

Inhoudsopgave

Voorwoord	15
Ten geleide	18

Hoofdstuk 1 19

1.1 Atomen en moleculen	21
1.1.1 Atomen	21
1.1.1.1 Edelgasconfiguratie	26
1.1.1.2 Elektronegativiteit	26
1.1.1.3 Uitwisseling van elektronen	26
1.1.1.4 Het delen van elektronen	27
1.1.1.5 Ionen	28
1.1.2 Moleculen	28
1.1.2.1 Chemische binding	28
1.1.2.2 Intermoleculaire krachten	30
1.1.2.3 Condensatie en hydrolyse	33
1.1.3 Macromoleculen	34
1.1.3.1 Multimoleculaire complexen	35
1.1.4 De cel	36
1.1.5 De oorsprong van het leven	37
1.2 Koolhydraten	38
1.2.1 Asymmetrisch koolstofatoom	40
1.2.1.1 D- en L-isomeren	41
1.2.2 Indeling	41
1.2.2.1 Monosachariden	41
1.2.2.2 Meervoudige suikers	48
1.3 Eiwitten	57
1.3.1 Amino-zuren	57
1.3.2 Peptidebinding	59
1.3.3 De structuren van een eiwit	61
1.3.3.1 Primaire structuur	61
1.3.3.2 Secundaire structuur	62
1.3.3.3 Tertiaire structuur	64
1.3.3.4 Quaternaire structuur	64
1.3.4 Indeling eiwitten naar functionaliteit	66
1.3.4.1 Enzymen	66
1.3.4.2 Transporters	69
1.3.4.3 Structuureiwitten	70
1.3.4.4 DNA-bindende eiwitten	70
1.3.5 De functies van de proteïnen	71

1.4 Nucleïnezuren	72
1.4.1 Nucleotiden	72
1.4.1.1 Pentose	72
1.4.1.2 Stikstofbase	73
1.4.1.3 Fosfaatgroep	75
1.4.2 De vorming van nucleïnezuren	76
1.4.2.1 Polymerisatie	76
1.4.2.2 Basenparing	77
1.4.3 DNA	78
1.4.3.1 De functie van DNA en RNA	82
1.4.4 Nucleoside mono-, di- en tri-fosfaten	82
1.4.4.1 Vorming cAMP	84
1.4.4.2 Notatie ATP ADP	85
1.4.5 Functie van de nucleotiden	85
1.5 Lipiden	87
1.5.1 Vetzuren	88
1.5.1.1 Cis- en transvetzuren	89
1.5.1.2 Nomenclatuur vetzuren	89
1.5.2 Glycerol	91
1.5.3 Vetten en oliën	91
1.5.4 Fosfolipiden	93
1.5.4.1 Fosfolipide <i>bilayer</i> membraan	96

Hoofdstuk 2 99

2.1 De cel	101
2.1.1 Differentiatie	103
2.1.1.1 Prokaryoten en eukaryoten	103
2.1.1.2 Overeenkomsten	104
2.1.1.3 Verschillen	104
2.1.2 Het milieu in de cel	105
2.1.2.1 De zuurgraad	105
2.1.2.2 Handhaving pH waarde	106
2.1.2.3 Concentratie opgeloste stoffen	107
2.1.2.4 Energiehuishouding	109
2.2 Celstructuren eukaryoten	110
2.2.1 De celwand	111
2.2.2 De celmembraan	112
2.2.3 De nucleus	115
2.2.3.1 Nucleolus	116
2.2.4 Ribosoom	117
2.2.5 Het endomembrane systeem	118
2.2.6 Vesikels	120

2.2.7 Lysosomen	121
2.2.8 Peroxisomen	121
2.2.9 Mitochondriën	122
2.2.10 Plastiden	123
2.2.10.1 Chloroplasten	123
2.2.11 Centriool	125
2.2.12 Vacuole	125
2.2.13 Cytoskelet	125
2.2.14 Celwanden en extracellulaire matrices	127
2.2.15 Multicellulaire organismen	128
2.3 Celstructuren prokaryoten	130
2.3.1 Gramkleuring	134
2.3.1.1 Grampositieve organismen	134
2.3.1.2 Gramnegatieve organismen	134
2.4 Virussen	135
2.4.1 De <i>nucleic acid core</i>	137
2.4.2 De capside	138
2.4.3 De <i>envelope</i>	138
2.4.4 <i>Spikes</i>	138
2.4.5 Morfologische indeling virussen	139
2.4.6 De virale infectie	140
2.4.6.1 Infectie van prokaryoten door bacteriofagen	141
2.4.6.2 Lysogenie en inductie	143
2.4.6.3 Infectie van eukaryoten door virussen	143
2.4.7 Virussen: leven of dood?	144

Hoofdstuk 3

145

3.1 DNA	147
3.1.1 Chromosoom	148
3.1.1.1 Chromosomenparen	149
3.1.2 DNA-opslag	150
3.1.2.1 Chromatine	153
3.1.2.2 Flexibiliteit van het DNA-oprofsysteem	153
3.1.3 DNA als substraat	154
3.1.3.1 DNA-methylering	155
3.2 DNA replicatie	156
3.2.1 <i>Leading</i> en <i>lagging strand</i>	161
3.2.1.1 Synthese <i>leading strand</i>	162
3.2.1.2 Synthese <i>lagging strand</i>	163
3.2.1.3 <i>Bidirectional mechanism</i>	166
3.2.2 DNA-schade en DNA-reparatie	166
3.2.2.1 DNA-schade door interne biochemische processen	167

3.2.2.2	DNA-schade door fouten tijdens de replicatie	168
3.2.2.3	DNA-schade door externe factoren	168
3.2.2.4	Gevolgen van DNA-schade	169
3.2.2.5	Reparatiemechanismen	170
3.3	Eiwitsynthese	174
3.3.1	Genexpressie: transcriptie	176
3.3.1.1	Oriëntatie op de <i>template</i>	179
3.3.1.2	Ribonucleosidetrifosfaat	181
3.3.1.3	Het gevormde RNA	181
3.3.1.4	Het transcriptieproces	183
3.3.2	Genexpressie: translatie	185
3.3.2.1	tRNA	187
3.3.2.2	Translatie	190
3.3.3	Genexpressie: variaties	200
3.3.3.1	Locatie	201
3.3.3.2	Promotor herkenning	201
3.3.3.3	De terminator	201
3.3.3.4	Structuur van de genen	202
3.3.3.5	mRNA in prokaryoten	203
3.3.3.6	RNA-transcript in eukaryoten en RNA <i>processing</i>	203
3.3.3.7	5'-UTR en 3'-UTR	207
3.3.3.8	Alternatieve <i>splicing</i>	209
3.3.4	Genexpressie: procescontrole	210
3.3.4.1	Procescontrole	210
3.3.4.2	Polysomen en snelle ribosomenrecycling	212
3.3.4.3	Mutatie	213
3.4	Vouwen van eiwitten	215
3.4.1	Primaire eiwitstructuur	215
3.4.2	Secundaire eiwitstructuren	215
3.4.3	Tertiaire eiwitstructuur	219
3.4.4	Quaternaire eiwitstructuur	221
3.4.5	Eiwitten die de vouwing regelen	222
3.4.6	Prionen	223
3.4.7	Een veelgebruikte indeling van eiwitten	224
3.5	Regulatie van genexpressie	225
3.5.1	Celdifferentiatie	225
3.5.2	Genregulatie	225
3.5.3	Het <i>lac</i> -operon	226
3.5.3.1	De regulering van het <i>lac</i> -operon	227
3.5.3.2	De genregulatie van het <i>lac</i> -operon in <i>E. coli</i>	233
3.5.4	Genregulatie in eukaryoten	234
3.5.4.1	Transcriptionele controle in eukaryoten	234
3.5.4.2	Overzicht controle momenten in eukaryoten	236

4.1 Celdeling: mitose	241
4.1.1 Celdeling in prokaryoten	241
4.1.2 Celdeling in eukaryoten	242
4.1.2.1 De eukaryote celcyclus	243
4.1.3 De kerndeling	245
4.1.3.1 Mitotische spoel	245
4.1.3.2 Mitose	246
4.1.3.3 De cytokinese	251
4.1.4 Regulering van de celcyclus	253
4.2 Celdeling: meiose	256
4.2.1 Ongeslachtelijke voortplanting	256
4.2.2 Geslachtelijke voortplanting	256
4.2.3 Meiose globaal	257
4.2.3.1 Meiose I	258
4.2.3.2 Meiose II	258
4.2.4 Meiose in detail	259
4.2.4.1 De meiotische spoel	259
4.2.4.2 Meiose I in fases	260
4.2.4.3 Meiose II in fases	264
4.2.5 <i>Crossing-over</i>	264
4.2.6 Abnormaliteiten en meiose	267
4.2.7 Geslachtelijke voortplanting bij dieren	267
4.2.8 Geslachtelijke voortplanting bij sporenplanten	269
4.2.9 Mitose versus meiose	270
4.3 Genetica	271
4.3.1 Genotype en fenotype	271
4.3.1.1 Genen en allelen	271
4.3.1.2 Homozygoot en heterozygoot	272
4.3.1.3 Dominant en recessief	272
4.3.1.4 Partiële dominantie	273
4.3.2 De wetten van Mendel	273
4.3.2.1 Monohybride kruisingen	274
4.3.2.2 Dihybride kruisingen	278
4.3.2.3 Trihybride kruisingen	281
4.3.2.4 Multipеле allelen	281

5.1 Metabolisme	287
5.1.1 Opname van energie en materie	287
5.1.1.1 Autotrofe organismen	288
5.1.1.2 Heterotrofe organismen	288
5.1.2 Energiebeheer	288
5.1.2.1 ATP/ADP-cyclus	289
5.1.2.2 Elektronendragers	290
5.1.2.3 Energievoorraden	292
5.2 Fotosynthese	294
5.2.1 Chloroplasten	294
5.2.2 Fotosynthese stap-voor-stap	295
5.2.2.1 Absorptie van licht	296
5.2.2.2 Elektronentransport en de vorming van een <i>proton-motive force</i>	297
5.2.2.3 Synthese van ATP	302
5.2.2.4 Koolstoffixering (<i>carbon fixation</i>)	304
5.2.3 Samenvatting fotosynthese	308
5.3 Glycolyse	309
5.3.1 <i>Energy investment phase</i>	310
5.3.2 Splitsing fructose-1,6-difosfaat	312
5.3.3 <i>Energy payoff phase</i>	312
5.3.4 Het energetisch totaalresultaat van de glycolyse	315
5.3.5 Regulering van de glycolyse	316
5.4 Aerobe dissimilatie	319
5.4.1 Acetyl-CoA	321
5.4.2 De citroenzuurcyclus	323
5.4.3 Ademhalingsketen	329
5.4.4 Oxidatieve fosforylering	330
5.4.5 Samenvatting ATP-synthese	332
5.4.6 ATP transport	332
5.4.7 Energetisch eindresultaat van de aerobe dissimilatie	332
5.5 Anaerobe dissimilatie	334
5.5.1 Fermentatie of gisting	334
5.5.1.1 Melkzuurgisting	334
5.5.1.2 Alcoholgisting	335
5.5.1.3 Fermentatie onder aerobe omstandigheden	336
5.6 Afbraak van macromoleculen	337
5.6.1 Afbraak van koolhydraten	337
5.6.2 Afbraak van vetten	337
5.6.2.1 Transport van het acyl-CoA	338
5.6.2.2 Mitochondriale oxidatie	339
5.6.2.3 Peroxisomale oxidatie	341

5.6.3 Afbraak van eiwitten	343
5.6.4 Samenvatting afbraak macromoleculen	344
5.6.5 Overmaat aan energierijke moleculen	345
5.6.6 Tot slot	345
5.7 Gluconeogenese	347
5.7.1 Bronnen van de gluconeogenese	347
5.7.2 Gluconeogenese versus glycolyse	348
5.7.3 Gluconeogenese in schema	348
5.7.4 Glucose-6-fosfatase	350
5.7.5 Tot slot	350
5.8 Vetzuursynthese	351
5.8.1 Het opstarten van de synthese	351
5.8.2 De vetzuursynthese in schema	353
5.8.3 Vetzuurmetabolisme	356
5.8.4 Vetzuurelongatie en desaturatie	356
5.8.5 Omega-vetzuren	357

Hoofdstuk 6

359

6.1 Materiaaluitwisseling	361
6.1.1 Transporteiwitten	362
6.1.1.1 <i>Channels</i>	362
6.1.1.2 Transporters	364
6.1.2 Het transport door de celmembraan	364
6.1.2.1 Het passieve transport	366
6.1.2.2 Het actieve transport	367
6.1.2.3 Membraanfusie	370
6.1.3 Materie-uitwisseling binnen meercellige organismen	376
6.2 Celcommunicatie	377
6.2.1 Intracellulaire receptor	377
6.2.2 <i>Cell-surface receptor</i>	378
6.2.2.1 Ionkanaalgekoppelde receptoren	379
6.2.2.2 G-eiwitgekoppelde receptoren	380
6.2.2.3 Enzymgekoppelde receptoren	383
6.2.3 Intracellulair signaleringspad	383
6.2.4 Manieren van intercellulair communiceren	384
6.2.5 Receptoractivering	385

7.1 Recombinant-DNA: basistechnieken	389
7.1.1 Denaturatie en hybridisatie	391
7.1.2 DNA knippen met restrictienucleasen	391
7.1.2.1 Restrictieplaatsen (<i>restriction sites</i>)	392
7.1.2.2 Knippatroom	392
7.1.3 Gelelektroforese	394
7.1.4 Capillaire elektroforese	395
7.1.5 Fluorescent 'kleuren' van DNA	397
7.1.6 <i>Blotting</i>	398
7.1.7 Polymerase-kettingreactie (PCR)	401
7.1.8 Het maken van cDNA: <i>reverse</i> transcriptie (RT)	404
7.2 Afgeleide technieken: PCR varianten	406
7.2.1 <i>Realtime</i> PCR als veelgebruikte qPCR (<i>quantitative</i> PCR)-methode	406
7.2.1.1 Sybr Green qPCR	408
7.2.1.2 Moleculair baken (<i>beacon</i>)	409
7.2.1.3 Taqman	410
7.2.2 <i>Reverse</i> transcriptie in combinatie met <i>realtime</i> PCR (RT-qPCR)	411
7.2.3 <i>Inverse</i> PCR	412
7.2.4 <i>Site-directed</i> mutagenese	414
7.2.5 <i>Bridge</i> PCR	416
7.3 Kloneren van genen	419
7.3.1 Inbouw genen in bacteriële plasmiden	419
7.3.2 Transformatie	420
7.3.3 Selectie gemodificeerde bacteriën	422
7.3.3.1 Selectie-techniek op basis van antibioticumresistentie	422
7.3.3.2 Blauw-wit <i>screening</i>	422
7.3.4 RNA-vorming in gemodificeerde bacteriën	426
7.3.5 cDNA	426
7.3.6 Plaatsing in een vector	427
7.4 Transgene planten en dieren	428
7.4.1 Transgene planten	428
7.4.1.1 Positie-effect als gevolg van <i>random</i> integratie	430
7.4.2 Transgene dieren	431
7.4.2.1 <i>Knock-out</i> muizen	432
7.4.2.2 <i>Knock-in</i> muizen	438
7.5 CRISPR-Cas	439
7.5.1 CRISPR	439
7.5.1.1 <i>spacer</i> DNA	439
7.5.1.2 <i>Short Palindromic Repeats</i>	440
7.5.1.3 crRNA	441
7.5.1.4 <i>spacer</i> RNA	443

7.5.2	CRISPR-Cas systeem	443
7.5.2.1	Cas-genen	443
7.5.2.2	Cas-eiwitten	444
7.5.2.3	Archivering <i>spacer</i> DNA	445
7.5.3	Moleculaire wedloop	447
7.5.4	CRISPR-Cas9 systeem	447
7.5.4.1	Het begeleidend RNA	448
7.5.4.2	Cas9-eiwit	449
7.5.4.3	Ongewenst DNA	451
7.5.4.4	PAM (<i>Protospacer adjacent motif</i>)	451
7.5.4.5	Werkwijze	452
7.5.4.6	sgRNA voor gebruik in eukaryoten	453
7.5.4.7	<i>Genome engineering</i>	455
7.5.4.8	Herstel van de dubbele strengbreuk (DSB)	456
7.5.4.9	sgRNA voor gebruik in diploïden	458
7.5.4.10	CRISPR-MCR-techniek	461
7.5.5	Vervolgonderzoek naar Cas-effectoren	462
7.5.5.1	Indeling in klassen en typen	463
7.5.5.2	Type indeling	463
7.5.5.3	<i>Class2</i> Type II Cas9	464
7.5.5.4	<i>Class2</i> Type V Cas12	464
7.5.5.5	<i>Class2</i> Type VI Cas13	468
7.6	Genenonderzoek en -detectie	470
7.6.1	FISH op DNA	470
7.6.1.1	<i>Chromosome painting</i>	471
7.6.2	FISH op RNA	471
7.6.3	<i>Short Tandem Repeat</i> analyse	472
7.6.4	DNA-microarray	474
7.6.4.1	Kankeronderzoek	475
7.6.4.2	Patientendiagnostiek	476
7.7	<i>Base sequencing</i>	477
7.7.1	<i>Sequencing</i> volgens Sanger	477
7.7.2	<i>Next generation sequencing</i>	481
7.7.2.1	<i>Pyrosequencing</i>	482
7.7.2.2	MPSS: <i>massively parallel signature sequencing</i>	483
7.7.2.3	<i>Ion semiconductor sequencing</i>	483
7.7.2.4	SMS: <i>single molecule sequencing</i>	484
7.7.3	<i>Third generation: Nanopore Sequencing</i>	485
7.7.4	Tot slot wat betreft <i>sequencing</i>	489

7.8 Eiwitonderzoek	490
7.8.1 Samenstellende aminozuren	490
7.8.2 Aminozuurvolgorde	491
7.8.3 Eiwit als antigeen	491
7.8.3.1 Primaire antilichamen	492
7.8.3.2 Secundaire antilichamen	492
7.8.3.3 Polyklonaal en monoklonaal antilichaam	494
7.8.4 Immunoblotting	495
7.8.5 ELISA	496
7.8.5.1 De directe methode	497
7.8.5.2 De indirecte methode	499
7.8.5.3. De Sandwich methode	499
7.8.5.4 De competitieve (blocking) methode	501
7.8.5.5 Antilichaam-titerbepaling	502
7.8.6 3D-structuren van eiwitten	503
7.8.7 Tot slot	503

Bronnen en index **507**

Geraadpleegde / aanbevolen boeken	509
Index	511

Voorwoord

Mijn interesse voor de moleculaire celbiologie is terug te voeren op mijn opleiding Tandheelkunde. Na mijn pensionering kreeg ik ruimschoots de tijd deze sluimerende belangstelling opnieuw leven in te blazen. Iets wat bedoeld was als ‘een studie’, heb ik verricht aan de hand van de bestaande literatuur. Om de opgedane kennis eigen te maken en ter beschikking te houden werkte ik met uittreksels. Op het moment dat ik mijn goede vriend en bioloog Frans Cupedo vertelde over dit initiatief, bood hij mij aan de door mij opgestelde teksten te reviewen.

Een volgende bijzonderheid was mijn ontmoeting met Feike van der Leij. Slechts één persoonlijke ontmoeting en een broodje kaas in Ede bleken voldoende om de doelstelling van mijn inspanningen op te waarderen naar het niveau van het schrijven van een Nederlandstalig boek met als titel *De bouwstenen van het leven*. Feike heeft als medeschrijver en inspirator van het eerste uur een essentiële bijdrage geleverd aan de totstandkoming van wat er nu ligt. De verkorte, schematische schrijfwijze die tot dan toe de teksten kenmerkten werden vervangen door goedlopende zinnen als onderdeel van een didactisch verantwoorde opzet met een voor de lezer verteerbare flow.

Het scherp formuleren en afbakenen van begrippen binnen de context van een didactisch verantwoord geheel én de bewaking van de kwaliteit daarvan is in eerste instantie voornamelijk op ‘het bordje’ van Frans Cupedo terecht gekomen. Hij heeft zich met ziel en zaligheid verbonden aan het project en heeft op basis van zijn kennis en ervaring in combinatie met een bijna onuitputtelijk geduld sturing gegeven tijdens de beginfase van het proces. Hem komen veel eer en credits toe. Zelf vindt Frans dat hij ‘maar wat heeft bijgeschaafd’ en dat zijn bijdrage geen verdere vermelding rechtvaardigt.

De uiteindelijke samenwerking met Feike is ronduit fantastisch geweest. Vanuit zijn ambitie om ooit een Nederlandstalig boek over dit onderwerp te schrijven heeft hij, met respect voor wat er al lag, het bestaande project onder zijn hoede genomen. Hij heeft het project naar een hoger niveau getild en heeft daarmee de norm en standaard gesteld. Hij heeft zijn invloed en zijn netwerk aangewend om het manuscript in wording al in een vroeg stadium te toetsen. Het is er alleen maar beter op geworden. Heel bijzonder hoe wij elkaar gevonden hebben en waartoe het heeft geleid. Ik ben Feike om dit alles werkelijk heel veel dank verschuldigd.

Ik heb altijd voor ogen gehouden dat ik dit fascinerende verhaal van het leven aan mijn kinderen zou moeten vertellen. Juist daarom zijn ze vanaf het begin betrokken geweest. Vincent heeft me erg geholpen bij de vervaardiging van de illustraties en Kathelijne heb ik vele teksten voorgelegd ter toetsing.

Een speciaal woord van dank voor mijn partner die heel wat persoonlijke aandacht heeft moeten ontberen, doordat ik regelmatig betrekkelijk autistisch in mijn tunneltje geparkeerd stond. Elma, heel erg bedankt dat je het altijd op hebt willen brengen om mij mijn gang te laten gaan. Het moest even. En jij weet waarom...

Nuenen,
November 2013

Jan Prinsen

Het komt niet vaak voor dat men in contact wordt gebracht met iemand die al een tijdje droomt over iets waar men zelf ook van droomt. De droom: het schrijven van een boek over de essentie van het leven, de moleculaire celbiologie, voor een publiek dat in de Nederlandse taal eigenlijk zeer slecht bediend wordt. Dat publiek is met name een groeiende groep HBO-ers die een biologie-gerelateerde technologische opleiding volgen, maar ook andere geïnteresseerden die de snelle ontwikkelingen voorbij zien komen, en die dat willen kunnen plaatsen.

Degene met wie ik in contact werd gebracht is uiteraard Jan Prinsen. Een oprecht geïnteresseerde 'leek' die al geboeid was geraakt door de materie voordat hij daar meer tijd voor kreeg na zijn pensionering als tandarts. En dat maakt de aanpak van dit boek uniek. Het is nu eens éérs opgeschreven door iemand die niet tot diep in de materie is geschoold, en dus geen expert *pur sang* genoemd kan worden, maar wél weet hoe je het op moet schrijven om het voor nieuwkomers begrijpelijk te houden. Daarbij heeft Jan een klassieke aanpak gekozen die aanvankelijk niet de mijne was (ik ben meer van: gooi ze maar in het diepe, dan gaan ze half verzuipen en komen zo nu en dan even boven om heel diep adem te halen) maar die wel een geweldig heldere structuur heeft waar je als lezer je voordeel mee kunt doen. En waar, denk ik, behoefte aan is.

Gaandeweg werden mijn bemoeienissen intensiever, ging het natuurlijk behoorlijk wat tijd kosten, en groeide het boek tot wat het nu is. Na een proefuitgave met evaluatie door studenten en docenten van de Life Sciences & Technology opleidingen in Leeuwarden (waar ik naast lector ook docent moleculaire biologie ben) konden de puntjes op de i worden gezet. Dank aan allen die dit mogelijk hebben gemaakt.

Het is me een eer om Jan als medeauteur te mogen vergezellen.

Leeuwarden,
November 2013

Feike van der Leij

Voorwoord bij de derde druk

Zes jaar nadat de eerste druk van dit boek het licht zag raakte ook de tweede druk bijna uitverkocht. Tijd om ons te buigen over de vraag: wat doen we met de derde druk? Aanvankelijk dachten we vrij eenvoudig enkele kleine storende foutjes te kunnen bijwerken en een in 2017 online verschenen hoofdstuk te kunnen toevoegen aan het boek. Gaandeweg bleek dat we daar toch te licht over hadden gedacht en dat we systematisch enkele manieren van uitleg, met name in de opbouw van figuren, wilden verbeteren. Daarbij is veel aandacht besteed aan het zo duidelijk mogelijk illustreren van metabole reacties, waarbij reacties beter ‘kloppend’ zijn gemaakt en de schrijfwijze van vaak terugkerende reactiecomponenten consistent is gemaakt. Het boek is uitgebreid met een hoofdstuk over transgene planten en dieren, met een hoofdstuk over *CRISPR-Cas*-technologie, en met uitbreidingen van hoofdstukken over *DNA-sequencing* en over eiwittechnologie. We zijn daarbij geholpen door Nelleke Kreike. Zij is lector Groene Biotechnologie aan Hogeschool Inholland en mag gezien worden als expert op het gebied van *DNA-sequencing*, transgene planten en *CRISPR-Cas*-technologie. Gerda Horst, docent bij Life Sciences & Technology bij hogeschool Van Hall Larenstein en NHL Stenden in Leeuwarden, heeft ons van waardevolle input voorzien waar het gaat om eiwitbepalingen via verschillende vormen van ELISA. Studenten van diverse mbo-, hbo- en wo-instellingen hebben tijdens hun studie een aantal fouten en onduidelijkheden opgemerkt die we hebben verholpen. We danken de docenten die ons hiervan in kennis stelden.

De uitbreidingen, aangepaste passages en verbeterde illustraties hebben het boek beter en completer gemaakt. Deze derde druk kan weer een aantal jaren mee!

Nuenen en Amsterdam,
oktober 2020

Jan Prinsen en Feike van der Leij

Ten geleide

De bouwstenen van het leven gaat over de biologie van de cel. De biologie van de cel beschreven op het niveau van de moleculen, tot op het niveau van de atomen en zelfs tot op het niveau van de subatomaire deeltjes (protonen en elektronen).

Het boek is geschreven met als doel:

1. Het vakgebied dat ook wel bekend staat als *Life Sciences* toegankelijker te maken voor een breder publiek. De moleculaire celbiologie is een bruisende en actuele wetenschap met een vergaande maatschappelijke impact. Wat daar gebeurt gaat ons allemaal aan.
2. Het boek wil een opmaat zijn naar de grote Engelstalige standaardwerken, en kan daarnaast ook als ‘second opinion’ worden gebruikt. Dit kan echt helpen om de soms abstracte wereld van moleculen en cellen beter te begrijpen.
3. Het boek wil (mede door een uitgebreide index) fungeren als ‘het groene boekje’ voor iemand die even niet meer paraat heeft hoe je een woord ook weer schrijft/spelt, of wat ermee bedoeld wordt. Dat groene boekje past velen: biologen, docenten, studenten, medici, paramedici, etc.

Het is een samenvatting van een literatuurstudie die als inleiding goed kan werken. Een puntsgewijze vrij geschematiseerde behandeling van zaken, geschreven en getekend op het niveau van de geïnteresseerde leek/student. Het verhaal gaat niet ten onder aan vakjargon, maar het gebruik daarvan is soms niet te vermijden. De vaktaal wordt om die reden juist helder toegepast, tot op details die de lezer zelf in de hand heeft omdat er gewerkt wordt met ‘tekstboxen’ en ‘voetnoten’.

De voetnoten spreken voor zich. De tekstboxen zijn geplaatst in een kader met een gele achtergrond. Zij zijn facultatief bedoeld. Zij verschaffen iets meer informatie voor de lezer die dat wenst. Het centrale verhaal (witte achtergrond) kan dus ook begrepen worden zonder gebruik te maken van deze tekstboxen.

In het boek worden de Nederlandstalige begrippen vaak gevolgd door de Engelstalige variant (cursief en tussen haakjes). De introductie van deze Engelstalige begrippen op dit niveau is van waarde wanneer ook Engelstalige standaardwerken gelezen gaan worden.

1.1 Atomen en moleculen

Atomen en moleculen hebben hun plaats binnen cellen en levende organismen:

1. Organismen worden gevormd door cellen.
2. Cellen worden gevormd door moleculen.
3. Moleculen worden gevormd door atomen.
4. Atomen worden gevormd door subatomaire deeltjes.

Tijd, ruimte, energie en materie zijn vermoedelijk ongeveer 13,7 miljard jaar geleden ontstaan bij een gebeurtenis die de Oerknal wordt genoemd. In het prille begin was het heelal oneindig dicht, onvoorstelbaar heet en bevatte het uitsluitend energie. Maar al binnen een fractie van een seconde kwamen uit de energie enorme aantallen elementaire deeltjes voort. De deeltjes (materie) veranderden door interacties met hun eigen antideeltje ook voortdurend weer terug in energie. In het begin is er een dynamisch evenwicht tussen energie en materie.

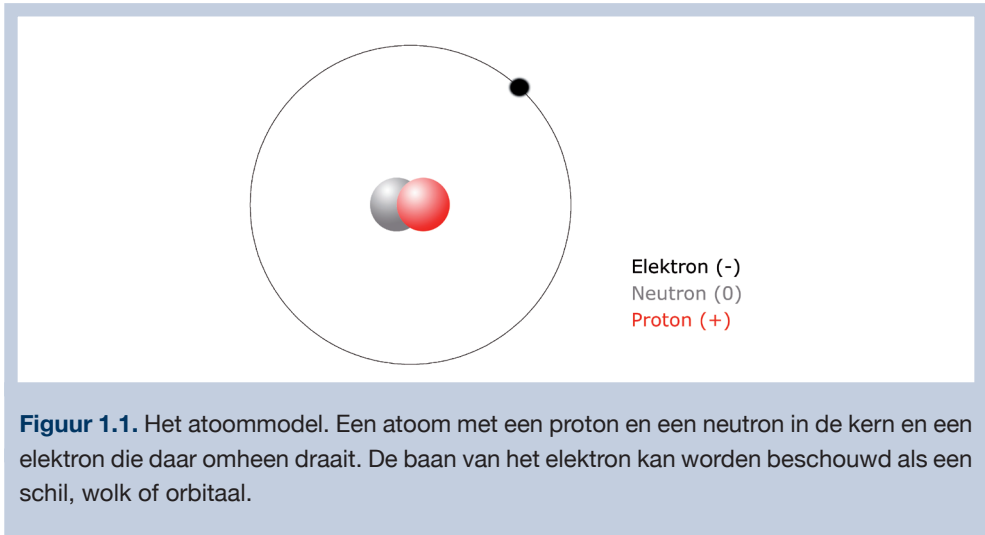
Een volgende stap in de ontwikkeling van het jonge heelal was dat verschillende elementaire deeltjes zich samenvoegden tot zwaardere deeltjes. Er ontstonden **protonen, neutronen en elektronen**. Vervolgens vormden de neutronen samen met de protonen de eerste atoomkernen (waterstof, helium en lithium). Toen de temperatuur in het heelal voldoende was gedaald, begonnen de atoomkernen elektronen in te vangen. En tenslotte was na een half miljoen jaar het heelal zo ver afgekoeld dat uit de atoomkernen en elektronen de eerste **atomen** ontstonden. Alle andere atomen zijn vervolgens ontstaan als gevolg van stervorming en de kernfusies die dat tot gevolg had.

1.1.1 Atomen

Elk **atoom** bestaat uit **protonen** en **neutronen**¹ in de kern met **elektronen** die daar omheen draaien (Figuur 1.1). Protonen, neutronen en elektronen zijn **subatomaire** deeltjes. Elk proton heeft een **positieve lading**. Elk elektron heeft een **negatieve lading**. Neutronen hebben geen lading. In een atoom zijn normaal gesproken evenveel protonen als elektronen aanwezig, zodat de elektrostatische lading gelijk is aan nul. Met andere woorden: als het aantal protonen in een atoom bekend is, staat het aantal elektronen vast (Tekstbox 1.1).

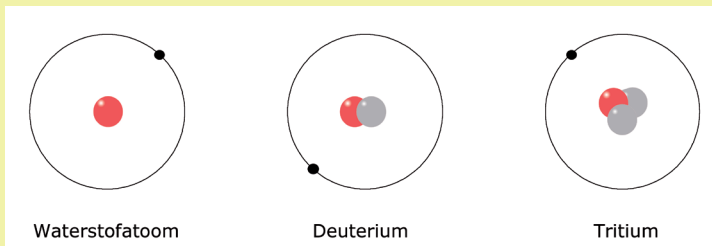
¹ Het waterstofatoom vormt op deze regel als enige een uitzondering. Het waterstofatoom heeft in de kern alleen één proton en géén neutron. Om dat ene proton draait één elektron.

1.1 Atomen en moleculen



Tekstbox 1.1. Isotopen.

Het aantal neutronen kan per atoom variëren. Elementen met verschillende verhoudingen protonen en neutronen, maar met eenzelfde hoeveelheid protonen, noemen we isotopen van elkaar. Hieronder staan behalve het waterstofatoom (één proton met daar omheen één elektron) twee isotopen van waterstof: deuterium en tritium.



Isotopen. Een waterstofatoom (links) en de twee isotopen van waterstof (midden en rechts).

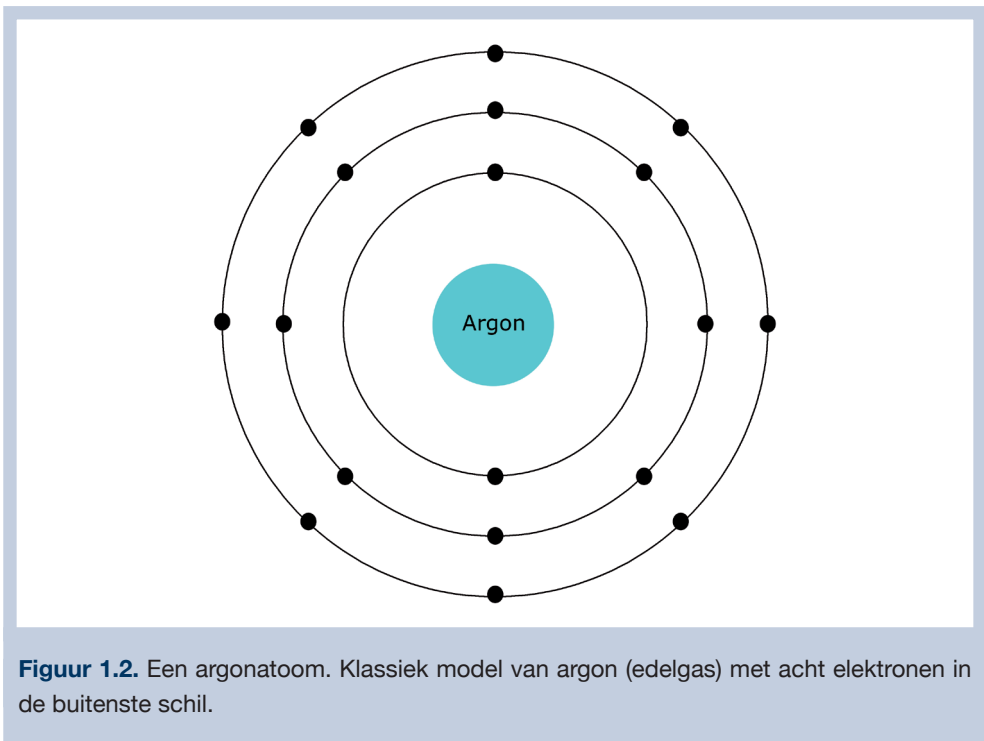
De kern van deuterium ('zwaar waterstof') bestaat uit één proton en één neutron. Een dergelijke combinatie wordt aangeduid als een deutron. De kern van tritium bestaat uit één proton met twee neutronen. Een zogenaamd triton. Het gegeven dat elke kern maar één proton heeft, bepaalt dat er in dit voorbeeld sprake is van verschillende isotopen van waterstof.

Er bestaan twee soorten isotopen die vele toepassingen kennen:

1. De radioactieve isotopen vervallen (door kernsplijting) met een zekere halfwaardetijd en kunnen voordelige toepassingen hebben in de medische diagnostiek, maar ook nadelige effecten zoals bij kernrampen.
2. De stabiele isotopen zijn ongevaarlijk (vervallen niet) en zijn zeer bruikbaar voor onderzoek naar belangrijke levensprocessen zoals de stofwisseling bij mensen.

In het gegeven voorbeeld geldt deuterium als stabiel isotoop en is tritium radioactief.

De elektronen draaien continu om de kern van een atoom in **orbitalen**. Een orbitaal kan gedefinieerd worden als de ruimte rondom de kern waar een elektron met een bepaalde energie het meest waarschijnlijk aanwezig is. Orbitalen zijn er in verschillende typen afhankelijk van de verschillende energieniveaus (Tekstbox 1.2). Het energieniveau van een orbitaal wordt aangeduid met het zogenoemde **hoofdkwantumgetal** n , waarbij $n=1, 2, 3$, enz. De verschillende orbitaaltypen hebben ieder hun specifieke vormen. Zo ontstaan groepen van orbitalen die, wat hun energieniveaus betreft, te vergelijken zijn met de elektronenschillen in de klassieke theorie omtrent atombouw. Omwille van de uitleg wordt op dit basisniveau en op deze plaats dit klassieke beeld (Figuur 1.2) van de atombouw (met elektronenschillen) gehanteerd. Het aantal protonen in de kern (Tekstbox 1.3) van een atoom bepaalt wat voor **element** (atoomsoort) het is.

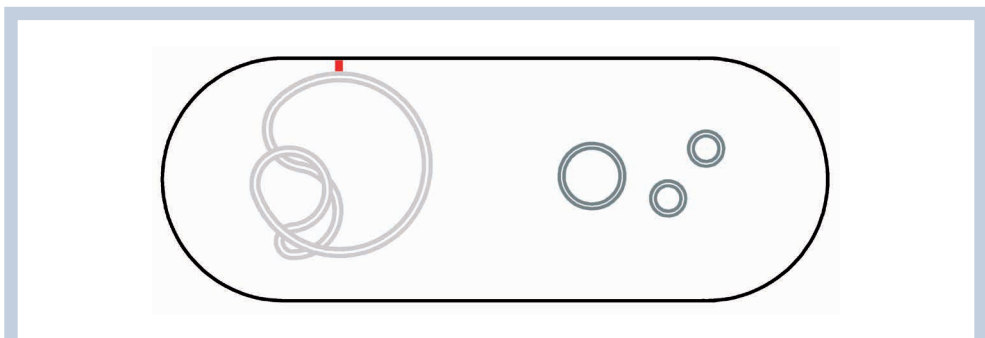


2.3 Celstructuren prokaryoten

Het meest in het oog springend verschil met de eukaryote cel is het feit dat de prokaryote cel **geen** specifiek afgebakende **kern** bevat. In de prokaryote cellen bevindt het DNA zich in het cytoplasma. Vaak min of meer geconcentreerd in een gebied dat de **nucleoïde** (kernachtige) wordt genoemd. Het komt veel voor dat er **meerdere nucleoïden** aanwezig zijn in één bacterie. De celdeling houdt dan geen gelijke tred met het tempo van verdubbeling van het circulaire dsDNA. Dit verschijnsel treedt vooral op in snel groeiende culturen.

Er is (per nucleoïde) slechts één DNA-molecuul, waarvan de uiteinden aan elkaar zijn gekoppeld tot een ring. We spreken in dat geval over **circulair dsDNA**⁷⁴. Algemeen wordt dit DNA aangeduid met de term **bacterieel DNA**.

Het circulair dsDNA (lichtgrijze lus in Figuur 2.25) is op één specifieke plaats verbonden aan de celmembraan. Dit verankeringspunt wordt een **mesosoom** (rood in Figuur 2.25) genoemd. Mesosomen spelen een bepalende rol bij de celdeling.



Figuur 2.25. Schema prokaryote cel met chromosoom en plasmiden. Prokaryoten bevatten een chromosoom (grijs), dat vaak via een mesosoom (rood) is verankerd aan de celmembraan (zwart, omgeven door een hier niet weergegeven celwand). Kleinere circulaire DNA structuren heten plasmiden (donkergrijs) en komen in meerdere kopieën per cel voor.

Een bacterie kan ook een of meerdere **plasmiden** bevatten (Tekstbox 2.4). In Figuur 2.25 zijn de plasmiden donkergrijs gekleurd. Plasmiden bestaan net als het chromosomale DNA ook uit circulair dsDNA, maar zijn veel kleiner en komen soms in hoge kopie-aantallen voor (tot wel honderden plasmidekopieën per bacteriecel).

⁷⁴ De toevoeging 'ds' (*double-stranded*) verwijst naar de dubbelstrengstructuur van het DNA (zie paragraaf 1.4).

Tekstbox 2.4. Conjugatie.

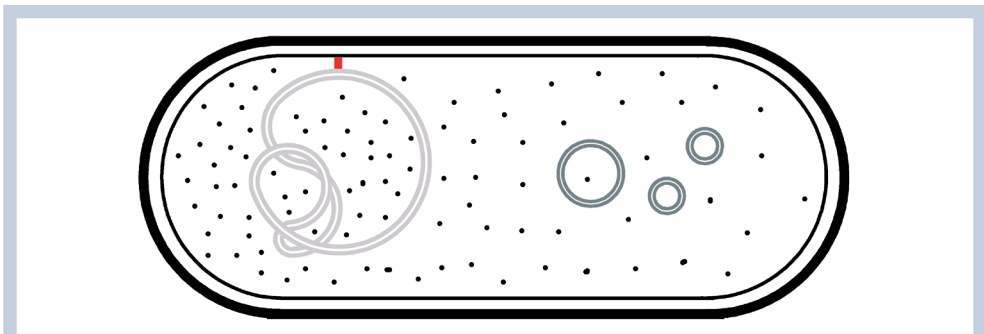
De plasmiden bestaan uit circulair dsDNA. Een bacterie die over plasmiden beschikt kan deze uitwisselen met andere bacteriën. Dit fenomeen staat bekend als conjugatie wanneer het rechtstreeks van cel tot cel gebeurt. Conjugatie is een voorbeeld van *horizontal gene transfer*. Dit soort uitwisseling van erfelijk materiaal is binnen de groep van de prokaryoten eerder regel dan uitzondering.

Het F-plasmide bevat informatie waardoor conjugatie mogelijk wordt via het zogenaamde F-pilus of sexpilus (hoewel van echte sexuele voortplanting geen sprake is). Het F-pilus wijkt af van gewone pili: volgens de ene theorie is het een slurf-achtig transportkanaaltje dat een verbinding maakt tussen de cellen waardoorheen DNA vervoerd kan worden, terwijl een andere theorie een rol voor de F-pili ziet in het bijeenbrengen van twee cellen waartussen rechtstreeks contact wordt gemaakt.

Plasmiden kunnen onder andere gebruikt worden in bepaalde recombinant-DNA-technieken om er (een deel van) het DNA van een ander organisme mee te vermenigvuldigen.

De prokaryote cellen zijn kleiner, en eenvoudiger georganiseerd dan de eukaryote cellen:

- **Geen** indeling in **compartimenten**. Er zijn dus ook **geen nucleaire membranen** aanwezig.
- **Geen organellen** zoals:
 - mitochondriën;
 - endoplasmatisch reticulum;
 - Golgi-apparaat;
 - lysosomen.
- Op een enkele uitzondering na (mycoplasma) komen in het celmembraan **geen sterolen** voor. Daar staat tegenover dat bijna alle prokaryoten naast een celmembraan ook nog eens beschikken over een **celwand** (zoals Figuur 2.26 laat zien).



Figuur 2.26. De prokaryote cel (1). Naast een chromosoom (grijs), mesosoom (rood) en plasmiden (donkergrijs) komen er in de prokaryote cel vrije ribosomen voor, en is de membraan omgeven door een celwand.

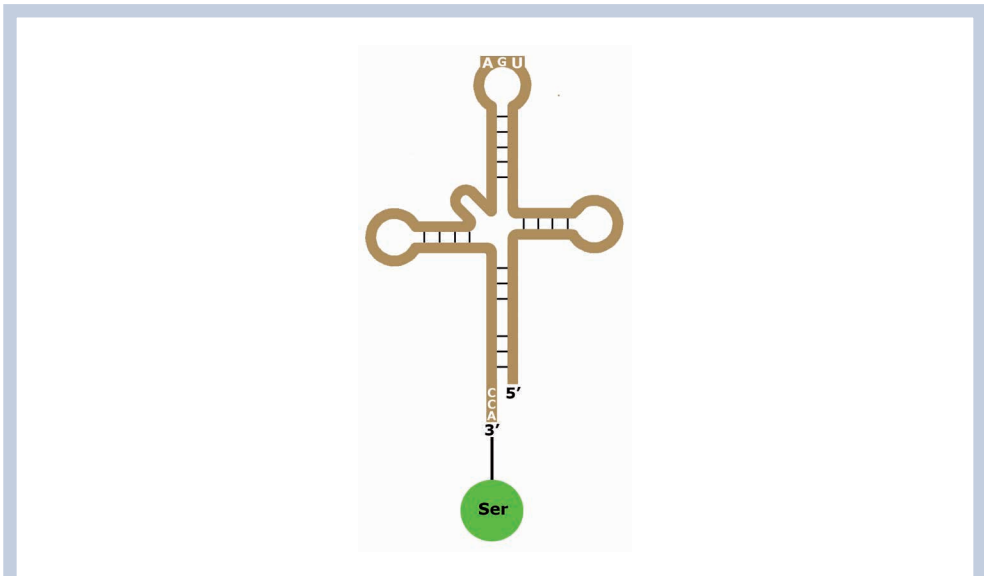
3.3 Eiwitsynthese

molecuul gelegen in de oksel van 2 *stems* onderscheiden we nog een zogenoemde **variabele loop**. Meer specifiek is in Figuur 3.41 het tRNA-molecuul getekend dat het aminozuur serine op sleeptouw neemt.

Twee essentiële locaties in het tRNA-molecuul vragen aandacht:

1. Het **3' uiteinde**¹²¹ eindigt in alle tRNA met de basenvolgorde CCA.
2. Het **anticodon** (een triplet code in de 'bovenste' *loop* van een tRNA-molecuul) dat zich volgens de regels van de basenparing kan koppelen aan het codon in het mRNA (Tekstbox 3.9).

Het CCA-uiteinde van het tRNA-molecuul neemt een aminozuur op sleeptouw. De basenvolgorde in het anticodon (bovenin) garandeert daarbij een versleuteling met dat specifieke aminozuur. Anders gezegd: bij een bepaalde basenvolgorde in het anticodon hoort een specifiek aminozuur. Er is sprake van een 'directe verwantschap'.



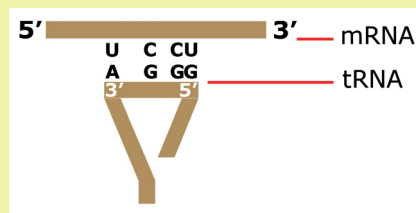
Figuur 3.41. Een tRNA-molecuul als drager van een aminozuur. Dit tRNA (bruin) heeft een anticodon (volgorde 3'AGU5') die hoort bij het aminozuur (groen) serine (Ser) dat aan de 3'-OH van de CCA volgorde koppelt. De klaverbladstructuur van tRNA is een gevolg van plaatselijke basenparing (met lijntjes aangegeven).

¹²¹ Het mRNA-schrift (codon) en het tRNA-schrift (anticodon) wordt gelezen in de 5'→3'-richting. In de synthetische richting. Sprekend over aminozuren is het echter gebruikelijk de bijbehorende codons te benoemen. Het mRNA-schrift is de voertaal.

Tekstbox 3.9. De *wobble* positie.

Indien alleen de perfecte Watson-Crick basenparing acceptabel zou zijn voor een codon-anticodon binding, dan zouden de cellen exact 61 verschillende tRNA soorten moeten bevatten. Maar vaak wordt dat aantal niet gehaald. Een verklaring daarvoor is te vinden in het vermogen van een enkel tRNA anticodon (maar niet noodzakelijk elk tRNA) om meer dan één codon te herkennen. Deze bredere herkenning kan ontstaan door een 'niet-standaard' basenparing in de zogenaamde *wobble* positie.

De *wobble* positie wordt omschreven als de derde (3') base in het mRNA (codon) en de overeenkomstige eerste (5') base in het tRNA (anticodon). Belangrijk daarbij is het G-U basenpaar dat bijna net zo goed 'past' als het standaard G-C paar. Het een en ander overeenkomstig de figuur.

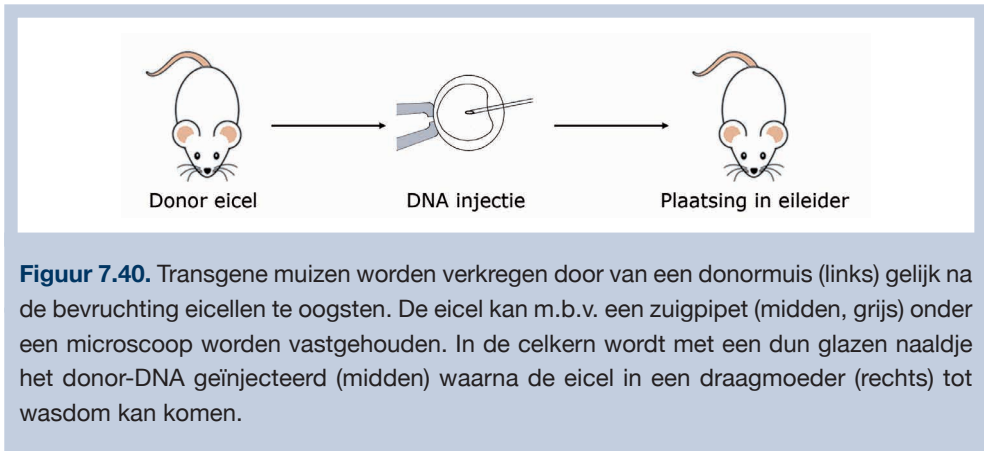


De *wobble* positie. Aan de 3'-zijde van het codon en de 5'-zijde van het anticodon bevindt zich de *wobble* positie. De derde letter van het codon is om die reden minder strikt voor de vertaling van codon naar aminozuur. Het mRNA (bruin, boven) wordt evengoed herkend door een tRNA (bruin, onder) met anticodon 5'GGA3' wanneer het codon UCC zou zijn of UCU (in beide gevallen wordt dit vertaald naar serine (zie tabel in Tekstbox 3.6).

Samenvattend

- ▶ Tijdens de transcriptie wordt aan de hand van een coderend stuk van het DNA een complementair en antiparallel mRNA-molecuul gesynthetiseerd.
- ▶ Het tRNA bevat een anticodon én een daarbij behorend aminozuur. De tRNA's zijn door de koppeling van hun anticodon aan het codon (van het mRNA) de decodeersleutels die de vertaling van genetische code naar eiwit mogelijk maken.
- ▶ De codonvolgorde in het mRNA-molecuul bepaalt de aminozuurvolgorde in het eiwit.

7.4 Transgene planten en dieren



Indien dit DNA in het genoom integreert zal de gehele muis, die zich uit die eicel ontwikkelt transgeen zijn. De muis is nu ‘solide’ (alle cellen zijn genetisch identiek) voor de extra eigenschap, en het transgen zit idealiter op een enkele (door toeval bepaalde) plek in het genoom.

Ook nu zal (net als bij de transgene planten) de mate van expressie van het transgen afhangen van de plek in het genoom waar het is en kan onbedoeld een allel van een endogeen (reeds in de muis aanwezig) gen zijn uitgeschakeld.

De aanvankelijk hemizygot³²⁷ muis kan in een kruisingsprogramma worden ingezet om zo een muizenkolonie aan te leggen waarin de eigenschap homozygoot wordt verkregen. Alle muizen zullen dan het extra gen in vergelijkbare mate tot expressie brengen.

Transgene muizen kunnen relatief snel proefdieren opleveren die wetenschappers iets kunnen ‘vertellen’ over de fysiologische functie van een genproduct. Of ze kunnen een verandering betekenen waardoor de muis beter lijkt op de mens (om zo voor bepaalde studies een beter model op te leveren dan gewone muizen). In het laatste geval spreekt men van ‘gehumaniseerde muizen’.

7.4.2.1 Knock-out muizen

Wanneer men gericht een gen uitschakelt spreekt men van een *gene knock-out*. Muizen waarbij dat is gedaan noemen we **knock-out muizen** ofwel **KO-muizen**. Dit zijn weliswaar transgene muizen maar zo worden ze niet genoemd. In de vorige paragraaf is al gezegd dat de term transgene muizen min of meer is gereserveerd³²⁸ voor de muizen met een extra, een toegevoegd gen.

³²⁷ Zie Paragraaf 4.3.2.2.

³²⁸ In het spraakgebruik is het zo in zwang geraakt. Er bestaan op dit punt geen definitieve afspraken. In dit boek volgen we de trend om de term transgene muis te beperken tot de muizen met een toegevoegd gen.

Het verkrijgen van KO-muizen is een stuk lastiger dan het verkrijgen van transgene muizen (met een extra gen). Men moet namelijk plaatsgericht (*site-directed*) het DNA in de zoogdiercel veranderen. Dat vereist een verandering op basis van alléén homologe recombinatie (HR). Alleen homologe recombinatie garandeert een daadwerkelijke *knock-out* van een bepaald gen.

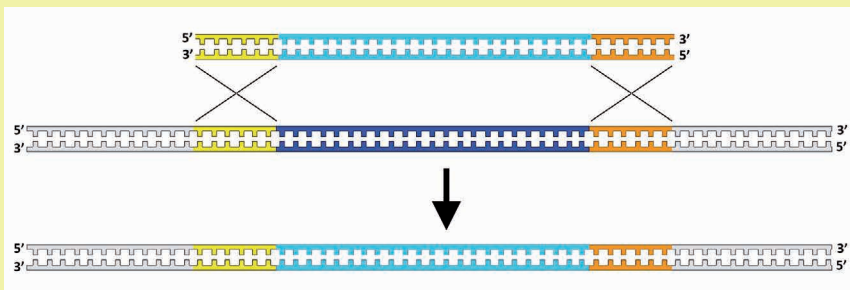
Dit plaatsgericht (*site-directed*) veranderen van het DNA wordt ook wel **targeted disruption** of **targeted replacement** genoemd. Om dit voor elkaar te krijgen is enige voorbereiding in het laboratorium nodig. Daar moet eerst een DNA-construct worden gemaakt van een bij voorbaat uitgeschakeld gen van de muis. Eigenlijk maakt men een recessief allel (bijvoorbeeld via voorbereidingen in *E. coli* of geheel synthetisch). Dat allel moet de plek innemen van het endogene (dat wil zeggen reeds in de muis aanwezige) allel.

Als uitgangspunt worden embryonale stamcellen (ES-cellen) gebruikt. Deze stamcellen moeten niet alleen ongedifferentieerd³²⁹ zijn maar moeten tijdens de *knock-out* procedure ongedifferentieerd blijven.

Tekstbox 7.3. Homologe recombinatie.

Het principe waarop **targeted replacement** (gerichte vervanging van een gen) berust heet ook wel **homologe recombinatie**. Net als bij crossing-over tijdens de Meiose I (zie Paragraaf 4.2.5) kunnen dubbele strengen DNA-uitwisseling ondergaan wanneer homologe dubbele strengen zich aandienen. De machinerie waarmee dat gebeurt is ingewikkeld, we beperken ons tot de toepassing. De plek waar een **homologe recombinatie** plaatsvindt wordt in figuren aangeduid met een kruis. Voor **targeted replacement** zijn twee van dergelijke homologe recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk. Het stuk DNA dat zich tussen de twee kruisen bevindt wordt uitgewisseld.

In werkelijkheid zijn de homologe dubbele strengen (geel en oranje in de figuur) circa 600 bp tot 1 kb lang.



Gerichte vervanging van stukken DNA kan m.b.v. twee homologe recombinatie gebeurtenissen (elk aangegeven met een kruis) worden bereikt. De linker arm (geel) en rechter arm (oranje) zijn elk identiek aan het ontvangende DNA. Het tussengelegen lichtblauwe gedeelte kan daarmee het endogene DNA (donkerblauw) vervangen. Het resultaat (onder de pijl) is een **targeted replacement**.

³²⁹ Niet tot bepaalde weefsel-specifieke cellen uitgedifferentieerd.

7.5.2.2 Cas-eiwitten

De *Cas*-genen coderen voor *Cas*-eiwitten (ook wel **Cas-effectoren** genoemd). De *Cas*-eiwitten beschikken over **endonuclease domains** en zijn in staat ongewenst DNA in stukken te knippen en zo te vernietigen. Het zijn dus **DNA endonucleasen**³⁴³. Binnen *Escherichia coli* spelen twee *Cas*-eiwitten een belangrijke rol: het **Cas1-eiwit** en het **Cas2-eiwit**.

Cas1-eiwit

CRISPR-associated protein 1 (Cas1) is een specifiek endonuclease. Het herkent vreemd DNA, hecht er zich aan en knipt er een stuk uit voor opslag in *CRISPR*.

Cas2-eiwit

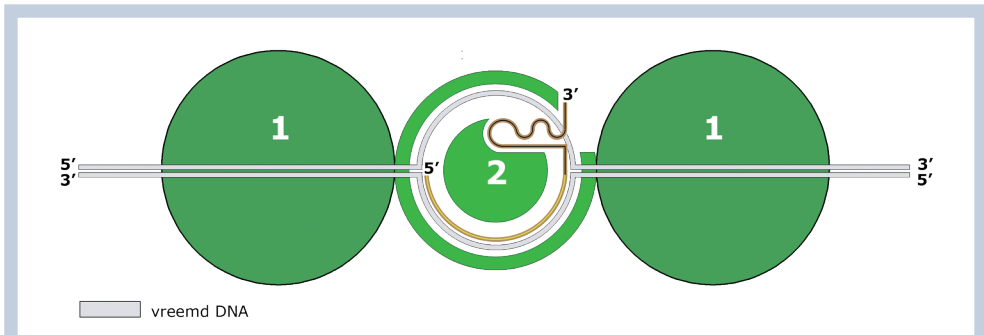
Het *Cas2*-eiwit onderscheidt zich van het *Cas1*-eiwit doordat het zich kan binden aan een crRNA-molecuul. Er ontstaat daardoor een **eiwit-RNA complex** (Figuur 7.51).



Figuur 7.51. *Cas2*-eiwit met crRNA. Het *Cas2*-eiwit (groen; de buitenste en binnenste groene cirkel behoren tot één eiwit) met daarin een crRNA-molecuul (geel en zwart) dat als speurneus fungeert.

Dit eiwit-RNA complex vormt (binnen *Escherichia coli*) een brug tussen twee *Cas1*-eiwitten waardoor er een zogenaamde **multi-subunit groep** (zie Figuur 7.52) ontstaat. Het gaat hierbij om een structurele en functionele samenwerking. Het aanwezige crRNA stuurt de *multi subunit* groep richting het vreemde DNA. Zodra het crRNA het vreemde plasmide- of virale DNA herkent zal het 5'*spacer*RNA3' (als onderdeel van het crRNA) hybridiseren met dat vreemde DNA.

³⁴³ Zij verenigen in zich de werking van een **helicase** en van een **nuclease** en zijn dus in staat om dsDNA te 'ontrollen' en te openen (door de verbindende waterstofbruggen te verbreken) om vervolgens nucleotiden uit de keten los te knippen. Het is echter nog niet voor alle *Cas*-eiwitten bekend of zij inderdaad endonucleasen zijn.



Figuur 7.52. Multi subunit complex met crRNA en DNA. Vreemd DNA (grijs) wordt plaatselijk enkelstrengs gemaakt en daarbij gescand door het Cas2-crRNA complex. Wanneer een eerder ontmoete sequentie wordt herkend (complementair aan de gele *spacer*) wordt het DNA afgebroken door de nucleasedomeinen van de Cas2- en Cas1-eiwitten (groen).

Vervolgens wordt het DNA geknipt door de endonuclease domeinen van het trio *Cas*-effectoren.

Met als doel:

- om het ongewenste DNA te elimineren en
- om opnieuw een stuk van dat ongewenste DNA op te nemen in *CRISPR* voor de uitbreiding en verfijning van het geheugen.

Enmaal opgenomen in *CRISPR* heet het insert *spacerDNA*. Meerdere *spacerDNA*'s vormen zo samen een geheugen van opgelopen infecties.

7.5.2.3 Archivering *spacerDNA*

De nieuwe *spacers* worden na uitname uit het vreemde DNA toegevoegd aan het *CRISPR*-archief. Meestal aan de voorkant (5'kant) ervan maar dat hoeft niet per se. Het *CRISPR*-DNA wordt allereerst doorgeknipt ter plaatse van de (voorste) *repeat* op een manier dat er *sticky ends* ontstaan (Figuur 7.53). Er ontstaan twee 3'-overhangen die nog het best te beschrijven zijn als stukken *ss-repeat*. Daartussen vindt de insertie van de nieuwe *spacer* plaats, waarna, met de *ss-repeats* als sjabloon en de vrije uiteinden van de *spacer* als *primer*, door middel van *annealing* en DNA synthese, de ds-structuur van de beide *repeats* weer wordt hersteld.