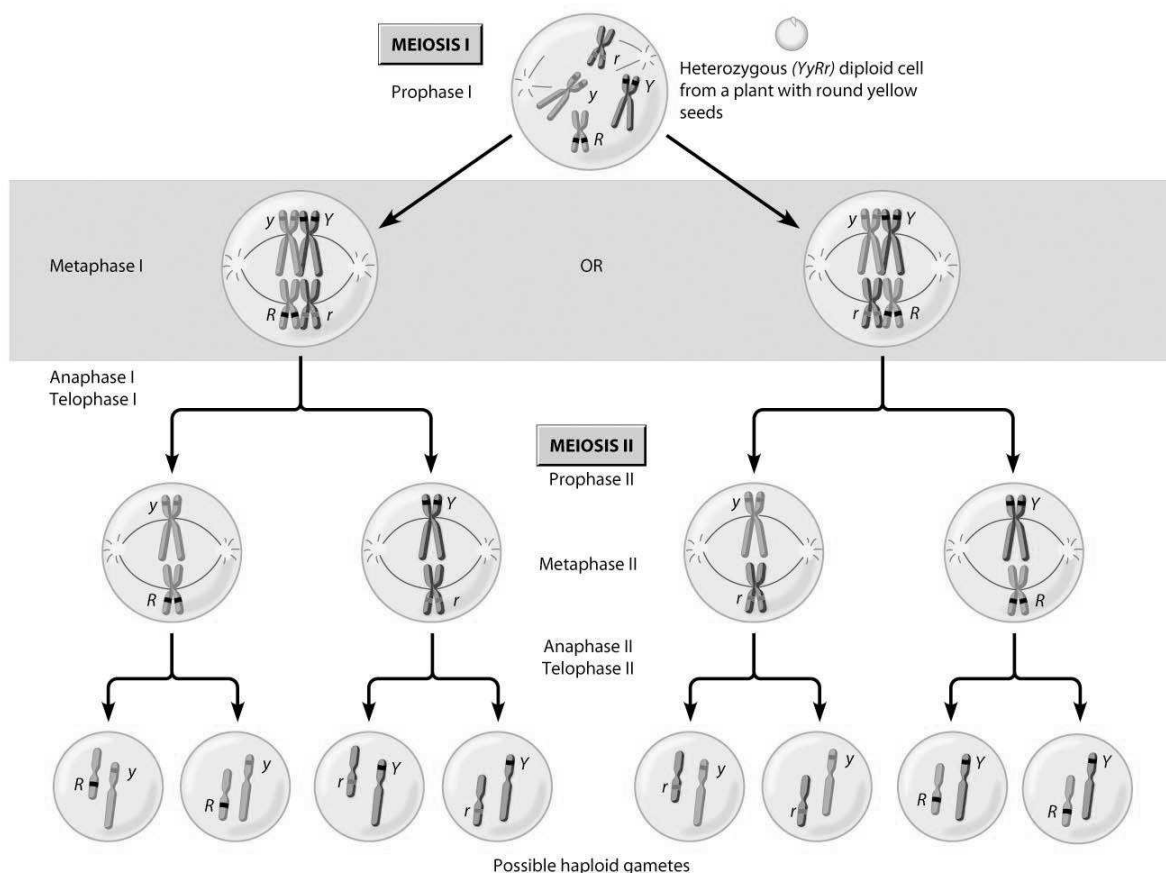


Fig. 1.3. Schematische voorstelling van de meiose. (Pearson Education 2012)

Hoewel de parallellen in het werk van Sutton en Boveri en dat van Mendel eigenlijk te mooi waren om niet waar te zijn, leverden zij geen echt bewijs voor de rol van chromosomen als dragers van de erfelijke informatie. Dit bewijs kwam er echter snel met de experimenten op fruitvliegjes (*Drosophila melanogaster*) van geneticus **Thomas Hunt Morgan**. Aan de basis van Morgan's cruciale experimenten lag de ontdekking van een **mutatie**, die zich uitte in een veranderde oogkleur (wit i.p.v. van 'wild type' rood), en enkel bij mannelijke fruitvliegen voorkwam. Morgan merkte op dat het overervingspatroon van de oogkleur verschilde tussen vrouwelijke en mannelijke fruitvliegjes. De F1-nakomelingen van een witogig mannetje en een roodogig vrouwtje hadden allen rode ogen, wat suggereerde dat rood dominant was. In de F2-generatie vond Morgan de typische 3:1 verhouding, maar merkwaardig genoeg werd de witte oogkleur enkel bij de mannetjes aangetroffen. Alle F2-vrouwtjes en de helft van de F2-mannetjes hadden rode ogen, en de andere helft van de F2-mannetjes had witte ogen. Morgan concludeerde dat het gen voor oogkleur op het X-chromosoom gelegen is. Fruitvliegenvrouwtjes hebben, zoals mensen, twee X-chromosomen; mannetjes slechts één. Omdat het mutante **allel** recessief is, kunnen vrouwtjes slechts witte ogen hebben als ze dat allel op beide chromosomen tegelijkertijd hebben. Dit kon, in het experiment van Morgan, onmogelijk het geval zijn voor de F2-vrouwtjes. Bij mannetjes (XY), daarentegen, wordt de aanwezigheid van één recessief allel niet gecompenseerd door een 'normaal' allel. De overerving van de oogkleur verliep dus volgens hetzelfde patroon als dat van het X chromosoom, waaruit Morgan concludeerde dat het gen voor oogkleur zich op het X chromosoom bevond (zie Fig. 1.4). Met deze experimenten leverde Morgan het eerste onomstotelijke bewijs dat chromosomen de fysische dragers van de erfelijke informatie zijn.

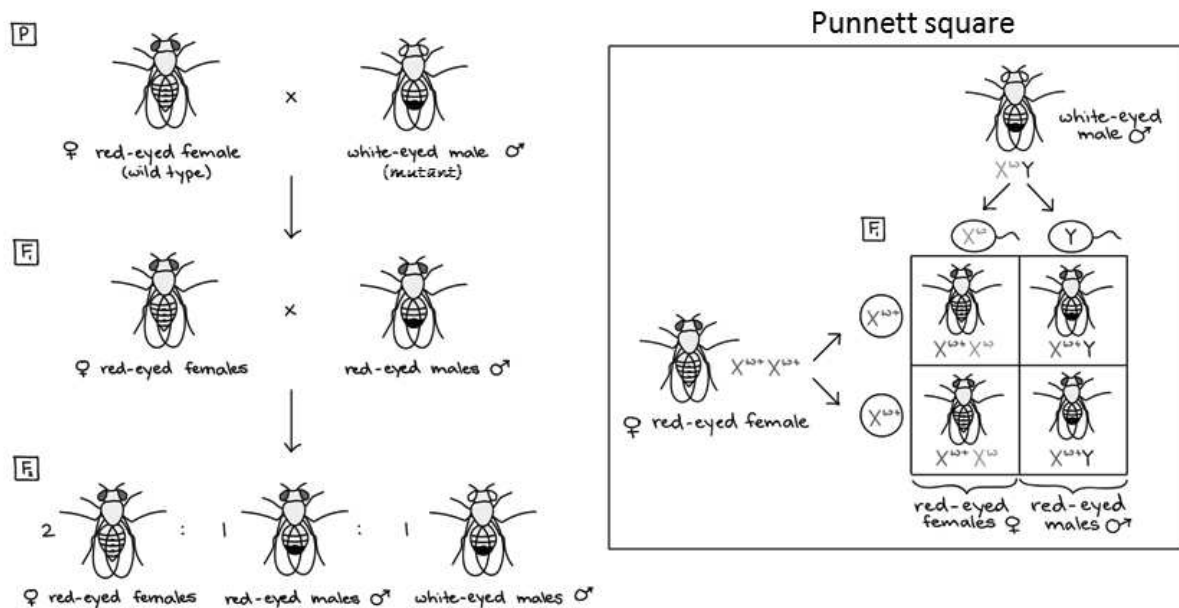
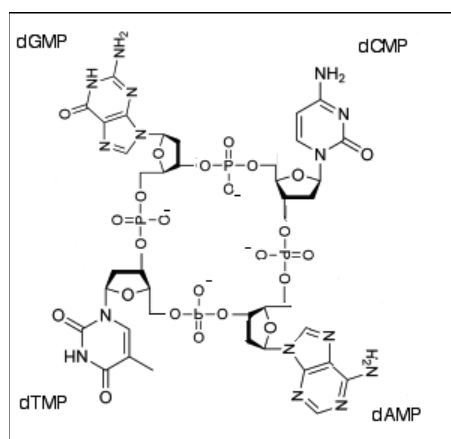


Fig. 1.4. Experimenten van Thomas Hunt Morgan. (<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/heredity/chromosomal-inheritance-ap/a/discovery-of-the-chromosomal-basis-of-inheritance>)

De **theorie van chromosomale overerving** was dus het resultaat van tientallen jaren onderzoek, door verschillende wetenschappers, uit verschillende disciplines. De zaden van deze theorie werden reeds in de jaren 1860 geplant met het werk van Gregor Mendel. Pas vele jaren later, met de ontdekking van de chromosomen door Walther Flemming en de beschrijving van hun gedrag tijdens de meiose, werd een mogelijk mechanisme voor de overerving van kenmerken gepostuleerd. De connectie tussen chromosomen en erfelijkheid werd ondersteund door het werk van Theodor Boveri en Walter Sutton, maar het directe bewijs voor de chromosoomtheorie kwam er pas in het begin van de 20ste eeuw, na 50 jaar speculatie, met de genetische experimenten van Thomas Hunt Morgan op fruitvliegjes.

### 1.1.3 DNA is het "transforming principle".

In het tijdperk van Mendel werkte de Zwitserse biochemicus **Friedrich Miescher** aan de universiteit van Tübingen (Duitsland) aan experimenten waarmee hij de samenstelling van witte bloedcellen wilde karakteriseren. Hij verzamelde daarvoor met etter doordrenkte verbanden, die hij verkreeg van een bevriende chirurg (Miescher voerde zijn experimenten uit ten tijde van de Krim oorlog, dus hij had geen gebrek aan specimens). Tijdens deze experimenten isoleerde Miescher, behalve eiwitten, een substantie uit de celkernen die heel andere fysicochemische eigenschappen bezat. Deze nieuwe substantie, die Miescher 'nucleïne' noemde, bevatte veel fosfor, geen zwavel, en was resistent voor proteolyse. Het nucleïne dat Miescher ontdekte werd in meer detail gekarakteriseerd door chemicus **Phoebus Levene**, die in het begin van de 20ste eeuw aan Rockefeller University (New York, USA) de chemische samenstelling van nucleïnezuren uit gisten analyseerde. Levene ontdekte dat DNA bestond uit **nucleotide** bouwstenen, die bestaan uit een **suiker**, een **base (A: adenine, C: cytosine, G: guanine of T: thymine)** en een **fosfaatgroep** (meer detail in hoofdstuk 2). Levene dacht dat DNA bestond uit gelijke hoeveelheden van elk van deze basen en hypotheetiseerde dat DNA moleculen tetranucleotiden waren (Fig. 1.5). Op basis van deze eenvoudige structuur postuleerde Levene bovendien dat DNA



onmogelijk de genetische code kon bevatten. Zelf was hij een aanhanger van de hypothese dat eiwitten de erfelijkheidsdragers waren. Hoewel we nu weten dat Levene's DNA structuur niet correct was, is zijn nucleotide onderzoek van groot belang geweest voor later DNA onderzoek.

Fig. 1.5. Levene's tetranucleotide  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Phoebus\\_Levene](https://en.wikipedia.org/wiki/Phoebus_Levene))

In 1928 voerde de Britse bacterioloog **Frederick Griffith** een reeks experimenten uit met *Streptococcus pneumoniae*. Griffith was niet bezig met erfelijkheidsonderzoek, maar werkte aan een vaccin tegen longontsteking. In zijn onderzoek gebruikte Griffith twee verwante bacteriestammen: **stam R** (voor 'rough') en **stam S** (voor 'smooth'). De R bacteriën waren niet-virulent en maakten geïnfecteerde muizen dus niet ziek. De S bacteriën daarentegen bezaten een polysaccharidenmantel, die hen beschermde tegen de immunologische afweermechanismen van de gastheer, zodat besmette muizen ernstige longontsteking ontwikkelden en stierven. Wanneer Griffith muizen injecteerde met dode S bacteriën overleefden deze zoals verwacht de infectie. Zeer onverwacht echter stierven de muizen ook nadat ze waren geïnfecteerd met een mengsel van dode S bacteriën en levende R bacteriën. In het bloed van de dode muizen vond Griffith bovendien levende S bacteriën (Fig. 1.6)! Griffith concludeerde uit dit experiment dat de levende R bacteriën een transformerende factor ('**transforming principle**') hadden overgenomen van de dode S bacteriën waardoor ze in S bacteriën waren veranderd (getransformeerd). De chemische aard van de transformerende factor bleef echter nog bijna 20 jaar onopgehelderd.

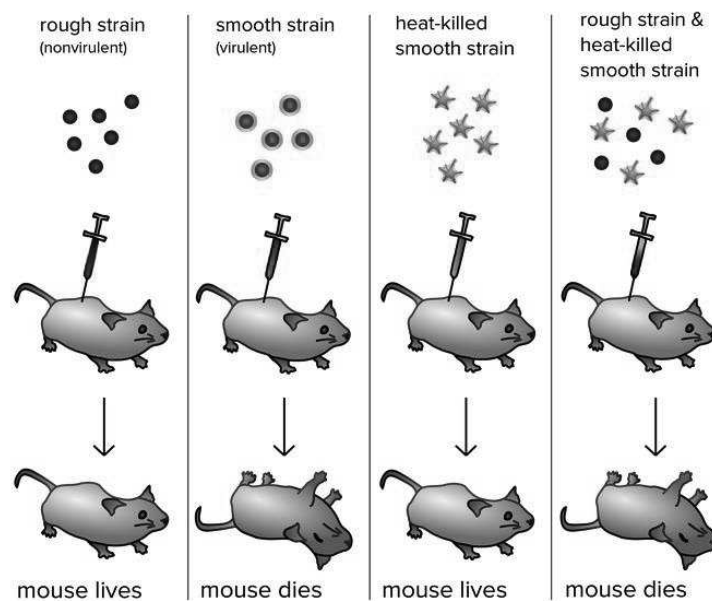


Fig. 1.6. Experiment van Griffith: aantonen van het "transforming principle"  
 (<https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/classic-experiments-dna-as-the-genetic-material>)

In 1944 gingen **Avery, McCarthy en MacLeod**, drie Canadese/Amerikaanse onderzoekers, op zoek naar de biochemische identiteit van Griffith's 'transforming principle'. Ze groeiden S bacteriën *in vitro* en doodden de bacteriën door verhitting. Vervolgens behandelden ze de gedode bacteriën met enzymen (**proteasen, ribonucleasen, desoxyribonucleasen**) die specifiek bepaalde biomoleculen degraderen. Wanneer de enzymatisch behandelde dode S bacteriën vervolgens werden gecombineerd met levende

R bacteriën, verschenen er na verloop van tijd levende S cellen in de kweken met de proteinase- en ribonuclease-behandelde S-cellen, maar niet in de kweken met deoxyribonuclease-behandelde bacteriën (Fig. 1.7). Uit dit experiment concludeerden de onderzoekers (voorzichtig) dat DNA de transformerende factor is.

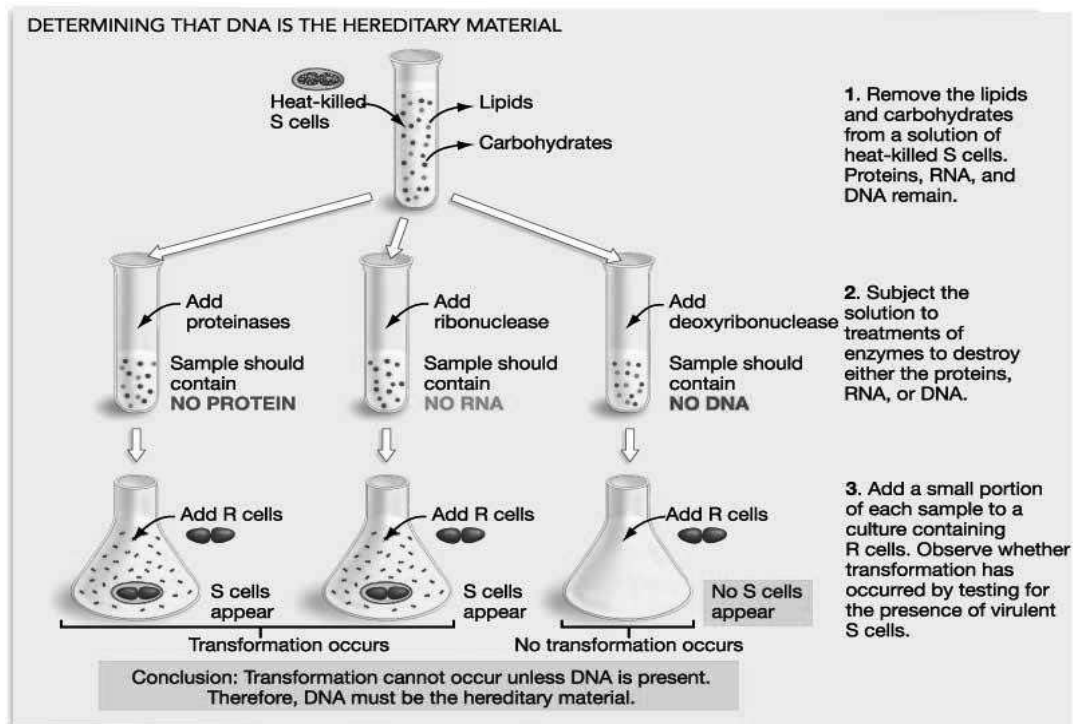


Fig. 1.7. Experiment van Avery, McCarthy en MacLeod. (<https://amm-dnaexperiment.weebly.com/>)

Vele wetenschappers bleven er echter van overtuigd dat eiwitten en niet DNA de erfelijkheidsdragers zijn en de discussie bleef doorgaan tot in 1952, wanneer **Alfred Hershey en Martha Chase** hun **bacteriofaag** experiment uitvoerden. Bacteriofagen zijn virussen die bacteriën infecteren en de fagen die Hershey en Chase gebruikten, waren simpele partikels, enkel opgebouwd uit eiwit en DNA. Wanneer bacteriofagen bacteriën infecteren dan dringen ze de bacterie niet binnen, maar injecteren ze een substantie in de bacteriën, die de bacteriën instrueert om nieuwe faagpartikels aan te maken. Dit betekent dat de substantie die de fagen injecteren hun genetisch materiaal bevat.

Om na te gaan of de fagen eiwit of DNA injecteerden, maakten Hershey en Chase gebruik van **radio-isotopen** die ofwel eiwit ofwel DNA radioactief kunnen maken. Wanneer fagen gegroeid worden in de aanwezigheid van  $^{35}\text{S}$ , dan worden enkel de faageiwitten radioactief gemerkt, vermits zwavel (S) niet voorkomt in DNA. Het DNA werd specifiek gemerkt met  $^{32}\text{P}$ , omdat fosfor niet voorkomt in eiwitten (tenzij na post-translationele modificatie, wat voor de faageiwitten niet van toepassing is).

**EXPERIMENT** In their famous 1952 experiment, Alfred Hershey and Martha Chase used radioactive sulfur and phosphorus to trace the fates of the protein and DNA, respectively, of T2 phages that infected bacterial cells.

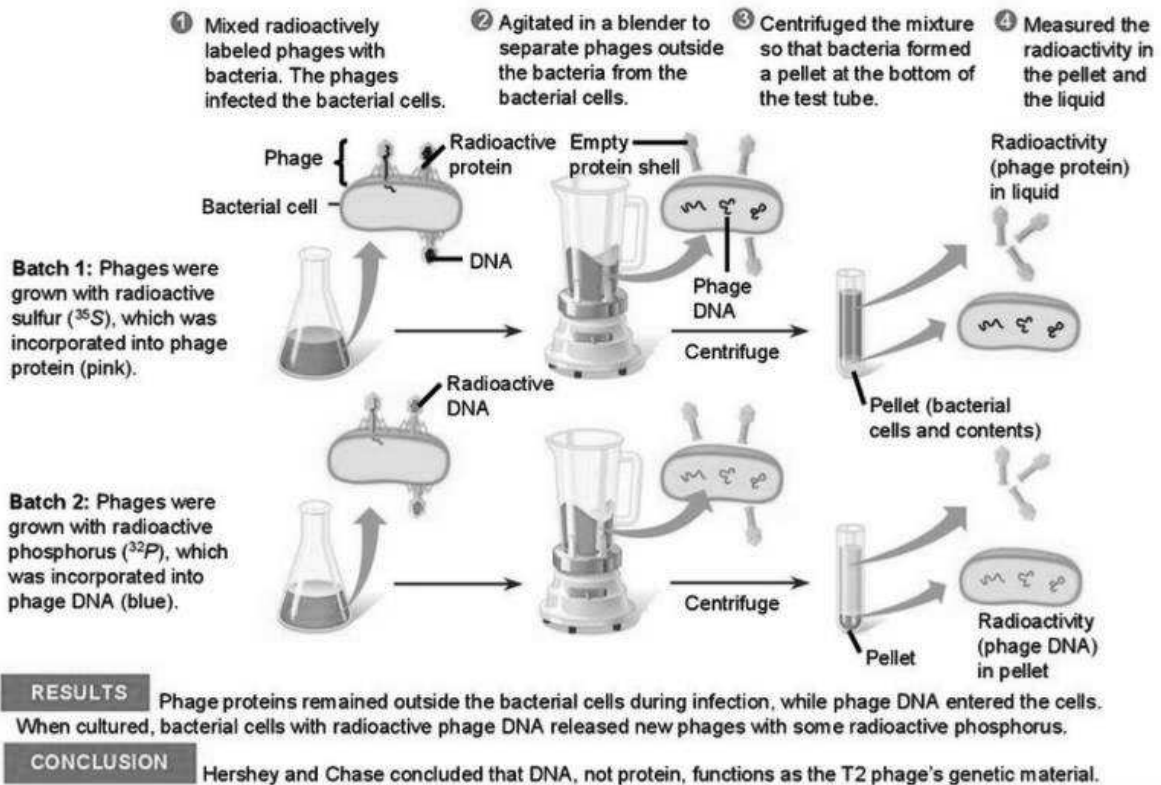


Fig. 1.8. Experiment van Hershey en Chase. (Pearson education Inc. 2005)

De gemerkte fagen werden gebruikt om bacteriën te infecteren en vervolgens werden bacteriën en fagen in een blender van mekaar gescheiden. Tenslotte werd het mengsel van bacteriën en fagen gecentrifugeerd, waarbij de zwaardere partikels (de bacteriën) gepelleteerd werden, terwijl de lichtere fagen in oplossing bleven. Wanneer dan onderzocht werd waar de radio-activiteit zich bevond, dan vond men het  $^{35}\text{S}$  (eiwit) signaal enkel in de fagen terug, terwijl het  $^{32}\text{P}$  signaal (DNA) volledig in de bacteriën zat. Dit bewees dat DNA de transformerende factor, en dus de erfelijkheidsdrager, is (Fig. 1.8).

## 1.2 Een model voor de structuur van DNA.

Nu het vast stond dat DNA en niet eiwit de erfelijke informatie bevatte, bleef de vraag hoe zo'n eenvoudige molecule, met slechts 4 bouwstenen, de informatie voor het leven zou kunnen coderen. Het antwoord werd gezocht in de structuur van DNA. Uit het werk van Phoebus Levene en andere biochemici wist men in 1950 reeds dat DNA bestond uit nucleotiden en men kende ook de chemische samenstelling van de nucleotiden.

De Oostenrijkse biochemicus **Erwin Chargaff** analyseerde de basensamenstelling in het DNA van verschillende soorten. Hij stelde vast dat A, T, C en G niet in gelijke hoeveelheden werden aangetroffen en verwierp daarmee de eerdere hypothese van Levene. Hij vond tevens dat de hoeveelheid van de verschillende basen verschilde tussen individuen van verschillende soorten, maar niet tussen individuen van eenzelfde soort. Zijn belangrijkste bevinding was echter dat in alle onderzochte organismen de hoeveelheid A steeds gelijk was aan de hoeveelheid T, terwijl de hoeveelheid C altijd gelijk was aan de hoeveelheid G. Deze conclusie is gekend als de **regel van Chargaff**. De bevindingen van Chargaff waren essentieel voor de ontrafeling van de structuur van de dubbele helix, doch zelf heeft Chargaff nooit de link gelegd tussen zijn resultaten en de DNA structuur.

**James Watson** en **Francis Crick** publiceerden in 1953 de dubbele helix als model voor de DNA structuur in een artikel in het toonaangevende tijdschrift *Nature*. Hun ontdekking was voor een groot deel gebaseerd op X-straal diffractie resultaten bekomen door **Rosalind Franklin**, die werkte in het laboratorium van **Maurice Wilkins** (Fig. 1.9).

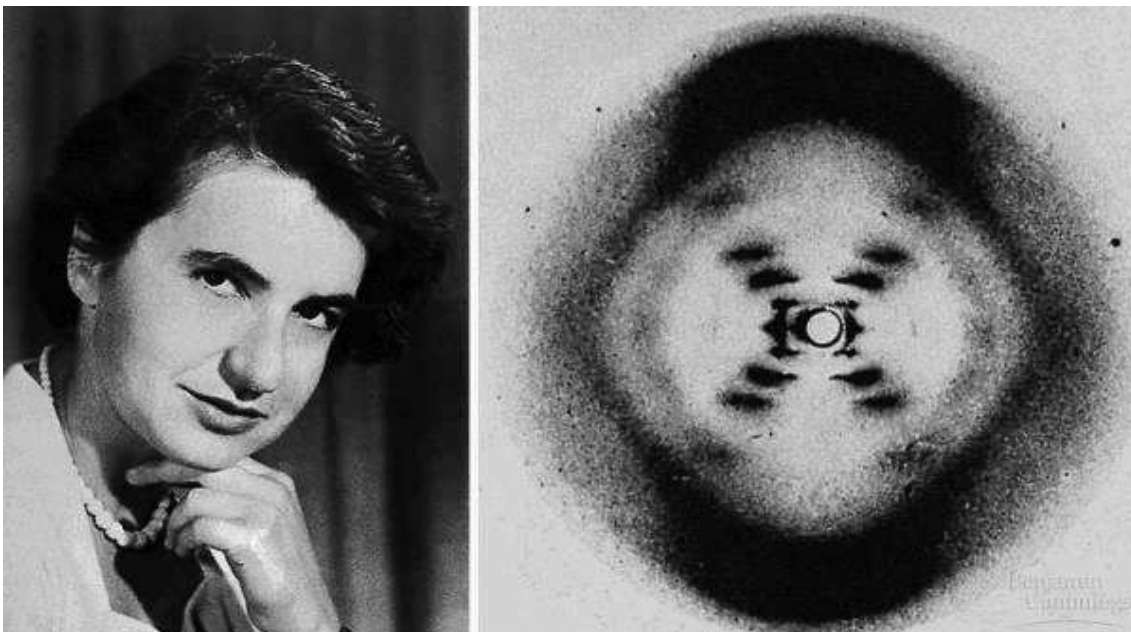
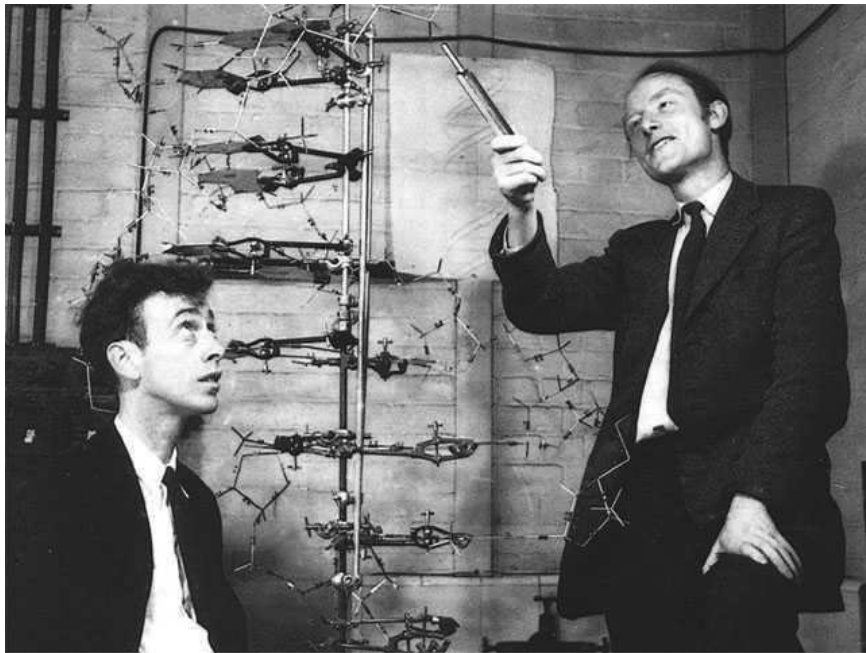


Fig. 1.9. Rosalind Franklin en haar bekende X-straal diffractie beeld van de DNA dubbele helix.  
(<https://sketchingscience.wordpress.com/2013/07/25/rosalind-franklin/>)

Zelf vergaarden Watson en Crick geen experimentele data, maar bouwden ze 3D modellen op basis van gekende moleculaire afstanden en bindingshoeken, een methode die door de Amerikaanse biochemicus **Linus Pauling** was ontwikkeld. Pauling had met dezelfde methode reeds in 1951 aangetoond dat eiwitten een helicale secundaire structuur kunnen aannemen (de  $\alpha$ -helix) en was zelf ook op zoek naar de structuur van het DNA. Door de data van Roosevelt en de bevindingen van Chargaff te integreren in hun model, waren het echter Watson en Crick die de correcte structuur van

het DNA, de **dubbele helix**, modelleerden (Fig. 1.10). Watson, Crick en Wilkins ontvingen in 1962 de Nobelprijs voor hun ontdekking. Rosalind Franklin was op dat moment al overleden.



*Fig. 1.10. James Watson en Francis Crick met hun model van de DNA dubbele helix. (Watson JD. The double helix: a personal account of the discovery of the structure of DNA. In Stent GS, ed.)*

### 1.3 Het centrale dogma

---

De ontdekking van de DNA dubbele helix markeerde in feite de start van de moderne moleculaire biologie. Men beseftte dat DNA, in tegenstelling tot wat voordien werd gedacht, geen eenvoudige molecule was, maar voldoende informatie kon bevatten om erfelijke kenmerken te coderen. De omstreden hypothese dat DNA, en niet eiwit, het erfelijk materiaal vertegenwoordigde, was nu algemeen aanvaard. De volgende vraag die zich stelde was hoe de informatie in het DNA gebruikt werd om eiwitten te maken. De beschrijving van de informatiestroom van DNA naar eiwit werd in 1957 door Francis Crick bestempeld als het '**centrale dogma**' van de moleculaire biologie" (Fig. 1.11).

Volgens het centrale dogma wordt de informatie in het DNA via een RNA intermediair doorgegeven aan eiwit. Dus: DNA codeert voor RNA dat op zijn beurt codeert voor eiwit. Eens de informatie in een eiwit zit, kan ze er niet meer uit. Hoewel het centrale dogma tot op de dag van vandaag heeft standgehouden, werden een paar uitzonderingen op het dogma ontdekt, die we in latere hoofdstukken in meer detail zullen bespreken.



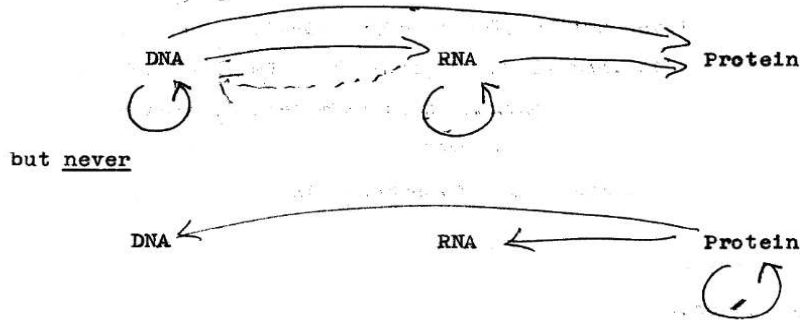
Ideas on Protein Synthesis (Oct. 1956)

The Doctrine of the Triad.

The Central Dogma: "Once information has got into a protein it can't get out again". Information here means the sequence of

the amino acid residues, or other sequences related to it.

That is, we may be able to have



where the arrows show the transfer of information.

Fig. 1. 11. Formulering van het centraal dogma door Francis Crick.  
(<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003243>)

In de volgende hoofdstukken zullen we de functie van DNA, RNA en eiwit in de stroom van genetische informatie in detail bespreken. Het proces waarbij een exacte DNA kopie van de originele DNA matrix wordt gemaakt noemt men **replicatie**. **Transcriptie** is het proces waarbij DNA wordt gekopieerd naar een enkelstrengig RNA met dezelfde sequentie als één van de DNA strengen. Men gebruikt de term transcriptie (herschrijven) omdat dezelfde taal (nucleotiden) wordt gebruikt in DNA en RNA. Het proces waarbij de RNA nucleotidesequentie wordt omgezet in eiwit, en dus in een andere taal (aminozuren) noemt men **translatie** (vertalen).

## 2 De structuur van DNA.

### 2.1 De primaire structuur van DNA.

In scheikundige termen is DNA een polymeer van **nucleotide** bouwstenen. Elk nucleotide bestaat uit een **suiker** met vijf koolstoffen (pentose), een **fosfaatgroep** en een **stikstofhoudende base**: **adenine (A)**, **thymine (T)**, **cytosine (G)** of **guanine (G)**. Het pentose in DNA is altijd een **desoxyribose**, met een  $\beta$ -D configuratie (zie Haworth projectie Fig. 2.1). Merk op: bij de nummering van de koolstoffen in de suikerring worden accenten gebruikt om het onderscheid met de koolstofnummering in de basen te maken (Fig. 2.1). De esterbinding met de fosfaatgroep gebeurt op 5'-C, de koppeling van de base op 1'-C (Fig. 2.2).

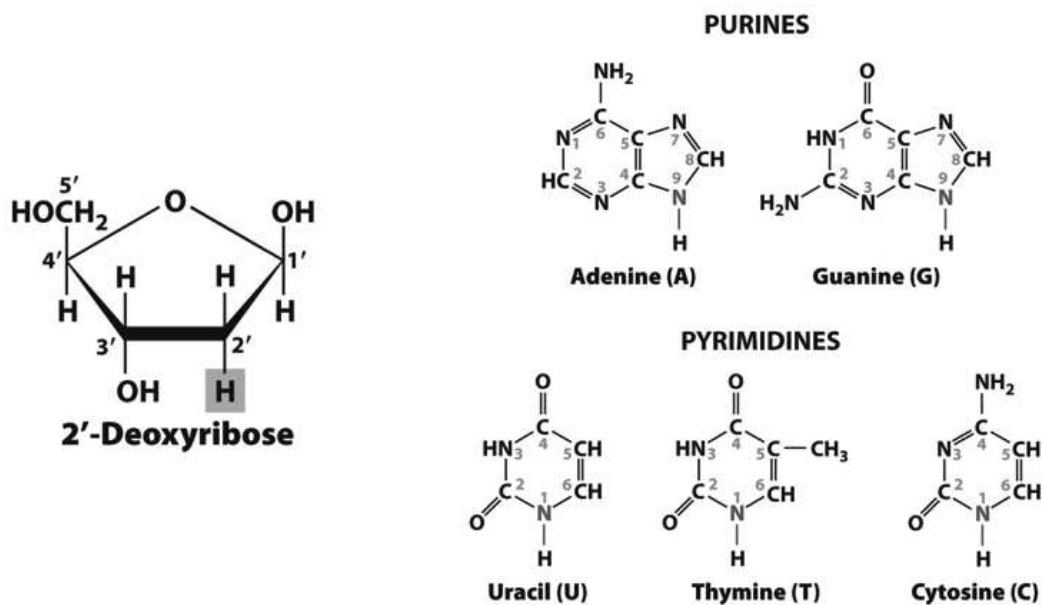


Fig. 2.1. Suiker en basen in DNA. (Molecular Cell Biology, 8th Edition, 2016 W.H. Freeman & co)

Zoals hun naam suggereert zijn de basen in DNA stikstofhoudende moleculen met de chemische eigenschappen van een base (een molecule die in oplossing een H<sup>+</sup> ion of proton kan accepteren). Ze zijn niet geprotoneerd bij neutrale pH. Twee van de basen, adenine en guanine, bevatten twee koolstof-stikstof ringen en worden **purines** genoemd. Thymine en cytosine hebben een enkele ringstructuur en worden **pyrimidines** genoemd. Purines zijn met 9-N en pyrimidines met 1-N gekoppeld aan de 1'-C op het pentose (Fig. 2.1, 2.2).

De **fosfaatgroep** in de nucleotiden verleent het DNA zijn **zure karakter**. Bij fysiologische pH dissocieert de fosfaatgroep wat zorgt voor de sterke negatieve lading van DNA.

Een DNA molecule wordt gevormd in drie stappen. Eerst wordt de stikstofhoudende base gekoppeld aan de 1'-C van het pentose, waarbij een **nucleoside** gevormd wordt. Vervolgens wordt een fosfaatgroep covalent gebonden aan de 5'-C van de ribose, waarbij een **nucleotide** ontstaat. De naamgeving van de basen, nucleosiden en nucleotiden in DNA wordt samengevat in tabel 2.1.

Base	Symbool	Nucleoside	Symbool
adenine	A	deoxyadenosine	dA
guanine	G	deoxyguanosine	dG
thymine	T	deoxythymidine	dT
cytosine	C	deoxycytidine	dC

Nucleotide (vb. voor A)	Symbool
deoxyadenosine 5'-monofosfaat	dAMP
deoxyadenosine 5'-difosfaat	dADP
deoxyadenosine 5'-trifosfaat	dATP

Tabel 2.1.

De nucleotiden polymeriseren door condensatiereacties tot een lange keten (Fig. 2.2). Daarbij zal de hydroxylgroep (OH) op de 3'-C van een suiker van één nucleotide reageren met de fosfaatgroep op de 5'-C van een suiker van een tweede nucleotide met vorming van een esterbinding. Bij deze reactie wordt één molecule water geëlimineerd en worden twee fosfaten vrijgesteld onder de vorm van **pyrofosfaat** ( $P_2O_7^{4-}$ ). Deze binding, waarbij de suikers van twee nucleotiden met mekaar worden verbonden, noemen we een **fosfodiësterbinding**, of 5'→3' fosfodiësterbinding om de polariteit van de streng weer te geven. In deze context bedoelen we met polariteit het feit dat de 5' en 3' uiteinden van een DNA streng verschillen en bijgevolg verschillende chemische eigenschappen vertonen. De 5'→3' polariteit van een nucleïnezuurstreng is extreem belangrijk, zoals we zullen zien bij de bespreking van replicatie en transcriptie. Bij conventie wordt een DNA sequentie genoteerd met het 5' uiteinde links en het 3' uiteinde rechts. Merk op dat na vorming van de fosfodiësterbinding één zuurstof van de fosfaatgroep nog steeds negatief geladen is! De fosfodiësterbinding is covalent en bijgevolg zeer stabiel. Er zal weinig spontane hydrolyse van de binding optreden, maar zoals we verder zullen zien is de fosfodiësterbinding wel het doelwit van enzymatische hydrolyse.

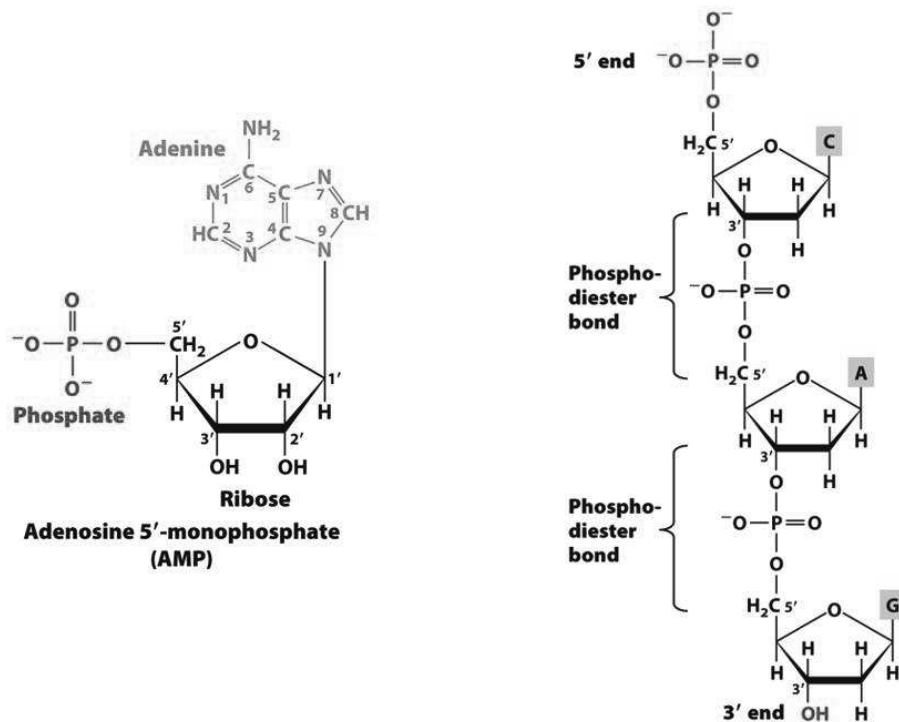


Fig. 2.2. links: structuur van het AMP nucleotide, rechts: primaire structuur van een DNA oligonucleotide (Molecular Cell Biology, 8th Edition, 2016 W.H. Freeman & co)

DNA moleculen in onze cellen kunnen honderden miljoenen nucleotiden bevatten. Het aantal **basenparen (bp)** wordt gebruikt als maat voor de lengte van een dubbelstrengig DNA en meestal wordt in **kilobasenparen (kb of kbp = 1000 bp)** of **megabasenparen (Mb of Mbp = 100000 bp)** gerekend. In het laboratorium wordt ook vaak gebruikt gemaakt van korte enkelstrengige DNA moleculen die **oligonucleotiden** genoemd worden.

## 2.2 De secundaire structuur van DNA.

Zoals Watson en Crick aantoonde, komt DNA in cellen voor onder de vorm van een dubbele helix. Verschillende **zwakke krachten** liggen aan de basis van deze secundaire structuur. Zoals schematisch voorgesteld in Fig. 2.3 (b), worden **waterstofbruggen** gevormd tussen stikstofhoudende basen van twee complementaire DNA strengen. Waterstofbindingen zijn zwakke bindingen waarbij een waterstofatoom gedeeld wordt door twee elektronegatieve atomen zoals zuurstof en stikstof. Hoewel elke waterstofbinding op zich erg zwak is, zijn er zoveel aanwezig in een DNA dubbele helix dat ze samen een belangrijke bijdrage aan de stabiliteit van de secundaire structuur leveren. Men noemt de basenparing tussen A en T of G en C 'Watson-Crick' of complementaire basenparing.

De moleculaire processen van het leven vinden plaats in waterige oplossing. De stikstofhoudende basen zijn echter apolair en zeer slecht oplosbaar in water. Eens de basen zijn ingebouwd in een nucleotide worden ze wel wateroplosbaar, doch hun apolair karakter beperkt de conformatie van de

DNA helix in oplossing. De gepaarde, relatief vlakke, basen hebben de neiging om zich op mekaar te stapelen ('**base stacking**') en zo watermoleculen uit het binnenste van de dubbele helix te verdrijven. Eens de hydrofobe basen dicht op mekaar zijn gestapeld, worden ze gestabiliseerd door **elektrostatische interacties (van der Waals)** tussen atomen. Deze zwakke interacties ontstaan omdat de elektronen constant in beweging zijn en de atomen een kleine asymmetrie in lading bezorgen, die fluctueert doorheen de tijd. Wanneer de basen mekaar zeer dicht naderen, kan een partiële lading op één base een tegengestelde lading op een naburige base veroorzaken en op die manier een aantrekking tussen beide basen uitlokken. Hoewel deze krachten veel zwakker zijn dan covalente en zelfs waterstofbindingen, zal een groot aantal van deze van der Waals interacties toch een belangrijke bijdrage leveren aan de stabiliteit van de dubbele helix.

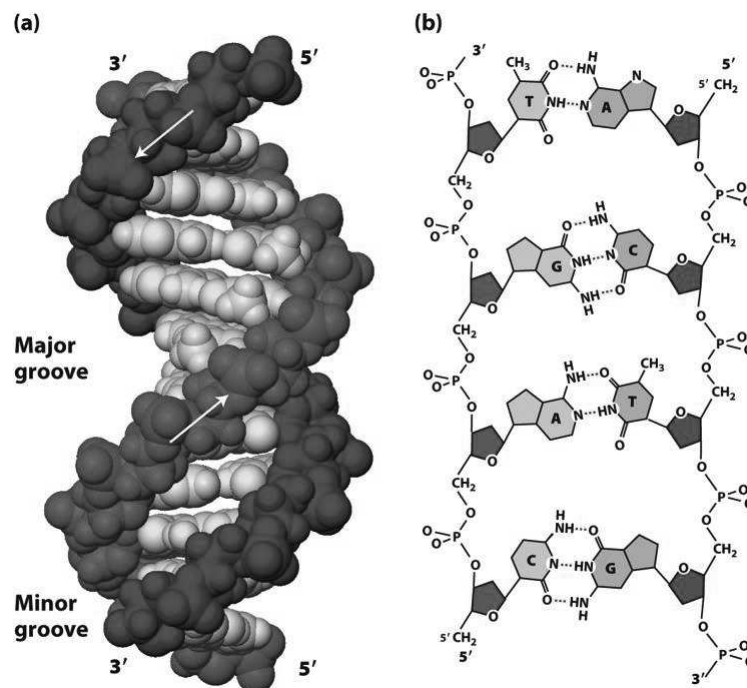


Fig. 2.3. (a) Ruimte-vullend model van de DNA helix. (b) Secundaire structuur van DNA (Molecular Cell Biology, 8th Edition, 2016 W.H. Freeman & co)

De twee glycosidische bindingen die een basenpaar verbinden met de desoxyribose suikers liggen niet perfect tegenover mekaar. Het gevolg daarvan is dat de suiker-fosfaat ruggengraten ('backbones') niet op gelijke afstanden van mekaar liggen, wat aanleiding geeft tot de zogenaamde **grote en kleine groeves ('major and minor grooves')** van de DNA dubbele helix (Fig. 2.3, a).

De diameter van de DNA dubbele helix is 2 nm ( $2 \times 10^{-9}$  m). Per volledige omwenteling (over een afstand van 3,4 nm) komen 10,5 basenparen voor. De grote groeve speelt een belangrijke rol in sequentiespecifieke interacties tussen DNA en eiwitten. Sommige eiwitten 'lezen' de chemische informatie die in de groeve aanwezig is. De buitenzijden van de purines en pyrimidines zijn in de grote

groeve immers solventietoegankelijk. Meerbepaald kunnen de stikstof en zuurstofatomen van de basen die de grote groeves aflijnen waterstofbruggen aangaan met de zijketens van aminozuren van DNA-bindende eiwitten. De mogelijke patronen van waterstofbinding zijn verschillend voor A-T, T-A, G-C en C-G basenparen. In de kleine groeve is minder chemische informatie voorhanden, zodat deze minder vaak specifieke eiwit-DNA interacties aangaat.

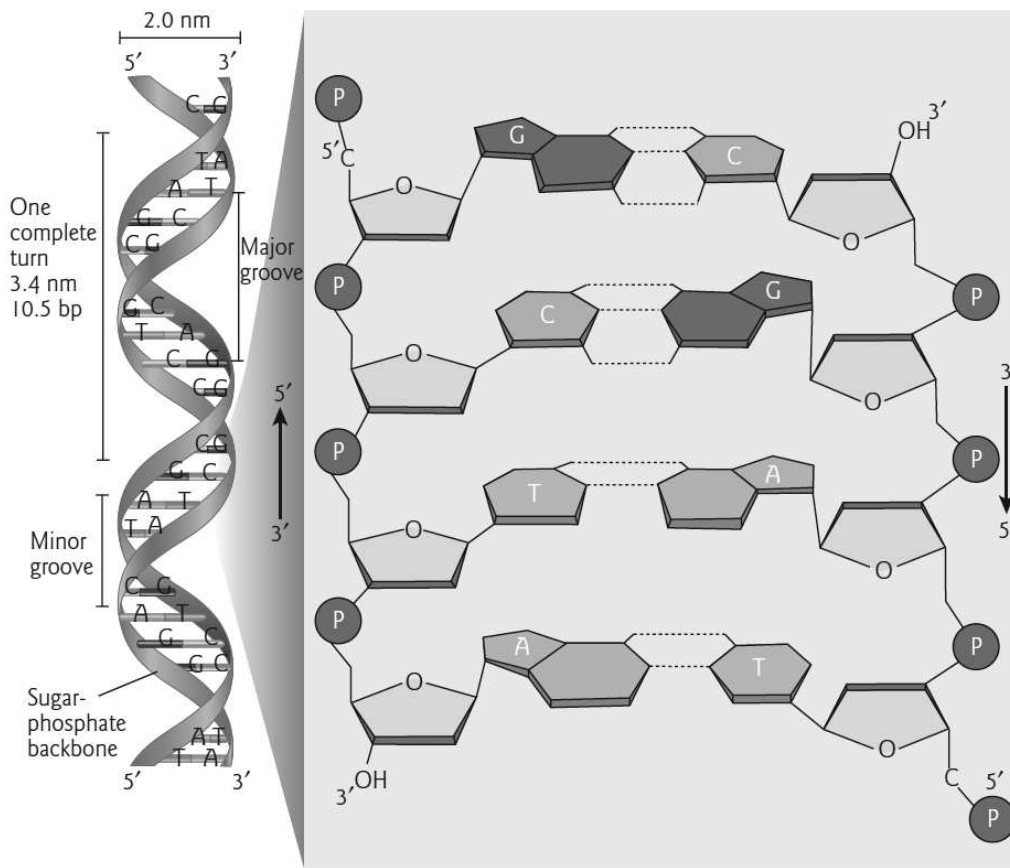


Fig. 2.4. Afmetingen en antiparallele natuur van de DNA helix. (Lizabeth A. Allison, *Fundamental Molecular Biology*, Blackwell Publishing 2007)

De kenmerken van de secundaire DNA structuur zoals voorgesteld door Watson en Crick kunnen als volgt worden samengevat:

1. DNA is een **dubbelstrengige helix**, waarbij de strengen door **waterstofbruggen** worden bijgehouden. In lijn met de regel van Chargaff, is A altijd gepaard met T en G met C.
2. De DNA helix is **rechtshandig**.
3. De DNA helix is **anti-parallel**, wat betekent dat het 5' uiteinde van één streng gepaard is met het 3' uiteinde van de complementaire streng.
4. De DNA basenparen zijn verbonden via waterstofbruggen, maar ook de buitenranden van de stikstofhoudende basen kunnen betrokken worden in waterstofbrugvorming. Dit zorgt ervoor

dat DNA interacties kan aangaan met andere moleculen, die zoals we later zullen zien essentieel zijn voor de replicatie en transcriptie van het DNA.

Sinds de ontrafeling van de 3D structuur van DNA door Watson en Crick, werd het bestaan van een aantal alternatieve DNA conformaties aangetoond via X-straal diffractie. De precieze geometrie en dimensies van de DNA dubbele helix kunnen inderdaad variëren. De meest voorkomende conformatie (de Watson en Crick structuur) noemt men ook **B-DNA**; daarnaast werden ook structuren bekomen waarin DNA een alternatieve helix configuratie, het zogenaamde **A-DNA**, aanneemt (zie Fig. 2.5). A-DNA is meer compact, en komt niet voor in het fysiologische, waterige milieu, maar wel in laboratoriumcondities waarbij organische solventen worden gebruikt en de helix gedehydrateerd wordt.

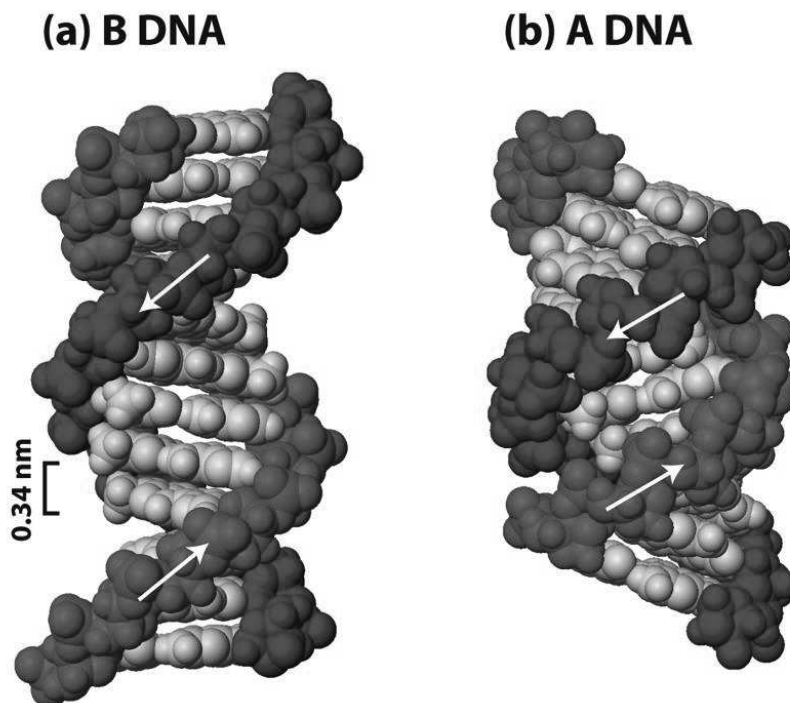


Fig. 2.5. Vergelijking van de A- en de B-vorm van DNA. (Molecular Cell Biology, 8th Edition, 2016 W.H. Freeman & co)

### 2.3 Denaturatie en renaturatie.

---

DNA strengscheiding is een noodzakelijke vereiste bij essentiële processen zoals DNA replicatie en transcriptie naar RNA. DNA strengscheiding kan experimenteel, 'in vitro', bekomen worden, en wordt '**denaturatie**' of '**smelten**' van DNA genoemd. Door het DNA te verwarmen worden de waterstofbruggen tussen de basenparen verbroken (zodat de helix desintegreert), terwijl de fosfodiësterbindingen intact blijven. Dit 'smelten' van DNA kan spectrofotometrisch gemeten worden: de basen absorberen namelijk ultraviolet licht bij een golflengte van 260 nm. Deze absorptie is bij

enkelstrengig DNA ongeveer tweemaal zo sterk als bij dubbelstrengig DNA. Dus tijdens het smelten van DNA, neemt zijn capaciteit om UV licht te absorberen toe, een fenomeen dat **hyperchromiciteit** genoemd wordt. De temperatuur waarbij de helft van de basenparen in een dubbelstrengige DNA molecule gedenatureerd zijn, noemt men de **smelttemperatuur** of **T<sub>m</sub>** (Fig. 2.6). De T<sub>m</sub>-waarde van een DNA molecule wordt sterk bepaald door het G-C gehalte. Behalve hitte, kunnen ook andere methoden gebruikt worden om DNA te denatureren. Wanneer men bijv. de zoutconcentratie van een DNA oplossing verlaagt, wordt denaturatie bevorderd omdat minder kationen aanwezig zijn om de negatieve lading van de fosfaatgroepen te neutraliseren. Hierdoor gaan de 'ruggengraten' van de twee DNA strengen mekaar afstoten, zodat het DNA zelfs bij lage temperatuur kan denatureren. Ook hoge pH (vb. 0.5 M NaOH) of organische solventen kunnen denaturatie van DNA uitlokken.

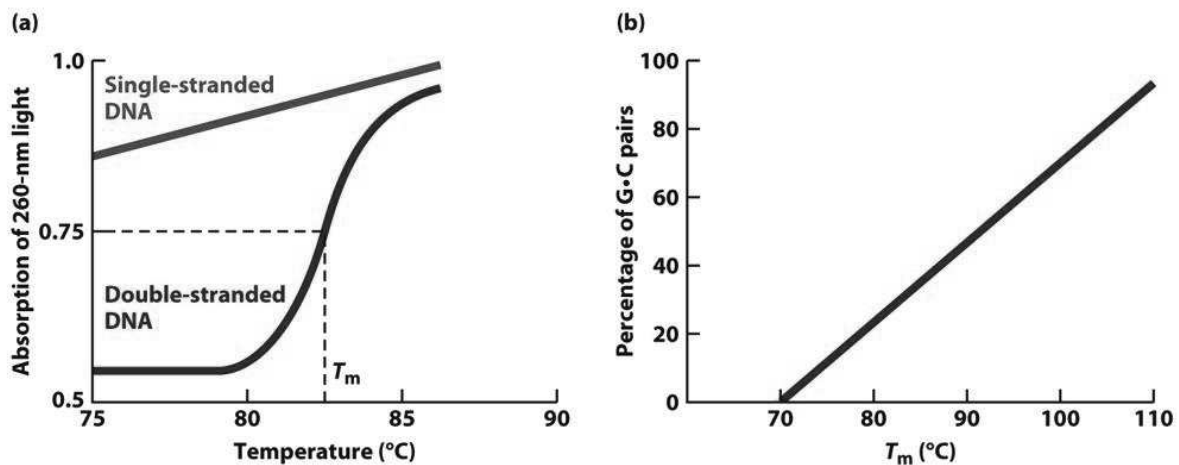


Fig. 2.6. Detectie van DNA denaturatie via spectrofotometrie. Links: A<sub>260</sub> in functie van temperatuur. Rechts: relatie tussen T<sub>m</sub> en GC gehalte. (Molecular Cell Biology, 8th Edition, 2016 W.H. Freeman & co)

Wanneer verhitte, gedenatureerde, DNA oplossingen vervolgens langzaam worden afgekoeld, zullen complementaire DNA strengen mekaar terugvinden en een nieuwe dubbele helix vormen. Men noemt dit proces **renaturatie** of '**annealing**'. Deze eigenschap van DNA laat toe om twee complementaire DNA strengen van verschillende oorsprong te laten basenparen, een proces dat **hybridisatie** wordt genoemd en in veel experimentele methodes, die we in latere hoofdstukken zullen bespreken, wordt uitgebuit (Fig. 2.7).



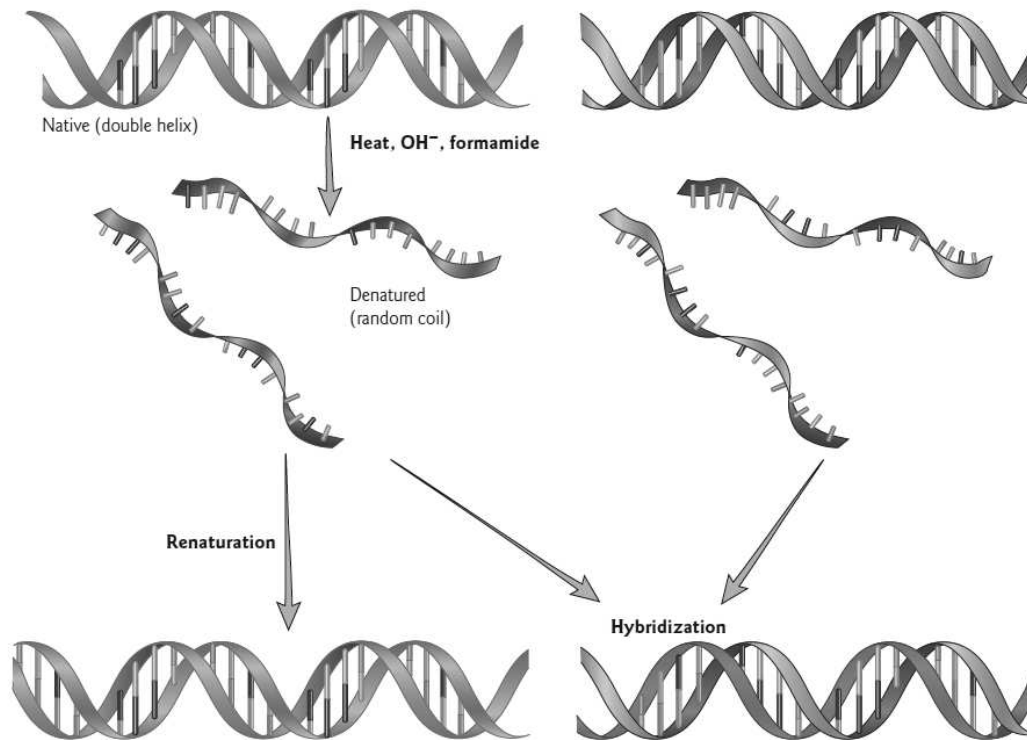


Fig. 2.7. DNA hybridisatie. (Lizabeth A. Allison, *Fundamental Molecular Biology*, Blackwell Publishing 2007)

De snelheid van DNA renaturatie is in sterke mate afhankelijk van de oorspronkelijke DNA concentratie in het staal. De fractie ssDNA die op tijdstip  $t$  (na de start van de renaturatie) nog steeds gedeneureerd is, wordt gegeven door volgende vergelijking:

$$C/C_0 = 1/[1 + KC_0t]$$

waarbij  $C$  = concentratie ssDNA in mol nucleotiden/L;  $C_0$ : initiële DNA concentratie;  $K$ : constante (afhankelijk van de zoutconcentratie in de buffer)

Het product van  $C_0$  en  $t$  noemt men gemakshalve '**Cot**' en een plot van  $C/C_0$  versus  $C_0t$  noemt men een '**Cot curve**'. Op het moment dat de renaturatie halfweg is ( $t = t_{1/2}$ ) is  $C/C_0 = 1/2$ . In Fig. 2.8 vind je een aantal Cot curves van organismen met kleine genomen terug.