



Samenvatting

Academiejaar 2021 – 2022

Robbe Decapmaker

In memory of Simp Magnet

Inleiding

De samenvatting van BioTechnologie. De source code is te vinden op Github.
<https://github.com/dekker1/BioTech>

Dit document is **niet** alles wat je moet kennen van theorie voor het examen. Ik ben niet verantwoordelijk voor jouw resultaat op jouw examen. Het is jouw verantwoordelijkheid om ook nog de andere onderdelen van deze cursus op een degelijke manier te verwerken.

Contributors

Jonathan Valgaeren
Timo Vandevenne

Inhoudsopgave

1 Koolhydraten	6
1.1 Naamgeving	6
1.2 Voorstellingen	7
1.3 Stereochemie	7
1.3.1 Enantiomeren	7
1.3.2 Diastereomeren	9
1.3.3 Glucose	9
1.4 Reducerende koolhydraten	9
1.5 Monosachariden	10
1.5.1 Belangrijke monosachariden	10
1.5.2 Afnamers	11
1.6 Disachariden	12
1.6.1 Belangrijke disachariden	12
1.7 Polysachariden	13
1.7.1 Belangrijke polysachariden	14
2 Lipiden	14
2.1 Biologische functies van lipiden	15
2.2 Vetzuren	15
2.2.1 Structuur	15
2.2.2 (On)Verzadigde vetzuren	15
2.2.3 Cis- en Transvetzuren	16
2.2.4 Omega vetzuren	17
2.2.5 Reacties met vetzuren	17
2.3 Glyceriden	17
2.3.1 Structuur	17
2.3.2 Triglyceriden	18
2.3.3 Reacties	18
2.3.4 Fosfoglyceriden	19
2.4 Niet-glyceride lipiden	19
2.4.1 Steroïden	19
3 Celstructuren	19
3.1 Microscopische observatie van cellen	19
3.2 Celtheorie	19
3.3 Plasmamembraan	20
3.4 2 types cellen	23
3.4.1 Prokaryote cellen	23
3.4.2 Eukaryote cellen	24
3.5 Intracellulaire structuren	24
3.5.1 Nucleus	24
3.5.2 Ribosomen	25
3.5.3 Endomembraansysteem	25
3.5.4 Vacuole	26
3.5.5 Energie-organelen	27
3.5.6 Cytoskelet	28
3.5.7 Centriolen	28
3.5.8 Cilia en flagellen	29
3.6 Extracellulaire structuren	29
3.6.1 Celwand	29
3.6.2 Extracellulaire matrix	29
3.6.3 Juncties tussen cellen	29
3.7 Cellulaire reproductie	30

3.8 Wat met virussen?	30
4 Cases in rode biotechnologie	31
4.1 Wat is rode biotechnologie	31
4.1.1 Diagnostische tests	31
4.1.2 Geneesmiddelenontwikkeling en gentherapie	31
4.1.3 Vaccin ontwikkeling	32
4.2 Case study	32
4.2.1 Welke celtypes	32
4.2.2 Cellen als therapeutica	33
4.2.3 Van cellen naar weefsels	33
4.3 Ingenieurs in rode biotechnologie	33
5 De dynamische cel	33
5.1 Wat is energie?	33
5.2 ATP: energie voor cellen	34
5.3 Metabolische pathways en enzymen	35
5.4 Cellulaire transportsystemen	36
5.4.1 Passief transport	36
5.4.2 Osmose	37
5.4.3 Actief transport	38
5.4.4 Bulktransport	38
6 Energie voor cellen	39
6.1 Cellulaire respiratie	39
6.2 Buiten de mitochondriën: glycolyse	40
6.3 Buiten de mitochondriën: fermentatie	40
6.4 In de mitochondriën	42
6.5 Metabolisme van voeding	43
7 Constructie-biotechnologie	44
7.1 Wat is constructie-biotechnologie	44
7.2 Beton	44
7.2.1 Scheuren herstellen in beton	44
7.2.2 Biologisch zelf-herstellend beton	44
8 Witte biotechnologie: case biobrandstoffen	46
8.1 Wat is witte biotechnologie	46
8.1.1 Fermentatie en bioconversie	46
8.1.2 Biomassa	46
8.2 Biobrandstoffen	46
8.2.1 Bio-ethanol van lignocellulose	46
8.2.2 Productie van biodiesel	48
9 Proteïnen	49
9.1 Inleiding	49
9.2 Aminozuren	49
9.2.1 Structuur en eigenschappen	49
9.2.2 Aminozuren in voeding	49
9.2.3 Niet-proteïnogene aminozuren	50
9.3 Peptidebinding	50
9.3.1 Peptiden en Polypeptiden	50
9.3.2 Chemische en biologische synthese van peptiden	50
9.4 Structuur van proteïnen	51
9.4.1 Primaire, secundaire tertiaire en quaternaire structuur	51
9.4.2 Cofactoren	52

9.4.3 Denaturatie	53
9.5 Voorbeelden en toepassingen	54
9.5.1 Collageen: voorbeeld van structuurproteïne	54
9.5.2 Antistoffen	54
9.5.3 Enzymen	54
9.5.4 Bio-batterijen	54
10 DNA biologie	55
10.1 Functie van DNA en RNA	55
10.1.1 Structuur nucleotiden	55
10.1.2 Primaire, secundaire en tertiaire/quaternaire structuur	57
10.1.3 Functie van DNA en RNA	60
10.2 Genexpressie	60
10.2.1 Centraal dogma	60
10.2.2 DNA replicatie	61
10.2.3 Transcriptie en mRNA processing	61
10.2.4 Translatie	63
10.2.5 Verschillen tussen Prokaryote en Eukaryote cellen	66
10.3 Regulatie van genexpressie	66
10.3.1 Enkele definities	66
10.3.2 Belangrijke factoren in regulatie genexpressie	67
10.4 Voorbeelden en Toepassingen	69
10.4.1 Menselijk genoom	69
10.4.2 Bepaling van microbiële contaminatie met ATP metingen	69
10.4.3 Gebruik van DNA voor data-opslag	69
11 Recombinant DNA and genomics	70
11.1 Recombinant DNA technologie	70
11.1.1 Inleiding	70
11.1.2 Belangrijke tools in recombinante DNA-technologie	70
11.1.3 DNA-vectoren	71
11.1.4 Moleculair klonen	72
11.2 DNA analyse	72
11.2.1 Scheiding van DNA-fragmenten met gelelektroforese	72
11.2.2 PCR	72
11.3 Toepassingen van PCR	73
11.3.1 Detectie en kwantificering van micro-organismen	73
11.3.2 DNA Fingerprinting	74
11.3.3 Detectie voedselfraude	74
11.4 Sequencing en genomics	74
11.4.1 Methodes voor DNA sequenering	74
11.4.2 Genomics	75
11.4.3 Metagenomics	75
11.5 Introductie tot bio-informatica	76
11.5.1 Omics technologieën	76
11.5.2 Gebruik van bio-informatica in toegepast onderzoek	76
12 Cases in agricultural biotechnology	77
12.1 Inleiding	77
12.1.1 Opwarming van de aarde en klimaat verandering	77
12.2 Wat is biotechnologie precies?	77
12.2.1 Traditionele biotechnologie	77
12.2.2 Moderne biotechnologie	77
12.3 Biotechnologie & duurzame voedselproductie	78
12.3.1 Traditionele veredeling van gewassen of dieren	78
12.3.2 “Marker-assisted breeding”	78



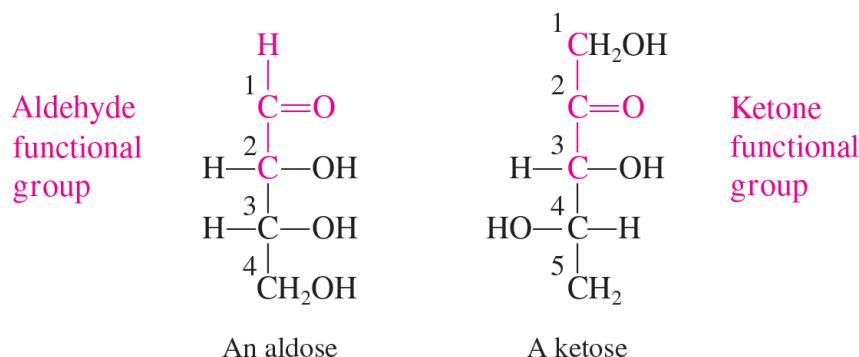
12.3.3 In vitro cultivering van biomassa	79
12.4 Biotech gewassen	79
12.4.1 Verbeterde kwaliteitskenmerken van planten	79
12.4.2 Methoden	79
12.4.3 Voorbeelden	80
12.4.4 Gezondheids- en milieurisico's	81
12.5 Biocontrole organismen	81
12.5.1 Gebruik van micro-organismen als biomeststoffen	81
12.6 Andere biotechnologische voorbeelden die bijdragen aan duurzaamheid	82
12.6.1 Productie van biobrandstoffen	82
12.6.2 Grijze Biotechnologie	82

1 Koolhydraten

Koolhydraten zijn essentieel voor biologisch leven. Grosso modo kunnen we de volgende types onderscheiden: monosachariden, disachariden, oligosachariden en polysachariden. Voor dat we deze types degelijk kunnen bespreken, moeten er eerst enkele afspraken vast gelegd worden rond naamgeving en voorstelling. Vervolgens maken we enkele belangrijke opmerkingen rond de chemische fenomenen die zich voor doen bij koolhydraten.

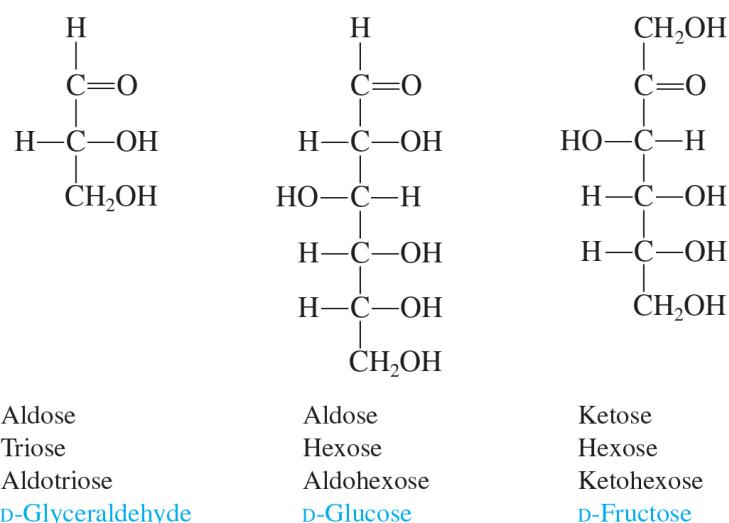
1.1 Naamgeving

Koolhydraten bestaan voornamelijk uit C, O en H atomen. Afhankelijk van de onderling gevormde bindingen kunnen we een onderscheid maken tussen twee soorten koolhydraten; de aldosen en ketonen. Het verschil tussen beiden wordt duidelijk gemaakt in figuur 1. Als een koolhydraat in bezit is van een aldehyde groep, noemen we hem een aldose. Als hij in bezit is van een keton groep, noemen we hem een ketose.



Figuur 1: Aldehyden en ketonen

Naast de aanwezigheid van functionele groepen, maken we ook een onderscheid op basis van het aantal aanwezige koolstof atomen. De nummering en naamgeving van deze moleculen worden overgenomen uit de chemie zoals te zien is op figuur 2.

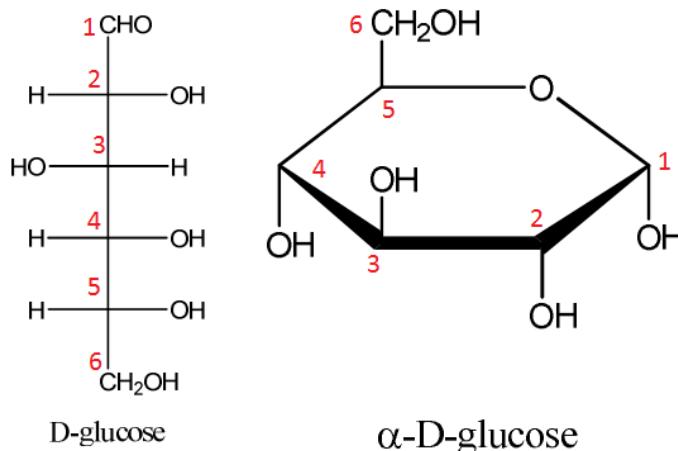


Figuur 2: Voorbeelden van naamgeving

Er zijn ook enkele koolhydraten die een triviale naam krijgen, zoals sacharose of fructose.

1.2 Voorstellingen

Er bestaan twee manieren om een koolhydraat voor te stellen, de Fischer- en Haworthprojectie. Voor D-glucose zien we op figuur 3 beide voorstellingen.



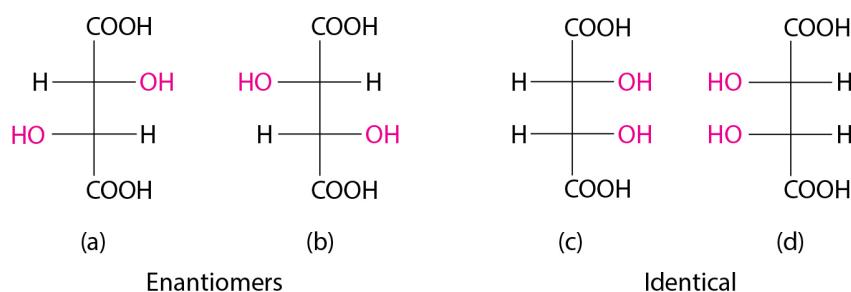
Figuur 3: Fischerprojectie (links) en Haworthprojectie (rechts)

1.3 Stereochemie

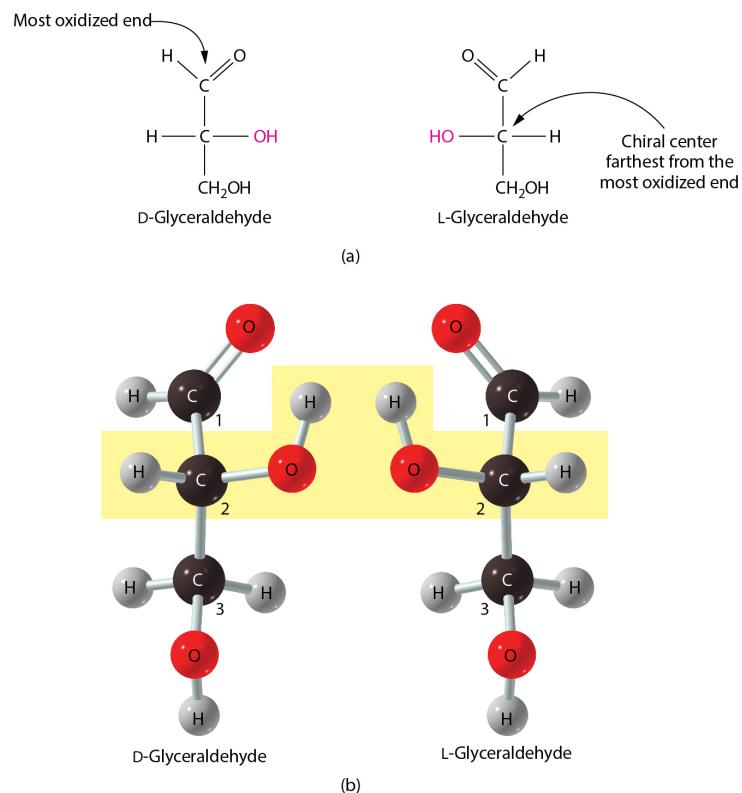
Als de structuur van een koolhydraat koolstof atomen bevat die gebonden zijn met vier verschillende groepen, dan zeggen we dat de structuur een chiraal centrum heeft. Dit fenomeen kan tot opmerkelijke resultaten leiden, zo is het mogelijk dat bepaalde functionele groepen niet altijd op dezelfde manier georiënteerd zijn.

1.3.1 Enantiomeren

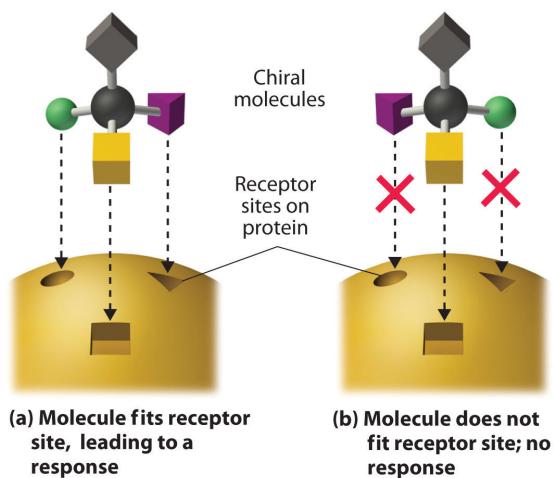
We spreken van enantiomeren als een we te maken hebben met een molecule die volledig gespiegeld kan worden. Een voorbeeld is te zien op figuur 5. Deze spiegeling heeft enkele gevolgen, zowel op biologisch als op fysisch vlak. Zo kunnen verschillende enantiomeren anders reageren op gepolariseerd licht. Vanuit een biologisch standpunt vormt er een probleem als de enantiomeren niet op dezelfde manier samenwerken met enzymen (zie figuur 6). Als beide enantiomeren (normaal en gespiegeld of L en D in een biologische context) aanwezig zijn in een mengsel, dan noemen we dit een racemisch mengsel. Het is ook belangrijk om op te merken dat een gespiegelde tekening niet zomaar een enantiomeer is. Het is ook mogelijk dat er een mesoverbinding aan het werk is. Dit is een verbinding met twee of meer chirale koolstofatomen en een intern symmetrievlak zoals te zien is op figuur 4.



Figuur 4: Enantiomeer (links) en mesoverbinding (rechts)

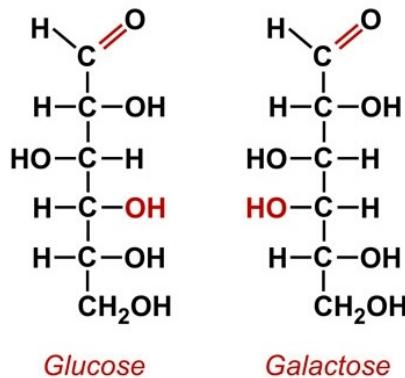


Figuur 5: Enantiomeer



Figuur 6: Interactie tussen enantiomeren en enzymen

1.3.2 Diastereomeren



Figuur 7: Diastereomeren

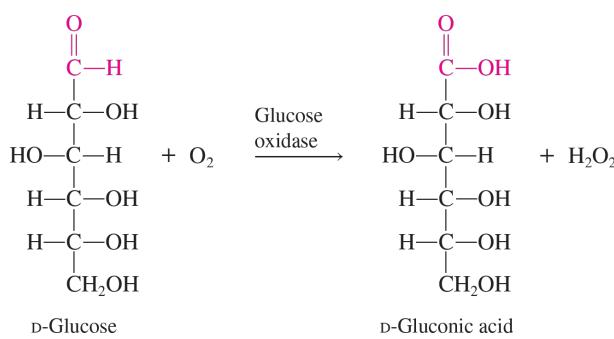
Diastereomeren zijn zoals enantiomeren, maar ze zijn geen perfect spiegelbeeld zoals te zien is op figuur 7.

1.3.3 Glucose

Het bekendste voorbeeld van dit fenomeen is glucose. In de natuur observeren we D-glucose en L-glucose. Hiervan zien we voornamelijk D-glucose voorkomen omdat dit het type glucose is dat gemaakt wordt door fotosynthese. Ons lichaam maakt wel een onderscheid tussen beide varianten, ze smaken alle twee zoet maar enkel D-glucose heeft een calorische inhoud bij het verteren. Dit wil zeggen dat L-glucose niet wordt opgenomen door ons spijsverterings-stelsel, en dus niet kan gebruikt worden om energie uit te halen. Het is dus een ‘zoetstof’.

1.4 Reducerende koolhydraten

We spreken van een reducerend koolhydraat als het molecuul optreedt als reducerend reagens in een redox-reactie als gevolg van de aanwezigheid van de aldehyde- of ketongroep (zie figuur 8). Veel monosachariden bezitten deze eigenschap, daarnaast hebben ook disachariden, waarvan het anomere koolstof-atoom geen glycoside binding heeft, ook een reducerend vermogen. Polysachariden hebben meestal een te lage hoeveelheid reducerende uiteinden om een reductief karakter te hebben.



Figuur 8: Reducerende koolhydraten

We kunnen testen of een koolhydraat in het bezit is van een reducerend karakter met Benedict's reagens. Hierbij kijken we naar de kleurverandering van de oplossing na de reactie. Dit is tevens de manier waarop we kunnen bepalen of er suiker in urine zit, het is handig om suikerziekte op te sporen.

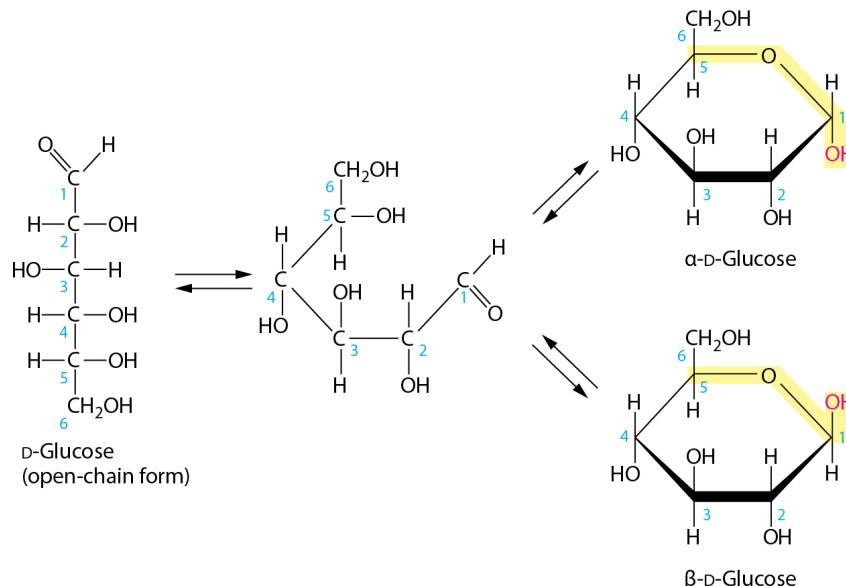
1.5 Monosachariden

Monosachariden zijn de meest eenvoudige koolhydraten. Ze vormen hierdoor dus ook de bouwstenen voor complexere structuren zoals disachariden, oligosachariden en polysachariden.

1.5.1 Belangrijke monosachariden

In monosachariden merken we telkens anomeren op. Een anomeer is een stereo-isomeer van een koolhydraat in ringvorm met het enigste verschil de configuratie van het koolstof-atoom op positie 1.

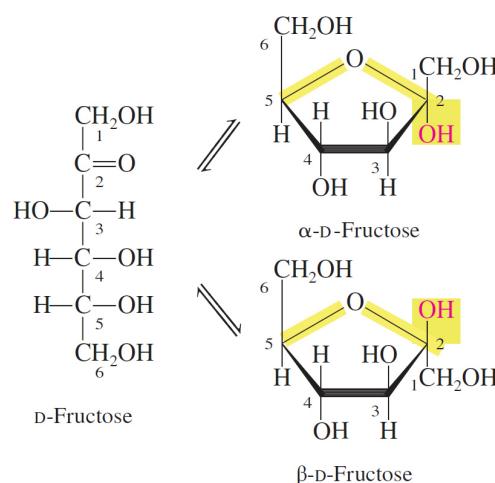
Glucose



Figuur 9: Glucose

Hierbij kunnen we nog vermelden dat koolstof atoom 1 in figuur 9 een nieuw chiraal centrum is, en dus een anomeer C-atoom is.

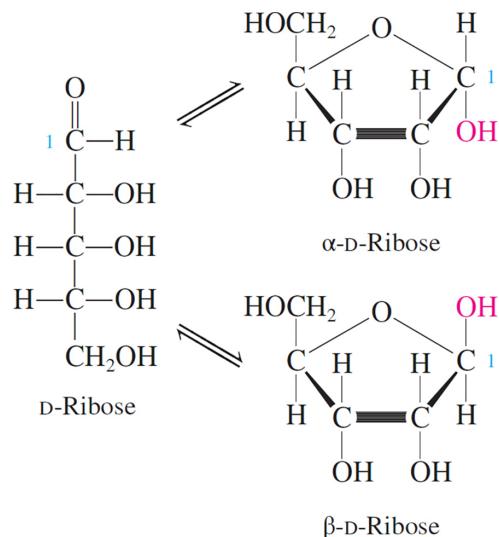
Fructose



Figuur 10: Fructose

Hierbij kunnen we nog vermelden dat koolstof atoom 2 in figuur 10 een nieuw chiraal centrum is, en dus een anomeer C-atoom is.

Deoxyribose

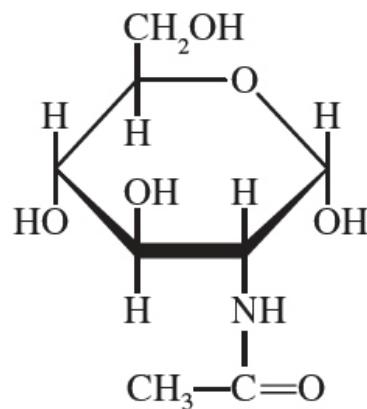


Figuur 11: Deoxyribose

Hierbij kunnen we nog vermelden dat koolstof atoom 1 in figuur 11 een nieuw chiraal centrum is, en dus een anomeer C-atoom is. Deoxyribose is tevens belangrijk voor RNA en DNA.

Acetylglucosamine

Door andere functionele groepen toe te voegen aan de koolhydraatstructuur kunnen we complexere moleculen maken. Acetylglucosamine (figuur 12) is bijvoorbeeld een bloed antigen.

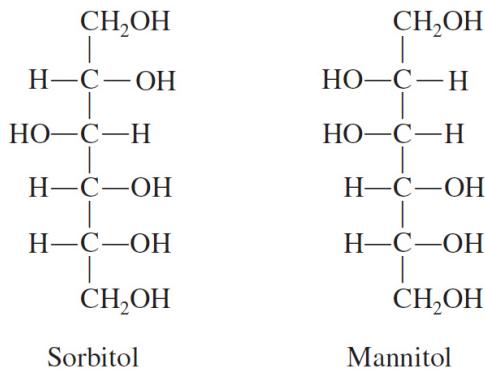


α -D-N-Acetylglucosamine

Figuur 12: Acetylglucosamine

1.5.2 Afgeleiden

Enkele voorbeelden van afgeleiden van monosachariden zijn polyolen. Ze zijn geen monosachariden, maar lijken er wel sterk op. De voorbeelden uit figuur 13 zijn zoet zoals glucose, ze hebben wel geen calorie-inhoud. Ze zijn dus geschikt om zoetstoffen mee te maken.



Figuur 13: Afgeleiden van monosachariden

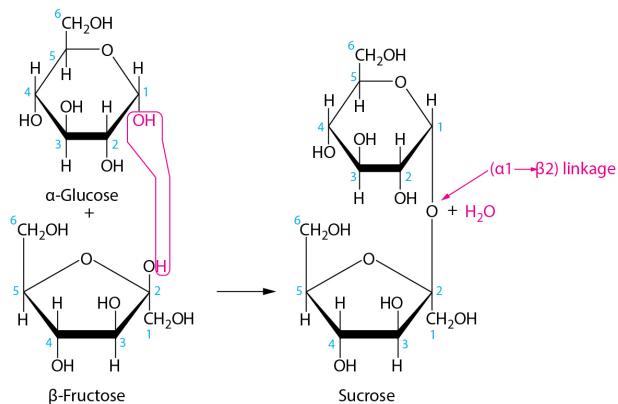
1.6 Disachariden

Disachariden zijn opgebouwd uit 2 monosachariden. We kunnen ze benoemen volgens de monosachariden waaruit ze zijn opgebouwd, en de manier waarop deze gebonden zijn aan elkaar.

1.6.1 Belangrijke disachariden

Sucrose

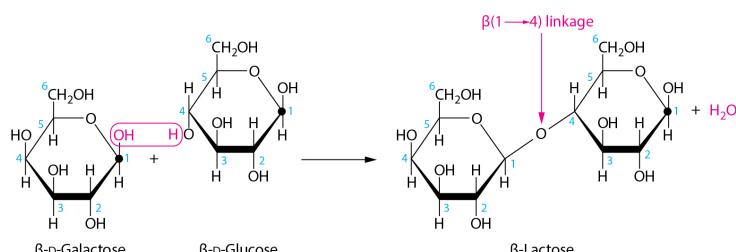
Sucrose is wat wij kennen als 'gewoon' suiker. Het is opgebouwd uit α -D-glucose en β -D-fructose (zie figuur 14).



Figuur 14: Sucrose

Lactose

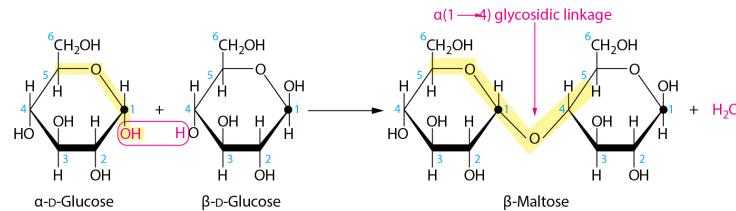
Lactose of melksuiker is opgebouwd uit β -D-galactose en β -D-glucose (zie figuur 15).



Figuur 15: Lactose

Maltose

Maltose of moutsuiker is opgebouwd uit α -D-glucose en β -D-glucose (zie figuur 16).

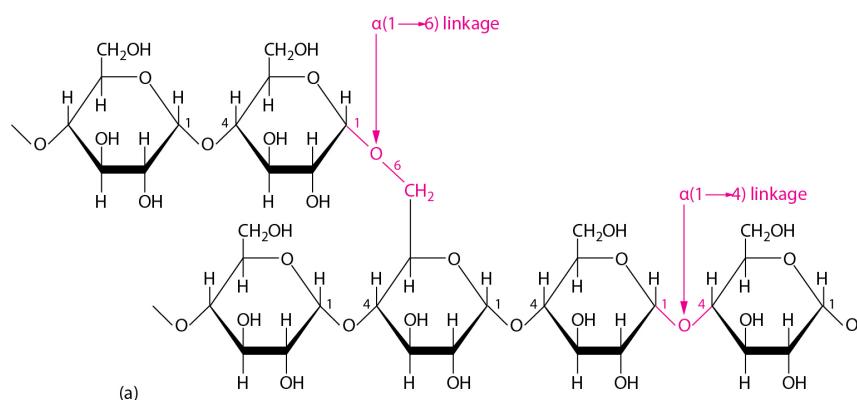


Figuur 16: Maltose

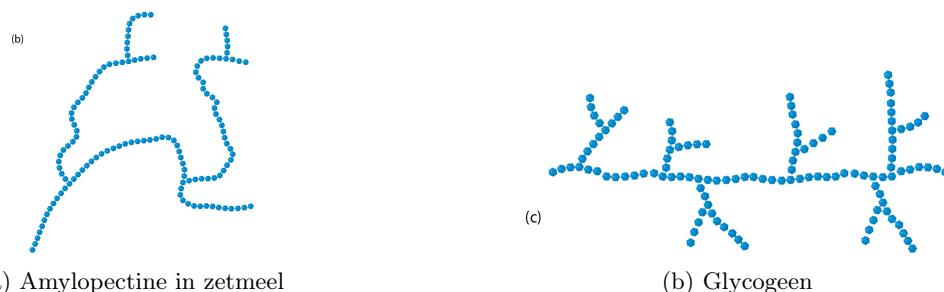
1.7 Polysachariden

Polysachariden zijn net zoals disachariden opgebouwd uit monosachariden. Het verschil zit in de hoeveelheid bouwbladen er aanwezig zijn. Indien er een tiental betrokken zijn bij de opbouw hebben we het over oligosachariden en als het over honderden of meer gaat noemen we ze polysachariden.

Afhankelijk van de onderlinge bindingen, kunnen er zich vertakkingen voor doen in een polysacharide. beide polysachariden in figuur 18 zijn opgebouwd volgens de structuur in figuur 17. Door het aanzienlijke verschil in vertakkingen, maken we een onderscheid tussen deze twee moleculen.



Figuur 17: Verschillende bindingen zorgen voor vertakkingen



Figuur 18: Het verschil tussen veel en weinig vertakkingen

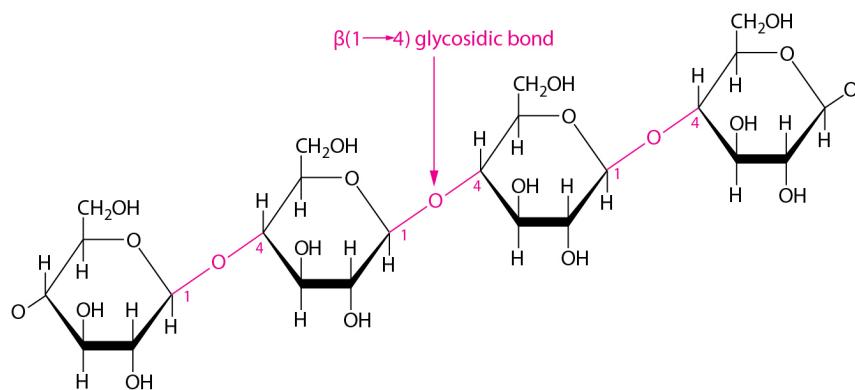
1.7.1 Belangrijke polysachariden

Zetmeel en glycogeen

Zetmeel en glycogeen lijken sterk op elkaar, ze zijn beiden namelijk opgebouwd volgens figuur 17. Zetmeel vinden we voornamelijk terug in planten, het is een belangrijke nutriënt voor de mens. We gebruiken het namelijk vaak voor het maken van brood en pasta. Een bijkomend voordeel, is dat het gemakkelijk afbreekbaar is tijdens de vertering. Glycogeen komt hoofdzakelijk voor bij dieren. Het is in grote concentraties aanwezig in spierweefsel en de lever. Dit is ook de meer vertakte variant van amylopectine (zie figuur 18).

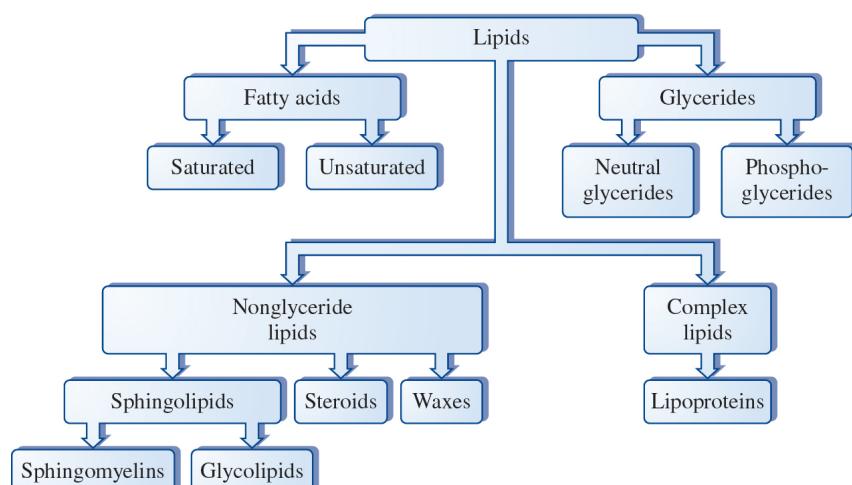
Cellulose

Cellulose is vaak aanwezig bij planten. Het is niet verteerbaar door de mens, dit wil zeggen dat er eigenlijk geen calorische inhoud is. Het kan vaak gebruikt worden als een structureel component om een cel op te bouwen omdat het een soort vezel vormt. Dit is ook de reden waarom we cellulose gebruiken om papier te maken. De structuur van cellulose is te zien in figuur 19.



Figuur 19: Cellulose

2 Lipiden



Figuur 20: Schema van lipiden

2.1 Biologische functies van lipiden

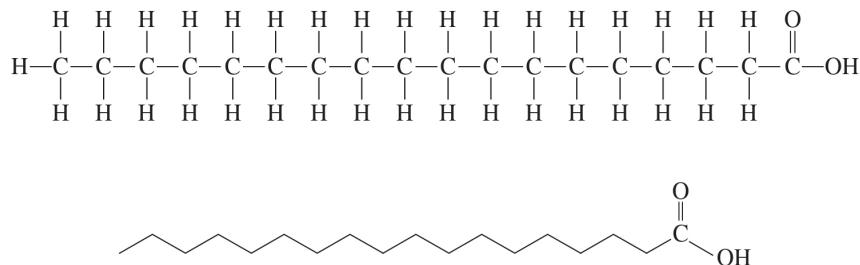
Biologisch gezien zijn vetten extreem belangrijk. De mens gebruikt ze namelijk voor verschillende doelen:

- Energiebron en -opslag
- Structurele componenten van het celmembraan
- Hormonen
- Vitaminen en vitamine-adsorptie
- Bescherming
- Isolatie

2.2 Vetzuren

2.2.1 Structuur

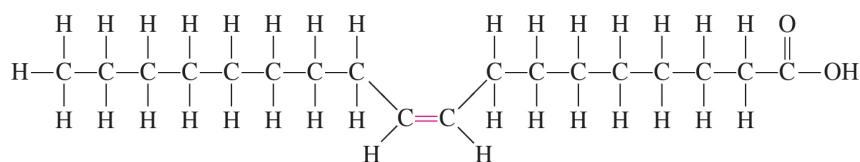
Vetzuren hebben lange ketens van monocarboxylzuren ($-COOH$) met een even aantal koolstofatomen (zie figuur 21).



Figuur 21: Structuur van een vazuur

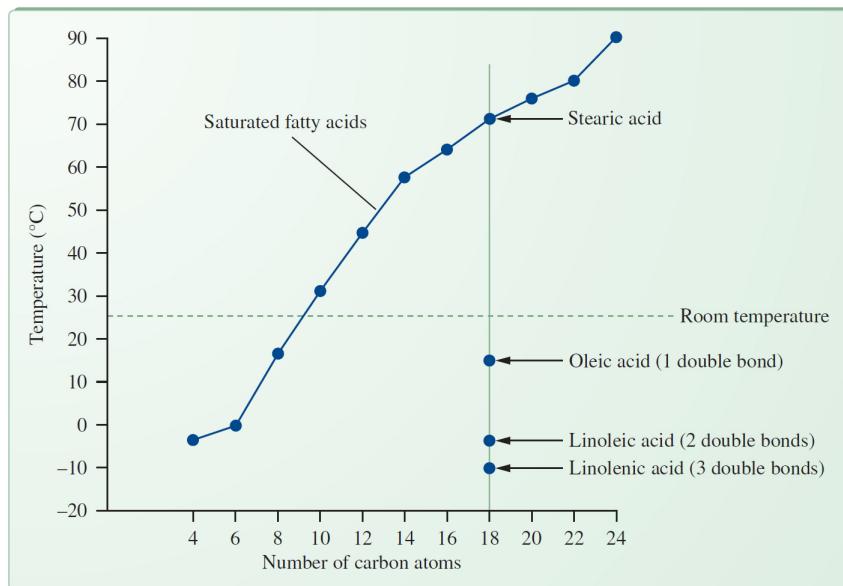
2.2.2 (On)Verzadigde vetzuren

Verzadigde vetzuren bestaan uitsluitend uit enkelvoudig gebonden koolstof atomen zoals in figuur 21. We spreken van een onverzadigd vazuur als er een dubbele binding voorkomt tussen de koolstoffen zoals in figuur 22.



Figuur 22: Onverzadigde vetzuren

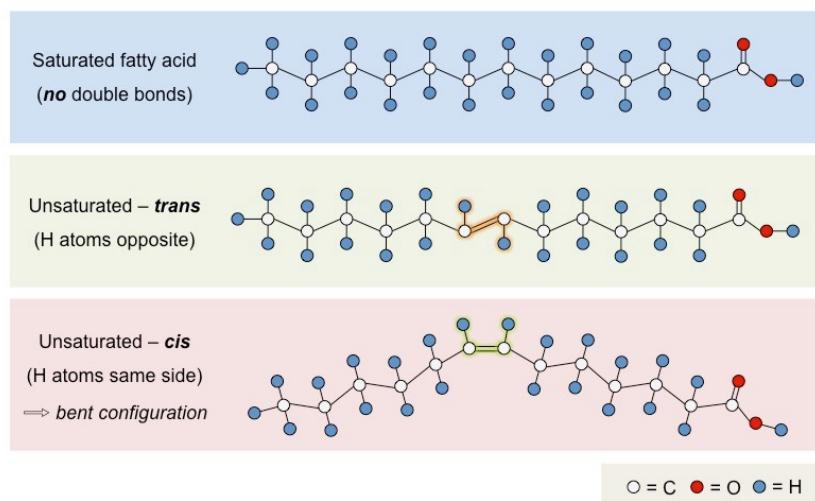
We vinden verzadigde vetzuren vaak bij dieren en onverzadigde vetzuren bij planten. Ook het smeltpunt kent grote verschillen tussen beide soorten (zie figuur 23). Grosso modo kunnen we zeggen dat het smeltpunt van verzadigde vetzuren afhangt van de lengte van de koolstofketen (London krachten). Bij onverzadigde vetzuren is het smeltpunt invers proportioneel aan het aantal onverzadigde bindingen.



Figuur 23: Smeltpunt van verzadigde en onverzadigde vetzuren

2.2.3 Cis- en Transvetzuren

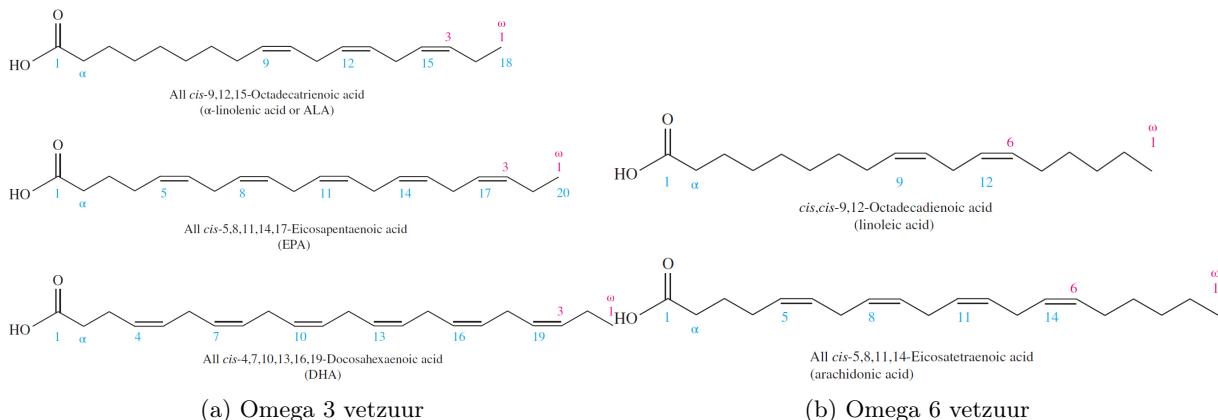
Het verschil tussen cis- en transvetzuren zit in de manier waarop de koolstof atomen onderling georiënteerd zijn (zie figuur 24). Over het algemeen kunnen we zeggen dat transvetzuren slecht zijn voor de mens, ze hebben een negatief effect op zaken zoals cholesterol en hart- en vaatziekten. We vinden ze vaak bij producten gemaakt van herkauwers, en na verhitting van vetzuren. Cisvetzuren daarentegen hebben een positieve invloed op cholesterol.



Figuur 24: Cis- en Transvetzuren

2.2.4 Omega vetzuren

We spreken hoofdzakelijk over omega 3 en omega 6 vetzuren. Het zijn onverzadigde vetzuren die hun naam krijgen op basis van het aantal verzadigde bindingen voor de eerste dubbele binding, zie figuur 25.



Figuur 25: Het verschil tussen veel en weinig vertakkingen

We associëren omega 3 vetzuren vaak met positieve gezondheidseffecten, onderzoek wijst namelijk uit dat het hart- en vaatziekten tegenhoud en een ontstekingsremmend effect heeft. Omega 6 vetzuren komen met ongewenste gezondheidseffecten.

2.2.5 Reacties met vetzuren

De belangrijkste reactie van deze cursus is de hydrogenering (zie figuur 26). Het is een additieve reactie waarbij onverzadigde vetzuren omgezet worden in verzadigde vetzuren. Deze reactie wordt sterk gebruikt in de voedingsindustrie.

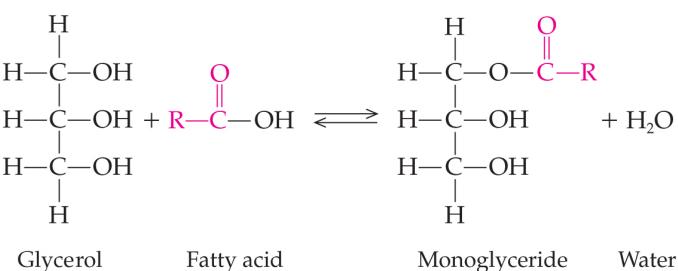


Figuur 26: Hydrogenering

2.3 Glyceriden

2.3.1 Structuur

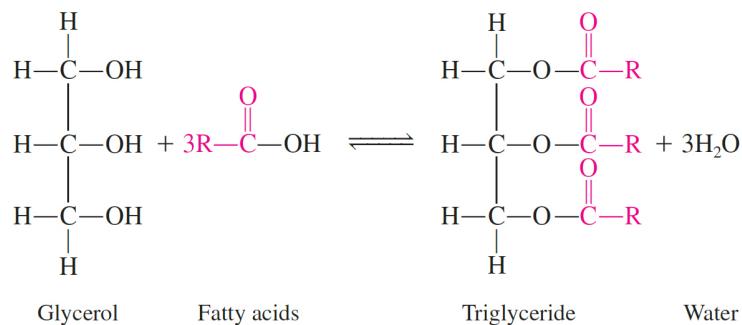
Glyceriden zijn lipide-esters, dit wil zeggen dat de alcoholgroep van glycerol een ester vormt met een vetzuur (zie figuur 27). Deze estervorming kan zich op één, twee of alle 3 de alcoholgroepen van de glycerol voordoen. We spreken van mono-, di-, triglyceriden.



Figuur 27: Structuur glyceriden

2.3.2 Triglyceriden

Triglyceriden zijn non-ionische en niet polaire moleculen (zie figuur 28) die dienen als energieopslag in vetcellen. Het zijn de meest voorkomende neutrale glyceriden in de natuur. Ze zijn bij vissen en planten vloeibaar bij kamertemperatuur dankzij de grote hoeveelheid onverzadigde vetzuren die aanwezig zijn. Bij mens en dier zijn de vetzuren hoofdzakelijk verzadigd, en dus zijn de triglyceriden ook vast bij kamertemperatuur.

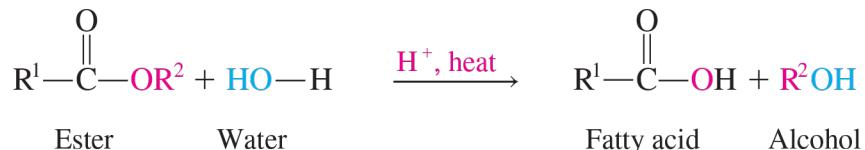


Figuur 28: Triglyceride

2.3.3 Reacties

Hydrolyse

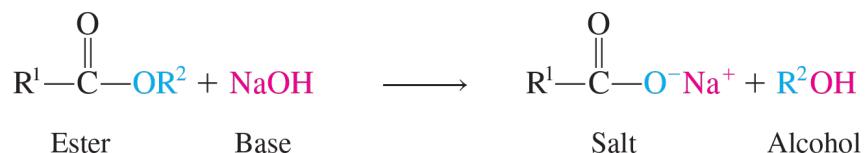
Produceert de vetzuren en glycerol. Het breekt dus eigenlijk een mono-, di-, triglyceride af tot zijn basiscomponenten (zie figuur 29).



Figuur 29: Hydrolyse

Verzeping

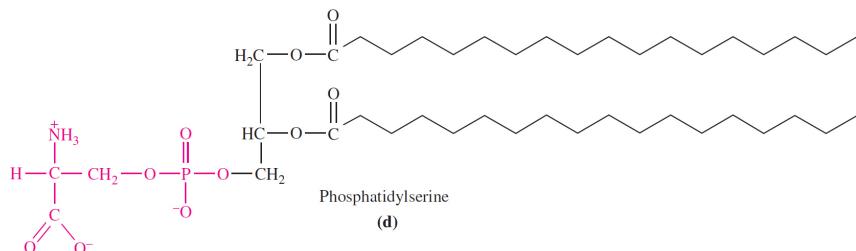
Produceert vetzuurzouten en glycerol (zie figuur 30).



Figuur 30: Verzeping

2.3.4 Fosfoglyceriden

Fosfoglyceriden zijn niet-neutrale glyceriden die opgemaakt zijn uit glycerol, vetzuur en een fosfaat-groep waarop eventueel nog andere groepen gebonden zijn zoals in figuur 31. De functie ervan zal later aan bod komen in het hoofdstuk over cellen.

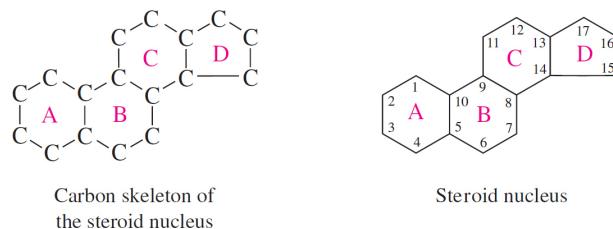


Figuur 31: Fosfoglyceride

2.4 Niet-glyceride lipiden

2.4.1 Steroïden

Steroïden volgen de algemene structuur die te zien is in figuur 32.



Figuur 32: Steroïden

Cholesterol is een belangrijke steroïde die we nodig hebben om galzouten, hormonen en vitamines aan te maken. Zoals altijd is een balans wel belangrijk, te veel cholesterol kan leiden tot het dichtslippen van aders.

3 Celstructuren

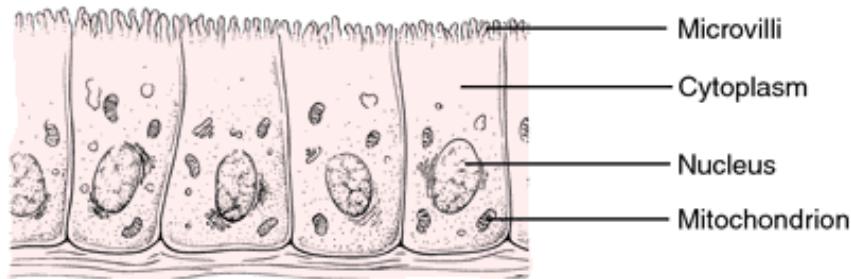
3.1 Microscopische observatie van cellen

Cellen zijn bijna altijd te klein om met het blote oog te zien. Om deze levensvormen toch te zien maken we gebruik van microscopen. Hiervoor bestaan 2 varianten: de licht microscoop en de elektronen microscoop.

De licht microscoop is een (relatief) goedkope optie. We maken ook nog onderscheid tussen de klassieke en digitale microscoop. Door de eigenschappen van licht, is er een limiet aan de resolutie waarmee we kunnen observeren. De elektronen microscoop lost dit probleem op door een bundel elektronen te gebruiken. We kunnen opnieuw 2 verschillende soorten onderscheiden, de TEM en de SEM.

3.2 Celtheorie

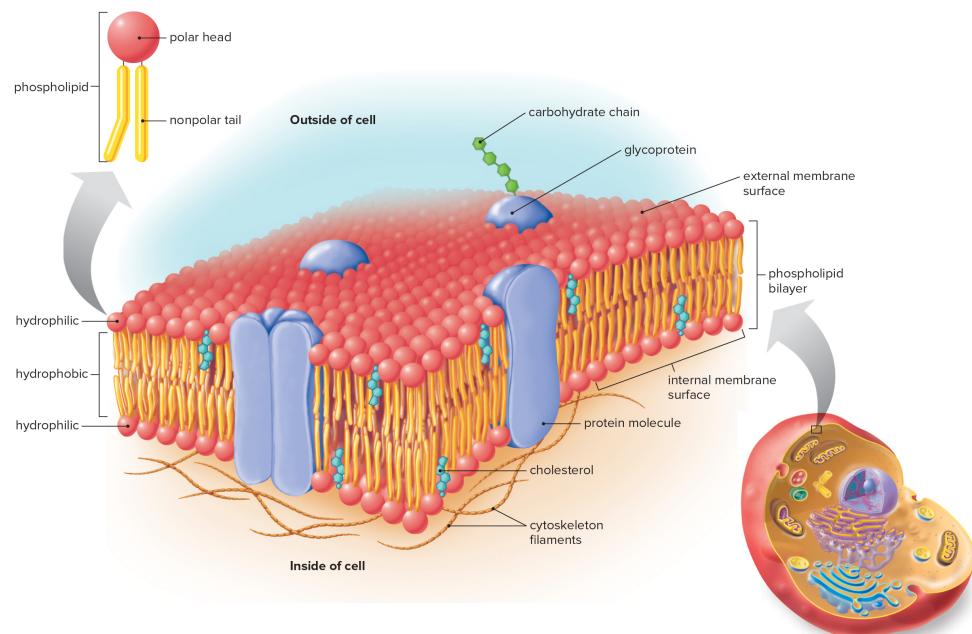
We stellen dat alle organismen zijn samengesteld uit cellen. Deze cellen zijn ook altijd afkomstig van reeds bestaande cellen en zijn erg klein. De reden dat ze microscopisch klein zijn, is de oppervlakte-volume verhouding. Dit wil zeggen dat kleine cellen een relatief grote oppervlakte hebben in vergelijking met hun volume. Aangezien cellen hun wand gebruiken voor het uitwisselen van stoffen, is het dus voordelig om een relatief groot wand oppervlak te hebben. Er zijn nog andere mogelijkheden om de oppervlakte te vergroten, zo maken enkele cellen microvilli aan zoals te zien in figuur 33.



Figuur 33: Microvilli

3.3 Plasmamembraan

Het plasmamembraan markeert de grens tussen buiten- en binnenkant een cel. Het is essentieel voor transport van stoffen in en uit de cel. Een plasmamembraan is opgebouwd uit een fosfolipide dubbellaag met ingebouwde eiwitten. Hierbij is de polaire (en dus hydrofiele) zijde van de fosfolipiden gericht naar het waterig medium. De niet-polaire staarten (hydrofoob) staan tegenover elkaar (zie figuur 34). Als geheel vormen ze ook een vloeistofmozaïekmodel. Dit model zorgt ervoor dat het membraan extreem flexibel is.



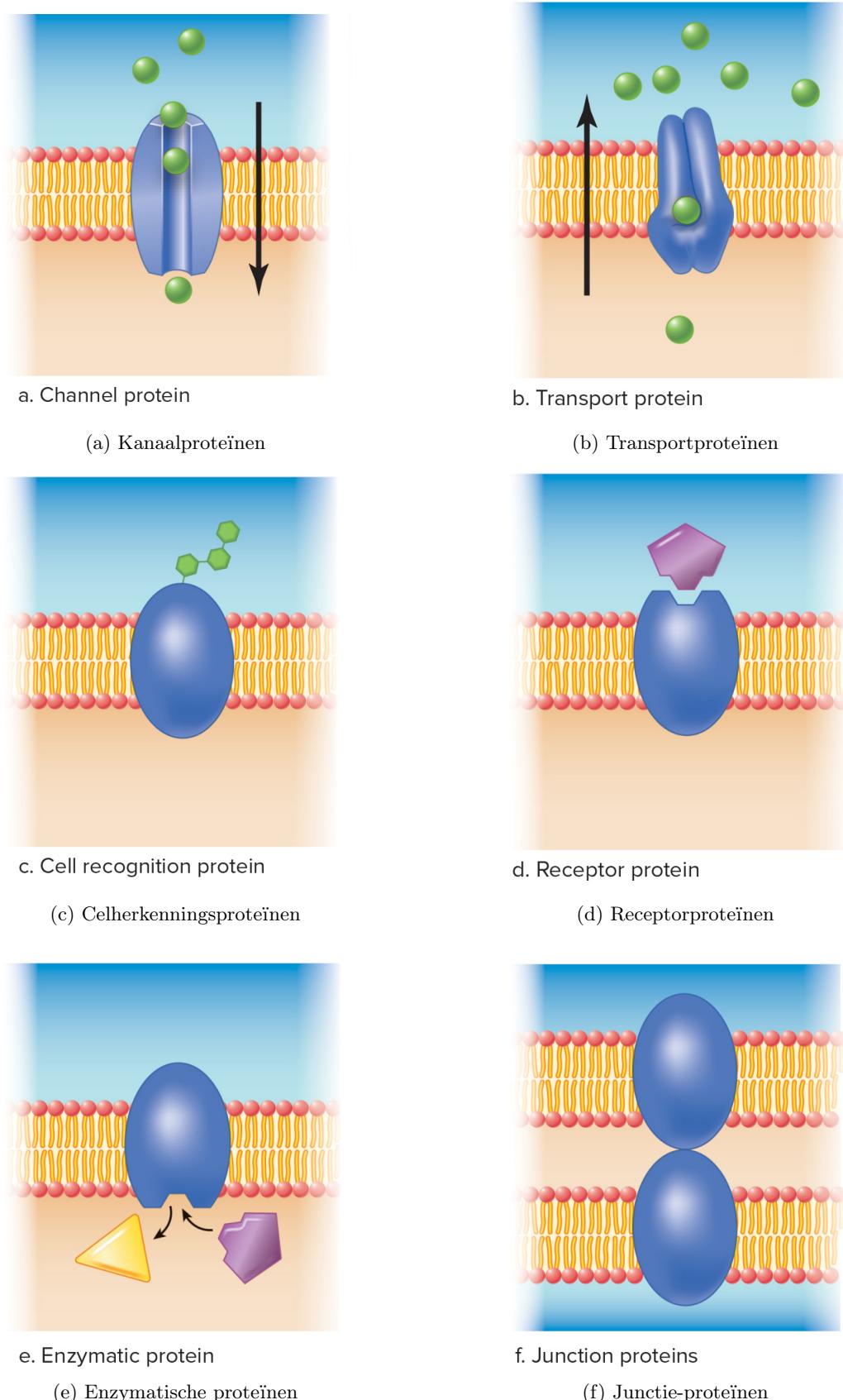
Figuur 34: Plasmamembraan

Afhankelijk van de omstandigheden waarin de cel zich bevindt, kan de structuur van de vetzuren veranderen. In koude klimaten zullen er meer onverzadigde vetzuren aanwezig zijn, hierdoor dal de vloeibaarheid van het membraan stijgen. Het omgekeerde geldt voor cellen in warme omstandigheden.

Membraan proteïnen zijn niet alleen belangrijk voor de communicatie van de cel, maar ook voor nutriëntenopname en afvalverwijdering. We onderscheiden 6 verschillende soorten proteïnen. Kanaalproteïnen (figuur 35a) worden hoofdzakelijk gebruikt om specifieke moleculen door de celmembraan te looden; transportproteïnen (figuur 35b) zijn dan weer betrokken bij de doorgang van moleculen door het membraan, waarbij soms input van energie nodig is. Celherkenningsproteïnen worden gebruikt om een onderscheid te maken tussen cellen van ons eigen lichaam, en die van andere organismen (figuur 35c). Receptorproteïnen laten signaalmoleculen toe om te binden, hierdoor ontstaat een cellulaire respons (figuur 35d). Enzymatische proteïnen katalyseren metabole reacties (figuur 35e). Tot slot worden



junctie-proteïnen gebruikt om verbindingen te vormen tussen cellen, hierbij is cel-tot-cel hechting en communicatie mogelijk (figuur 35f).



Figuur 35: Membraanproteïnen

3.4 2 types cellen

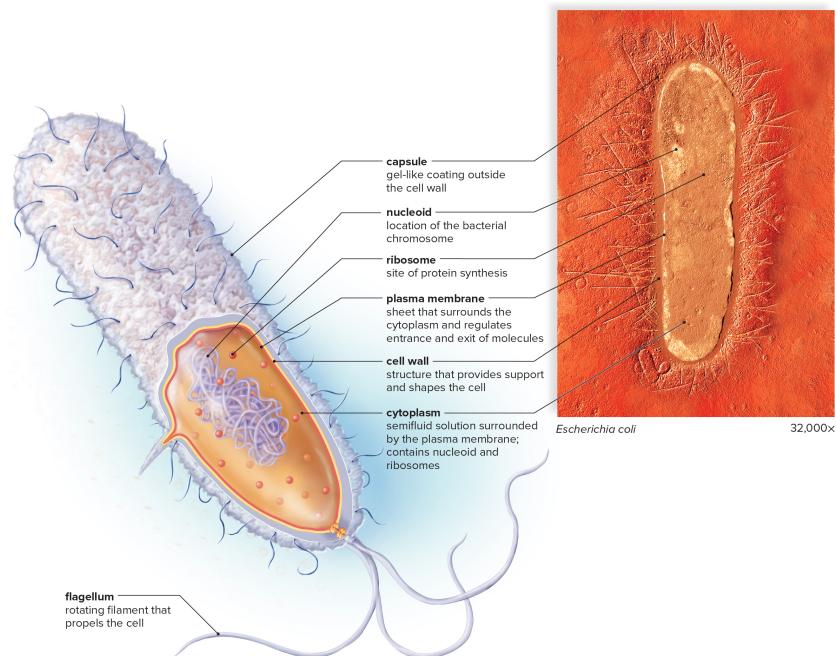
We definiëren twee types cellen op basis van de organisatie van genetisch materiaal. Eukaryote cellen hebben membraanomringd DNA, de celkern. Bij de prokaryote cellen ontbreekt deze structuur.

3.4.1 Prokaryote cellen

Het zijn eencellige organismen die uit de bacteria en archaea domeinen komen. Over het algemeen zijn het kleine en vrij eenvoudige organismen. Hierdoor zijn ze wel in staat om snel en effectief te reproduceren. Ze zijn hierdoor ook een zeer diverse groep organismen.

Bacteriën zijn bekende prokaryote cellen. Ze kunnen bij de mens verschillende ziektes veroorzaken, maar ze hebben ook voordelen. We gebruiken ze om chemicaliën, voedsel en geneesmiddelen te produceren.

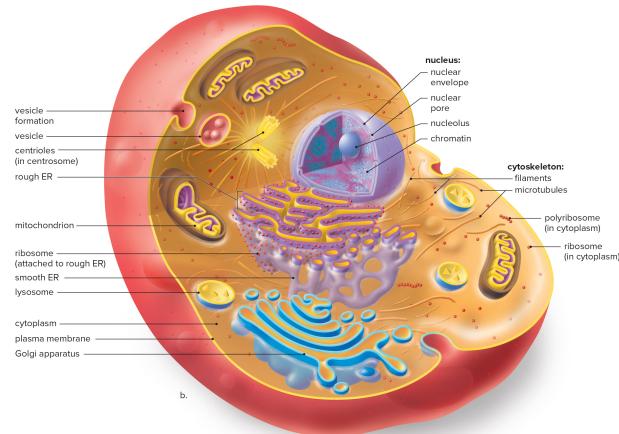
De structuur van prokaryote cellen kan sterk verschillen, hier nemen we het voorbeeld van een bacterie. Zoals te zien is in figuur 36, hebben we cytoplasma dat omringd is door een plasmamembraan en celwand. Bij sommige bacteriën kan deze celwand echter niet aanwezig zijn. Er is ook een mogelijkheid op een beschermende capsule. De celwand is verantwoordelijk voor het behoud van de vorm van de cel. Het cirkelvormig dubbelstrengig DNA bevindt zich in het nucleoid zonder omringend membraan. Er zijn ook andere celstructuren aanwezig die later besproken worden.



Figuur 36: Prokaryote cel

3.4.2 Eukaryote cellen

Dit zijn vaak dierlijke cellen, ze maken dus een deel uit van een multicellulair organisme. Soms komen ze ook vaak als micro-organismen, deze kunnen multicellulair zijn, maar kunnen ook unicellulair zijn zoals bijvoorbeeld gist. Ook algen bestaan uit eukaryote cellen. In het algemeen zijn dit complexere levensvormen (zie figuur 37). De aanwezige celstructuren worden besproken in subsectie 3.5.

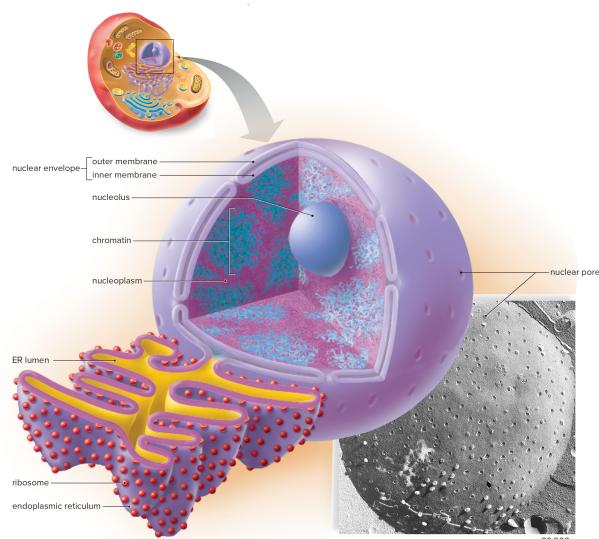


Figuur 37: Eukaryote cel

3.5 Intracellulaire structuren

3.5.1 Nucleus

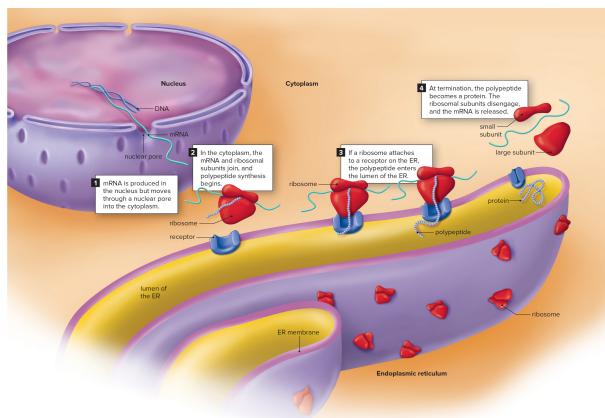
De nucleus (zie figuur 38) oftewel de celkern is een nucleaire envelop gemaakt uit een dubbel membraan. Nucleaire poriën zorgen voor transport van stoffen in en uit de kern. De belangrijkste taak van de celkern is om genetische informatie op te slaan. Dit gebeurt met chromatin, een soort geheel van DNA, proteïne en RNA (Voor celdeling zal het DNA zich condenseren in lineaire chromosomen). DNA met informatie in genen zal een transcriptie krijgen naar messengerRNA oftewel mRNA. Dit proces gebeurt buiten de celkern in het cytoplasma, met behulp van ribosomen wordt mRNA dan vertaald in polypeptiden. De nucleolus is de regio waar ribosomaalRNA oftewel rRNA wordt aangemaakt.



Figuur 38: Nucleus

3.5.2 Ribosomen

Ribosomen (figuur 39) zijn verantwoordelijk voor de eiwitsynthese, dit gebeurt in het cytoplasma. We vinden deze structuur in zowel prokaryote als eukaryote levensvormen. Een ribosoom is samengesteld uit twee subeenheden (verdere verduidelijking in sectie 10). Het ribosoom ontvangt mRNA en leest dit als instructiereeks van aminozuren in een polypeptide. In eukaryoten bewegen sommige ribosomen vrij rond in het cytoplasma maar de meeste zijn gehecht aan het endoplasmatisch reticulum.



Figuur 39: Ribosoom

3.5.3 Endomembraansysteem

Het endomembraansysteem bestaat uit de nucleaire envelop, endoplasmatisch reticulum, het Golgi apparaat en talrijke vesikels. Het zorgt voor compartmentalisering binnen een cel (beperkt tot bepaalde regio's). Vesikels zorgen voor transport van moleculen binnen in de cel.

3.5.3.1 Endoplasmisch reticulum

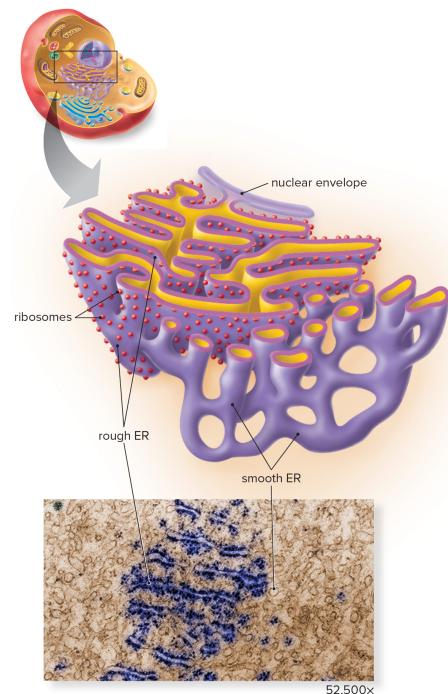
Het endoplasmatisch reticulum (figuur 40) is een complex systeem van membraan-kanalen en ‘zakjes’. Het is fysiek verbonden met de buitenste membraan van het nucleair-membraan. We kunnen 2 soorten reticulum onderscheiden, we beginnen met de ruwe variant. Het is bezaaid met ribosomen, en dient vooral voor de modificatie van eiwitten in lumen en vormt transportvesikels die naar het Golgi apparaat gaan. De gladde variant, is continu met het ruw endoplasmatisch reticulum, het bevat wel geen ribosomen. Het dient vooral om stoffen zoals fosfolipiden en steroïden te synthetiseren. De exacte molecule die geproduceerd wordt is wel afhankelijk van het type cel.

3.5.3.2 Golgi apparaat

Het Golgi apparaat kan het best vergeleken worden met een transfer station: het is verantwoordelijk voor de transfer van moleculen tussen het endoplasmatisch reticulum en andere vesikels (blaasjes). Vesikels worden ontvangen uit het ruwe én gladde endoplasmatisch reticulum, ze worden binnenvoer geactiveerd en verplaatst totdat ze uiteindelijk gesorteerd en weggestuurd worden. De moleculen die het apparaat terug verlaten worden wederom in vesikels verpakt. Ze eindigen terug in het endoplasmatisch reticulum of het plasmamembraan. In dierlijke cellen zijn sommige van de vesikels lysosomen. Qua bouw is het Golgi apparaat een stapel afgeplatte zakjes. Net zoals glad endoplasmatisch reticulum bevat het apparaat geen ribosomen, maar het Golgi apparaat is wel compacter.

3.5.3.3 Lysosomen

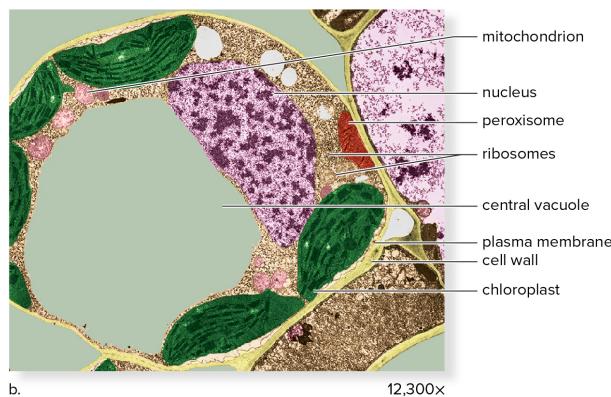
Lysosomen zijn vesikels die moleculen of delen van de cel verteren. Het zijn dus intracellulaire verteringsenzymen.



Figuur 40: Endoplasmatisch reticulum

3.5.4 Vacuole

Een vacuole (figuur 41) is een membraanzakje dat een stuk groter is dan vesikels. Het kan meerdere meerdere functies aan nemen binnen de cel: afvoer van overtollig water, vertering en opslag van plantpigmenten of vet.

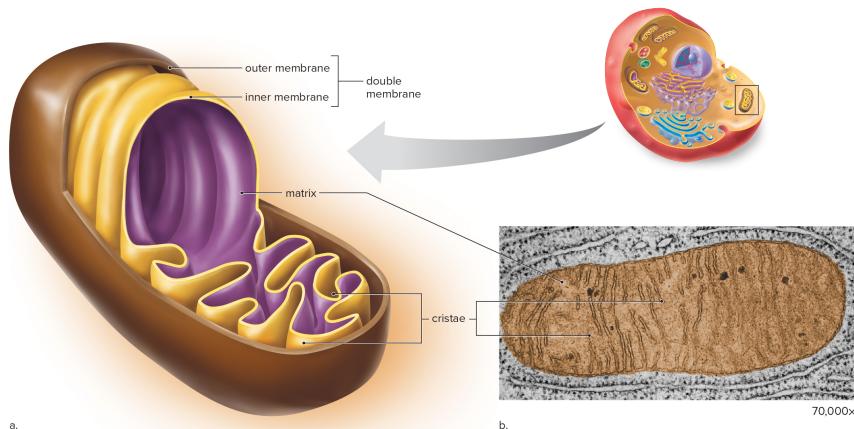


Figuur 41: Vacuole

3.5.5 Energie-organelen

3.5.5.1 Mitochondriën

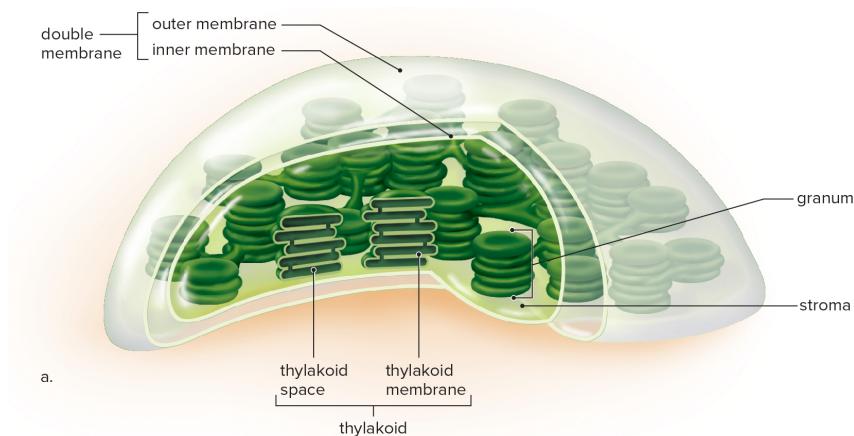
Mitochondriën vinden we zowel in planten als dieren, ze zijn erg klein waardoor ze enkel te zien zijn met een elektronenmicroscoop. Ze hebben een dubbelmembraan waarbij de binnenneste membraan een groter oppervlak heeft dan de buitenste. Dit betekent dat er plooien moeten komen in het binnenneste membraan, deze plooien noemen we cristae. Binnenin zit de matrix, dit bevat enzymen die koolhydraatafbraak ondersteunen, om dan ATP te synthetiseren. Verdere functies van Mitochondriën worden verduidelijkt in sectie 6.



Figuur 42: Mitochondriën: The Powerhouse of The Cel!

3.5.5.2 Chloroplasten

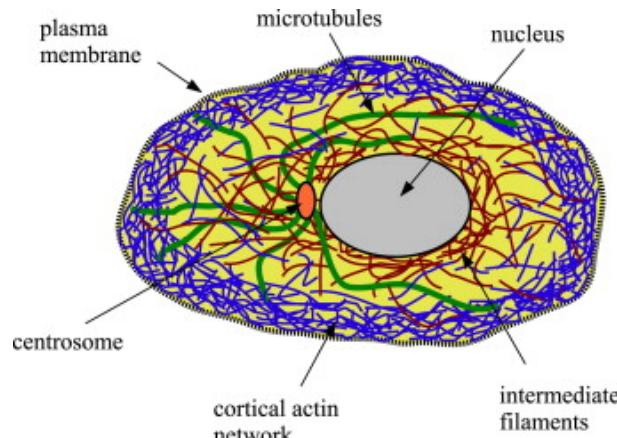
Dit celorganel gebruikt zonne-energie om koolhydraten aan te maken via het fotosynthese-proces. We vinden de chloroplast terug in planten en algen. Het bestaat uit 3 membraansystemen, eerst en vooral hebben we een dubbelmembraan die het stroma omhult. Het derde membraan vormt de thylakoiden. Deze bevatten het pigment om zonlicht op te vangen. Chloroplasten hebben hun eigen DNA en ribosomen.



Figuur 43: Chloroplast

3.5.6 Cytoskelet

Het cytoskelet is opgebouwd uit proteïnen en vormt een netwerk van onderling verbonden proteïnenfilamenten. Het strekt zich uit van de kern tot aan het plasmamembraan, en wordt meestal enkel gevonden in eukaryote cellen. Een cytoskelet zorgt voor behoud van vorm in de cel.

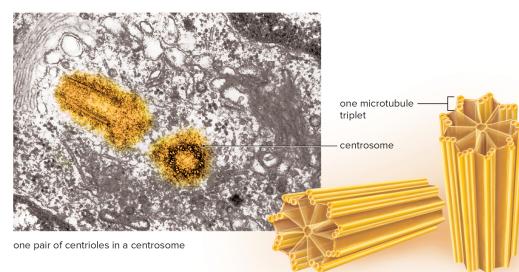


Figuur 44: Cytoskelet

Als we verder inzoomen op het cytoskelet, zien we dat het opgebouwd is uit microtubuli. Het zijn kleine, holle cilinders die de vorm van de cel grotendeels bepalen. De synthese hiervan wordt gecontroleerd door het centrosoom. De microtubuli zorgen voor behoud van de cel-vorm en fungeren als transportbaan voor organellen en andere materialen. Het geheel is dynamisch: de lengte wordt eenvoudig aangepast afhankelijk van waar in de cel stoffen afgeleverd moeten worden. Naast de microtubuli zijn er de intermediaire filamenten en actine filamenten. De intermediaire filamenten bieden net zoals de microtubuli stevigheid via een netwerk tussen de celkern en de plasmamembraan. Het grootste verschil met microtubuli is dat de intermediaire filamenten veel minder dynamisch zijn. Tot slot zijn er de actine filamenten. Ze vormen een dens netwerk net onder het plasmamembraan. Door het afbreken aan één kant en terug opbouwen aan de andere kant, zorgen zij voor de bewegelijheid van een cel.

3.5.7 Centriolen

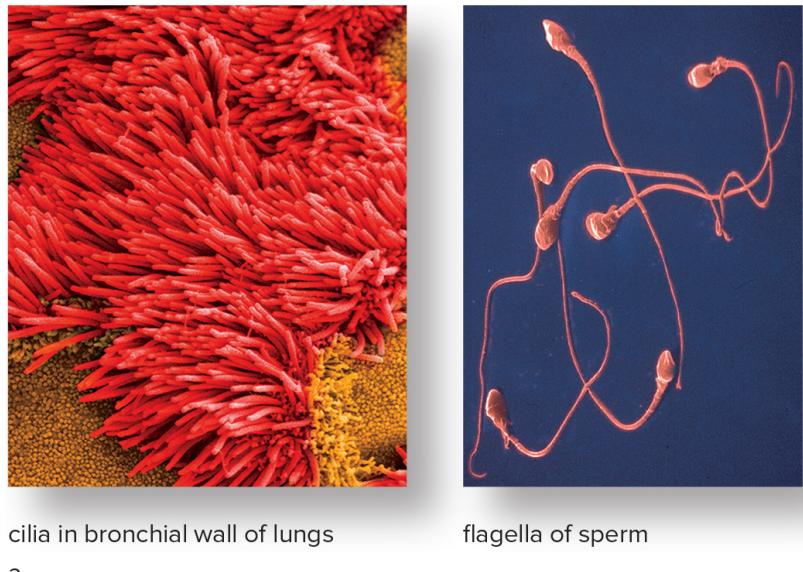
Een centriool is gemaakt van negen sets microtubuli tripletten. In de cel liggen twee centriolen loodrecht op elkaar, zij vormen het centrosoom. We vinden deze structuren enkel in dierlijke cellen, niet in plantencellen. Ze zijn verantwoordelijk voor het organiseren van microtubuli tijdens de celdeling.



Figuur 45: Centriolen

3.5.8 Cilia en flagellen

We vinden cilia en flagellen (figuur 46) in eukaryote levensvormen. Ze zijn essentieel voor beweging van de cel of de vloeistoffen rond de cel. Beiden zijn vergelijkbaar in opbouw, namelijk een 9+2 patroon van microtubuli. De cilia zijn wel korter (maar talrijker) dan flagellen.



Figuur 46: Cilia en flagellen

3.6 Extracellulaire structuren

3.6.1 Celwand

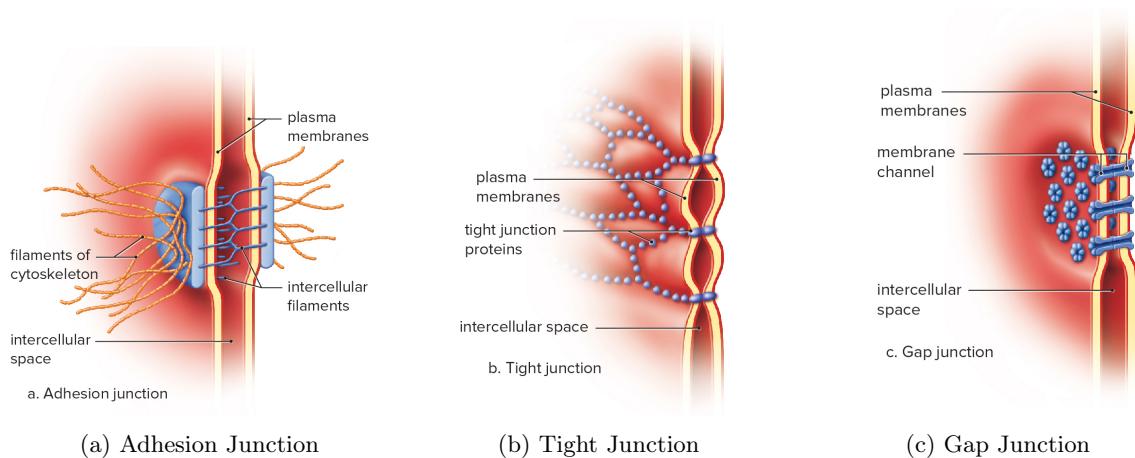
De celwand biedt ondersteuning aan veel niet-dierlijke cellen zoals planten, schimmels en protisten. Er zijn ook bacteriën die een celwand hebben, maar dit is een andere structuur. De planten-celwand kent altijd een primaire celwand. Deze bestaat uit cellulose fibrillen en andere polymeren. Deze wand rekt als de cel groeit. Sommige cellen hebben ook nog een secundaire wand die vormt binnen de primaire celwand. We vinden deze structuur bij houtige planten. De tweede wand voegt lignine toe aan de mix, dit component geeft extra kracht en bescherming. Cellen kunnen verbonden worden door plasmodesmata. Dit zijn kanalen die door de celwand gaan om zo de uitwisseling van water en kleine moleculen mogelijk te maken.

3.6.2 Extracellulaire matrix

De extracellulaire matrix (ECM) vinden we in dierlijke cellen, dit te vervangen van de celwand. Het is opgebouwd uit een complex netwerk van proteïnen en polysachariden, voorbeelden hiervan zijn collageen en elastine. Er bestaan meerdere types van deze matrix, zo kunnen we flexibel kraakbeen maken en relatief hard bot.

3.6.3 Juncties tussen cellen

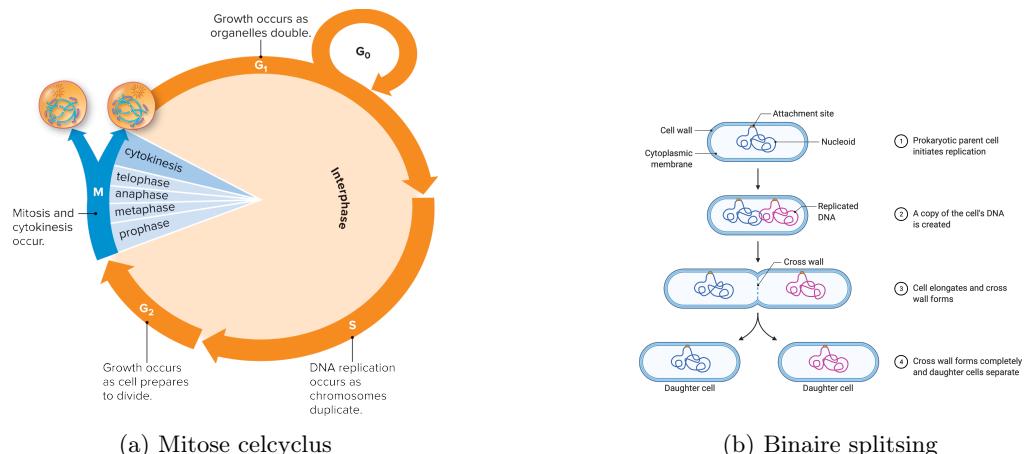
Adhesie juncties (figuur 47a) hebben interne cytoplasmatische structuren verbonden door intercellulaire filamenten. Het zijn stevige maar flexibele verbindingen tussen cellen. ‘Tight’ juncties (figuur 47b) zijn lekdichte verbindingen tussen cellen. Tot slot zijn gap juncties (figuur 47c) de juncties die zorgen voor communicatie tussen twee aanliggende cellen. Het zijn kanalen doorheen de plasmamembranen.



Figuur 47: Verschillende soorten juncties

3.7 Cellulaire reproductie

Bij prokaryote cellen kennen we binaire splitsing (figuur 48b). Eukaryote cellen kennen 2 manieren van reproductie, het meiose proces wat meestal bij seksuele reproductie voorkomt. Het mitose proces is veel vaker gebruikt om een kloon te maken van de cel. We zien dat dit in een soort cyclus gebeurt (figuur 48a). Dit proces wordt sterk gecontroleerd in ons lichaam, als er te weinig mitose is worden cellen niet meer vervangen. Te veel mitose zorgt daarentegen voor cellen die ongecontroleerd reproduceren, wat de voorbode is voor tumors en kankers.



Figuur 48: Celreproductie

3.8 Wat met virussen?

We zien virussen eigenlijk niet als levende organismen. Dit komt omdat ze niet opgebouwd zijn volgens normale cellen. Het kan zichzelf niet voortbewegen of zelfs voortplanten (een virus heeft een gastheercel nodig om zich voort te planten). Er is zelfs geen metabolisme aanwezig in een virus, we zien ze dus als dood materiaal. Er zijn enkele onderdelen die we herkennen bij alle virussen: we zien altijd een buitenste capsid die samengesteld is uit proteïnen. Binnenin is er DNA of RNA aanwezig, het viraal genoom is zeer klein en kan verschillende vormen aan nemen. We kunnen over het algemeen ook stellen dat ze kleiner zijn dan andere cellen (we hebben een elektronen microscoop nodig om ze te zien). Sommige virussen hebben ook nog spikes voor de aanhechting met de gastheercel, er kan ook een enveloppe aanwezig zijn.

4 Cases in rode biotechnologie

4.1 Wat is rode biotechnologie

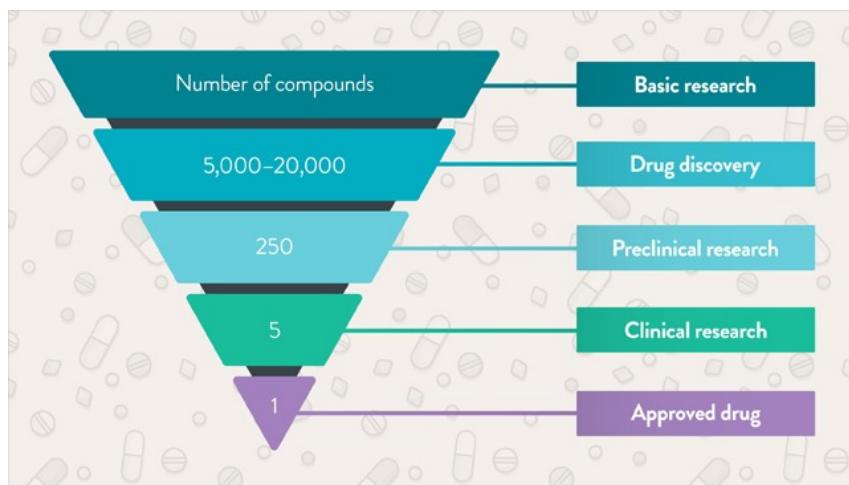
Rode biotechnologie gaat over de medische toepassingen die mogelijk gemaakt worden door onderzoek naar biotechnologie. Enkele voorbeelden zijn tests, ontwikkeling van geneesmiddelen en ontwikkeling van vaccins.

4.1.1 Diagnostische tests

Door ontwikkelingen in diagnostische tests, is het mogelijk om sneller en goedkoper ziektes en aandoeningen op te sporen. Een voorbeeld hiervan is biomarker detectie. Biomarkers zijn moleculen die makkelijk detecteerbaar zijn, en een sterke indicator zijn van een aanwezige ziekte of de gezondheidstoestand van het lichaam. PSA is een voorbeeld van een biomarker die gebruikt wordt bij het opsporen van prostaatkanker. Ook de NIPT test wordt vaak gebruikt bij het detecteren van genetische afwijkingen bij ongeboren baby's, via een simpele bloedafname bij de moeder (risicoloos) kunnen we een schatting maken van de gezondheid van de baby.

4.1.2 Geneesmiddelenontwikkeling en gentherapie

Door het toepassen van de 'High throughput screening' (HTS) methode (figuur 49), is het mogelijk om geneesmiddelen te ontwikkelen. In dit proces beginnen we met onderzoek naar moleculen die potentieel gebruikt kunnen worden om bacteriën te doden. Er wordt een keuze gemaakt om enkele duizenden moleculen te testen. In deze tests worden de bacteriën samengebracht met 1 molecule om te zien of ze zullen sterven, dit is volledig geautomatiseerd. Alle stoffen die erin slagen om de bacterie te doden gaan naar de volgende stap. Hier testen we op toxiciteit bij mensen, dit gebeurd op vrijwel dezelfde manier maar dan met menselijke cellen in plaats van bacteriën. Alle stoffen die niet toxicisch zijn voor menselijk weefsel, kunnen door gaan naar de tests op organismen. Hierbij wordt de stof eerst toe gediened aan gezonde dieren, om te zien wat de effecten zijn. We gaan dan stapsgewijs over naar dieren die besmet zijn met de bacterie. Als deze testen positief zijn, kunnen we over gaan naar menselijke testen. Indien ook deze een gunstig resultaat opleveren, hebben we een werkend medicijn gevonden.



Figuur 49: Hight Throughput screening

Door biotechnologie kunnen we ook bacteriën gebruiken om medicijnen mee te maken. Een voorbeeld hiervan is dat we insuline voor diabeten niet meer halen bij varkens, maar laten produceren door een bacterie. Meer hierover in sectie 11.

4.1.3 Vaccin ontwikkeling

Bij de ontwikkeling van een klassiek vaccin, is het doel om een verzwakte variant van het virus in kwestie te vinden. Dit verzwakte virus zal dan in contact komen met B-cellen, die op hun beurt antilichamen zullen aanmaken om het virus te herkennen. Dit antilichaam zal dan ook onthouden worden door ons immuunsysteem om dan efficiënter te kunnen reageren als het volwaardige virus ons lichaam binnen komt.

Een RNA vaccin geeft de genetische informatie om het antilichaam te produceren direct aan ons immuunsysteem. Dit kan omdat we de RNA instructies met behulp van een lipidejas tot in de cellen krijgen, hierna zal het ribosoom de instructies herkennen om dan te beginnen met de productie van de nodige proteïnen om de antilichamen aan te maken. Opnieuw krijgen we een soort geheugen van dit antilichaam, waardoor ons lichaam efficiënter reageert als het volwaardige virus ons lichaam binnen komt.

4.2 Case study: cellen gebruiken als therapeutisch agens

We gebruiken nu al cellen om mensen te genezen, zo doen we al jaren aan bloed transfusies en orgaan transplantaties. Deze klassieke methoden hebben wel enkele nadelen. Vooral bij orgaan donaties zien we vaak de afstotning van de nieuwe cellen, ook tekorten zijn een groot probleem bij deze technieken.

4.2.1 Welke celtypes

De rode biotechnologie probeert dit op te lossen met behulp van verschillende technieken. In deze case study zullen we dieper ingaan op het gebruik van embryonale-, kiem- en stam-cellen. Dit zijn cellen die over het algemeen nog niet volledig gedifferentieerd zijn, en dus nog hun functie kunnen ‘kiezen’.

4.2.1.1 Volwassen somatische cellen

Het grootste deel van een volwassen menselijk lichaam bestaat uit somatische cellen. Dit zijn de cellen die al gedifferentieerd zijn, omdat ze slechts een beperkte hoeveelheid mitose cycli kunnen ondergaan, gaan deze cellen na een tijdje ‘kapot’. Dit zijn dan ook de cellen die we proberen te vervangen door nieuwe cellen, die nog een langer leven voor zich hebben.

4.2.1.2 Embryonale cellen

Embryonale cellen zijn cellen die aanwezig zijn bij in de blastula fase van de ontwikkeling van een embryo. Deze cellen zien we in drie verschillende soorten: totipotent, pluripotent en multipotent. Deze cellen kunnen respectievelijk differentiëren tot alle, veel of slechts bepaalde celtypen. In een ideaal geval gebruikt men dus het best totipotente cellen. In de praktijk zien we echter dat het vlotter is om met pluri- en multipotente cellen te werken. Deze celtypen hebben nog altijd een groot potentieel, maar zijn makkelijker om mee te werken dan totipotente cellen.

4.2.1.3 Kiemcellen

Kiemcellen zijn cellen die meiose kunnen ondergaan. Bij de mens gaat dit dus om sperma en eicellen. In een volwassen lichaam zijn er relatief weinig cellen van dit soort aanwezig. We kunnen ze wel gebruiken om embryonale cellen te maken.

4.2.1.4 Stamcellen

Stamcellen zijn in kleine mate aanwezig in een volwassen menselijk lichaam. We definiëren ze als cellen die zichzelf vernieuwen, niet gespecialiseerd zijn en hebben nog de mogelijkheid om te differentiëren naar een groot aantal verschillende celtypen. We maken ook een onderscheid tussen volwassen en embryonale stamcellen. Stamcellen zijn tevens de meest interessante cellen om mee te experimenteren.

Omdat stamcellen zo'n groot potentieel kennen, is er een grote vraag. Dit vormt een probleem omdat volwassen stamcellen vrij beperkt voorkomen in ons lichaam. Het gebruik van embryonale stamcellen komt dan weer met ethische problemen. Deze problemen kunnen echter opgelost worden door het modificeren van normale somatische cellen. Door vier specifieke genen te modificeren verkrijgen we een geïnduceerde pluripotente stamcel (iPSC). Deze stamcellen kunnen we dan zonder problemen gebruiken als substitutie voor een normale stamcel.

Over het algemeen verloopt het proces om iPSC's te maken als volgt: We nemen eerst enkele cellen van de patiënt. Deze cellen zullen we dan in vitro modificeren tot een iPSC. Deze laten we dan met specifieke moleculen differentiëren tot het gewenste celtype. Hierna kunnen we de cellen terug bij de patiënt inbrengen. Dit proces biedt enkele voordeelen, het is patiënt specifiek dus de risico's op afstorting dalen sterk. Het type cel waarmee men het proces start maakt niet uit, waardoor we gezonde cellen uit een willekeurig deel van het lichaam kunnen gebruiken om een beschadigd of ziek deel te genezen.

4.2.2 Cellen als therapeutica

Cellen gebruiken als behandeling voor een ziekte is een vrij nieuwe ontwikkeling. Als voorbeeld kunnen we kijken naar de chemo behandeling voor kanker-patiënten. Traditioneel wordt chemo toegediend door de stof rechtstreeks in de bloedstroom te brengen. Hierdoor kan de chemo niet enkel de kankercellen aanvallen, maar ook gezonde cellen. We kunnen chemo op een specifieke plaats in het lichaam laten inwerken door gebruik te maken van cellen. Dit doet men door de chemo in te brengen bij een cel, die op zijn beurt enkel zijn inhoud vrijlaat bij een specifieke plaats in het lichaam zoals kankercellen. Deze methode heet targeted drug delivery.

Een tweede voorbeeld vinden we bij diabetisch patiënten. Door nieuwe β -cellen te maken uit de vooraf beschreven procedure, geven we een patiënt opnieuw de kans om op zichzelf insuline te produceren. Hier komt wel een belangrijk probleem naar boven, er zijn cellen die we makkelijk kunnen maken zoals huidcellen. Maar er zijn ook enkele celtypes die vrij lastig zijn om efficiënt te produceren zoals de cellen die nodig zijn om diabetisch te behandelen.

4.2.3 Van cellen naar weefsels

Het is ook mogelijk om weefsels te maken met stamcellen. Deze weefsels zijn eigenlijk een groep cellen met een gelijkaardige functie die aan het samenwerken zijn. Voorbeelden hiervan zijn zenuwweefsel of spierweefsel. Opnieuw zijn er enkele weefsels die makkelijker te produceren zijn dan andere. Op dit moment is het nog onmogelijk om organen (wat een groep weefsels is) te maken met deze methoden.

4.3 Verschillende rollen van ingenieurs in rode biotechnologie

We hebben ingenieurs nodig om deze doorbraken mogelijk te maken. Om vooruitgang te maken op deze vlakken, moet er een enorme hoeveelheid data verwerkt worden. Dit noemt datamining. Hiervoor hebben we niet alleen ingenieurs nodig met verstand van biologie, maar ook van elektronica en software om alles zo efficiënt mogelijk te laten verlopen.

5 De dynamische cel

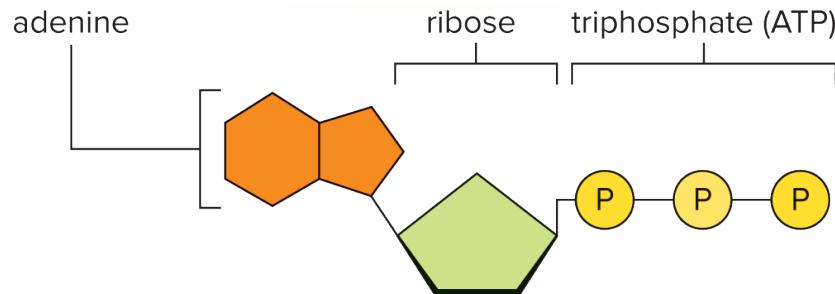
5.1 Wat is energie?

We kennen 2 vormen van energie: potentiële en kinetische energie. We kunnen altijd vormen van energie omzetten in elkaar, er komt wel een verlies kijken bij deze omzetting onder de vorm van warmte. Onze biosfeer haalt zijn energie uit de zon.

In de biologie zullen energie vaak uitdrukken in calorieën. Een calorie wordt gedefinieerd als de energie die nodig is om 1 gram zuiver water met 1 kelvin te laten toenemen. De energie waarden van onze voeding is vaak uitgedrukt in kilocalorieën oftewel 1000 calorieën.

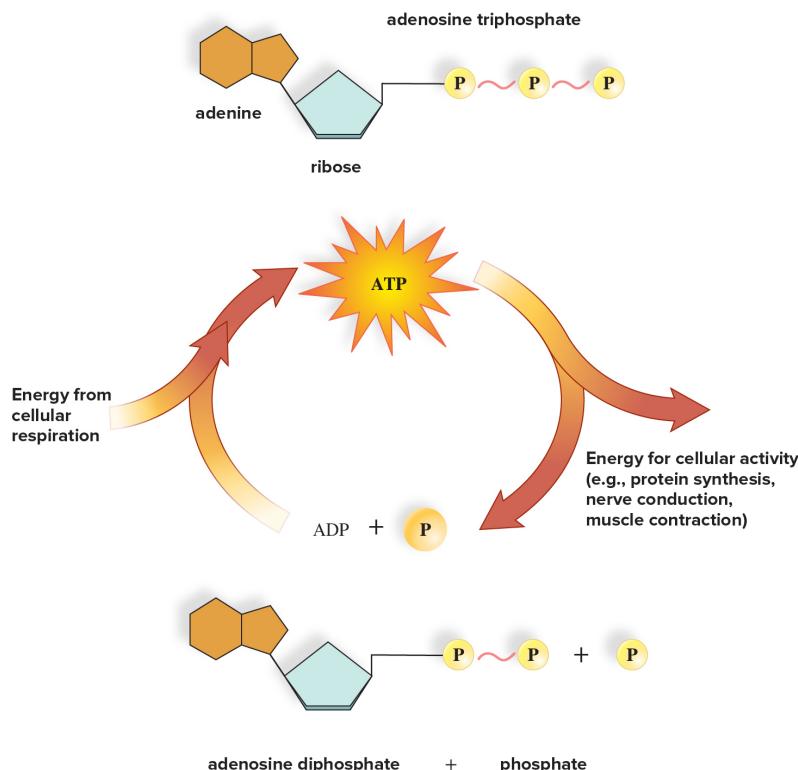
5.2 ATP: energie voor cellen

Adenosinetrifosfaat oftewel ATP (zie figuur 50) is een molecule dat als universele ‘energiemunt’ dient in cellen. ATP wordt dan ook bij enorm veel reacties gebruikt.



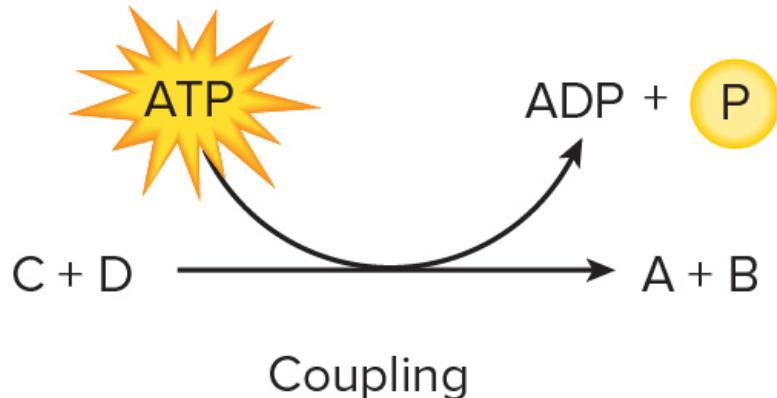
Figuur 50: Adenosinetrifosfaat

ATP kan makkelijk als energie bron dienen omdat het instabiel is, het is namelijk gemaakt uit één nucleotide samen met drie fosfaatgroepen. Door deze onstabiliteit, verliest ATP graag een fosfaatgroep om ADP oftewel adenosinedifosfaat te vormen. Bij dit proces komt heel wat energie vrij. Om terug te gaan naar ATP wordt er energie van de cellulaire ademhaling gebruikt om ADP en de overgebleven fosfaatgroep terug samen te zetten. Deze cyclus van afbraak en regeneratie blijft zich constant herhalen (zie figuur 51).



Figuur 51: ATP cyclus

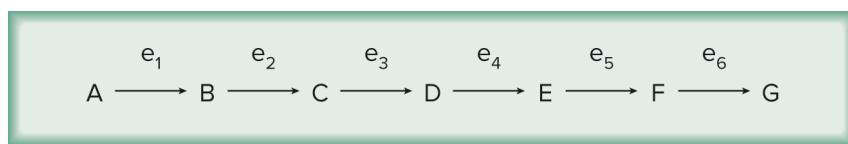
Reacties die ATP gebruiken als energiebron, gebruiken vaak het gekoppeld reactie mechanisme. Dit houdt in dat de energie die nodig is om de reactie uit te voeren geleverd wordt door een parallel lopende afbraak van ATP tot ADP (Zie figuur 52). ATP wordt op zijn beurt gemaakt door de activiteiten van chloroplasten en mitochondriën. Deze zetten respectievelijk via fotosynthese en cellulaire ademhaling, zonnelicht om in ATP.



Figuur 52: ATP koppeling

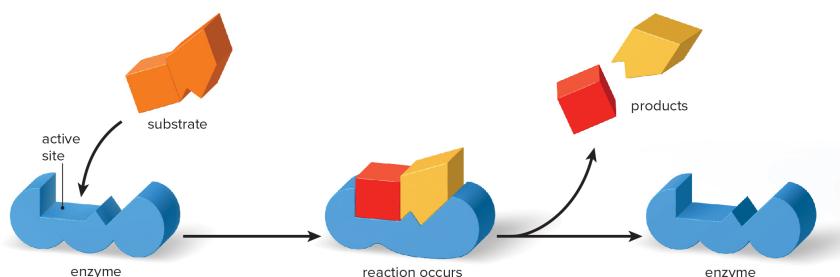
5.3 Metabolische pathways en enzymen

De meeste biologische processen verlopen traag en met veel tussenstappen, dit is natuurlijk niet wenselijk voor de dagelijkse werking van ons lichaam. Om elk van deze deelprocessen te versnellen maakt de natuur gebruik van enzymen (zie figuur 53), dit zijn een soort biologische katalysatoren.



Figuur 53: Reactiestappen ondersteund door enzymen

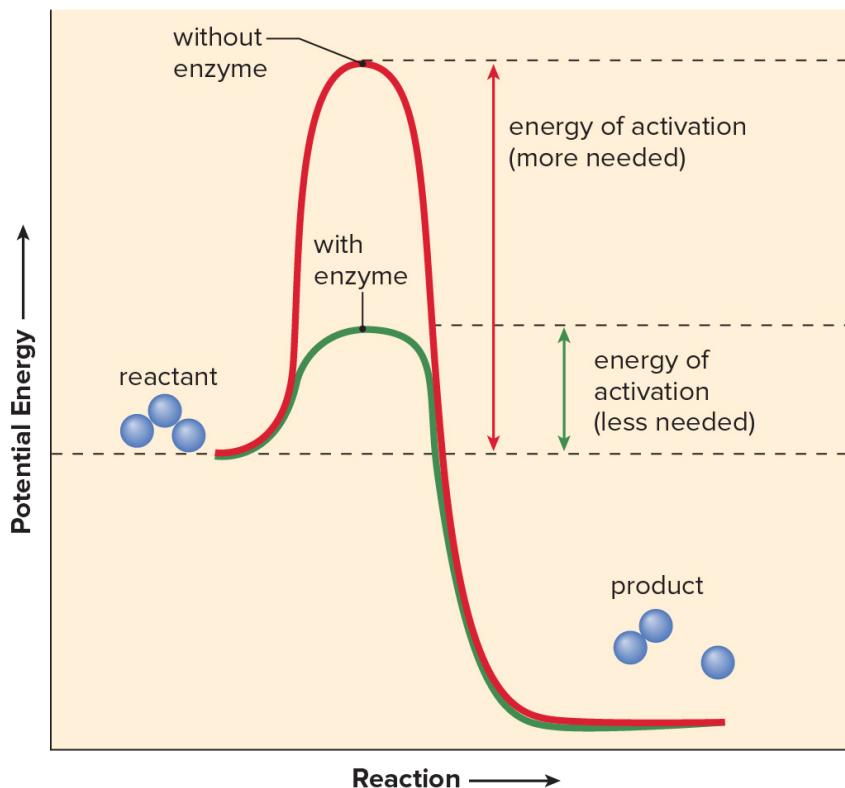
Een enzym heeft een actieve site waarop de echte reactie kan gebeuren. Deze site heeft een specifieke vorm zodat enkel het gewenste substraat gebruik kan maken van het enzym (zie figuur 54). Een belangrijke eigenschap is dat enzymen hergebruikt kunnen worden, dit wil zeggen dat we niet telkens onze energie moeten gebruiken om katalysatoren te produceren.



Figuur 54: Sleutel Slot model

Er is echter wel een probleem met de recyclage van enzymen. Het is mogelijk dat de reactie te veel door gaat, zodat er te veel eindproduct gevormd wordt. Een oplossing is feedbackinhibitie, dit wil zeggen dat het eindproduct ervoor zal zorgen dat één van de eerste enzymen in het reactiemechanisme zijn werk niet meer kan doen, waardoor dat de reactie ook niet meer wordt verdergezet.

Enzymen verlagen de activeringsenergie E_a van de reactie. Deze lagere activatie-energie zorgt ervoor dat het proces exponentieel sneller zal verlopen (zie figuur 55).



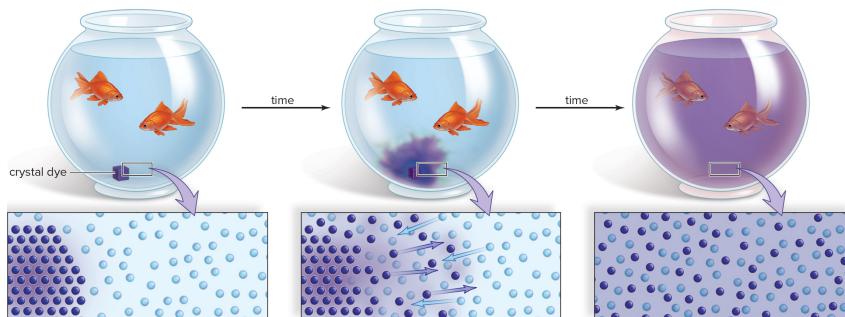
Figuur 55: Activatie energie

5.4 Cellulaire transportsystemen

Cellulaire transportsystemen zijn systemen die het transport door de plasmamembraan regelen. Het membraan is selectief doorlaatbaar: sommige stoffen passeren vrij, andere worden tegengehouden. We kunnen grosso modo drie verschillende manieren onderscheiden: passief, actief en bulk transport.

5.4.1 Passief transport

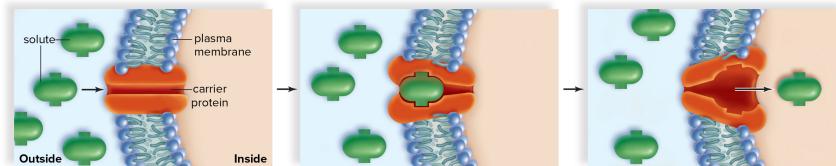
Passief transport is gewone eenvoudige diffusie, er is geen energie nodig voor dit proces. De moleculen bewegen namelijk volgens hun concentratiegradiënt (van hoge concentratie naar lage concentratie), het proces stopt pas als er evenwicht bereikt wordt. De energie die nodig is voor deze beweging komt niet van de cel, maar is een gevolg van het feit dat moleculen op zichzelf al in beweging zijn. Sommige moleculen zijn zelfs in staat om tussen de fosfolipiden van de celmembraan te geleiden.



Figuur 56: Diffusie

5.4.1.1 Facilitated diffusion

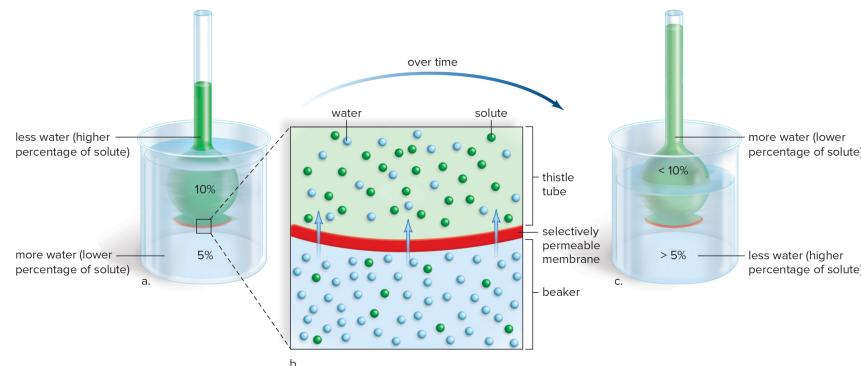
Opnieuw gaat het hier om diffusie, waarbij dat stoffen van een hoge concentratie naar een lage concentratie vloeien. Maar bij facilitated diffusion krijgen de moleculen hulp van een membraanproteïne om op een efficiëntere manier door het celmembraan te gaan.



Figuur 57: Facillitated diffusion

5.4.2 Osmose

Osmose is diffusie van water door een semipermeabel membraan. Hierbij bewegen watermoleculen van een lage concentratie opgeloste stof naar een hoge concentratie opgeloste stof. Bij cellen zal dit transport vaak gaan via aquaporines, dit zijn proteïnen in de kernmembraan die de passage van water mogelijk maken.



Figuur 58: Osmose

5.4.2.1 Isotone omstandigheden

We spreken over isotone omstandigheden als de concentratie van opgeloste stoffen binnen en buiten de cel gelijk zijn. Dit zorgt ervoor dat er netto geen watertransport plaats vindt. Rode bloedcellen bevinden zich in een isotone situatie als ze zich in een 0.9% zoutoplossing (saline) bevinden.

5.4.2.2 Hypotone omstandigheden

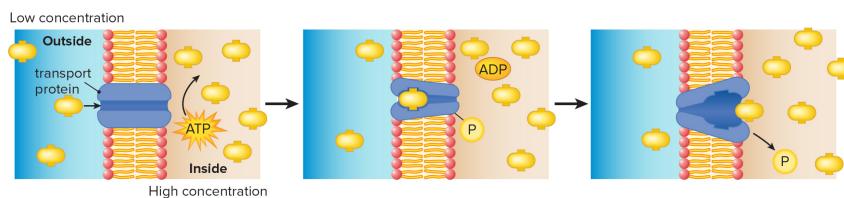
We spreken over hypotone omstandigheden als de concentratie van de opgeloste stoffen binnen de cel groter is dan de concentratie opgeloste stoffen buiten de cel. Deze omstandigheden zorgen ervoor dat water zich zal begeven naar de cel, en die zal als gevolg ook opzwollen. In extreme gevallen kan een cel hierdoor zelfs barsten. Planten gebruiken hypotone omstandigheden om hun vacuole te vullen met water, hierdoor is er wat extra stevigheid.

5.4.2.3 Hypertone omstandigheden

We spreken over hypertone omstandigheden als de concentratie van de opgeloste stoffen binnen de cel kleiner is dan de concentratie opgeloste stoffen buiten de cel. Deze omstandigheden zorgen ervoor dat water zich zal begeven naar de buitenkant van de cel. Dit zal zorgen voor het inkrimpen van de cel in kwestie. In extreme gevallen verliest de cel hierdoor de mogelijkheid om te functioneren.

5.4.3 Actief transport

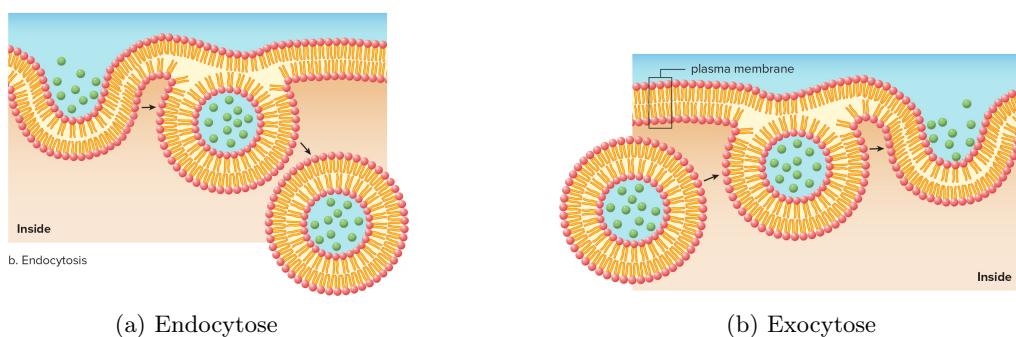
Bij actief transport gebruikt de cel energie om moleculen te bewegen tegen de concentratiegradiënt. Dit proces verloopt opnieuw via transportproteïnen in de celmembraan.



Figuur 59: Actief transport

5.4.4 Bulktransport

Bulktransport wordt meestal gebruikt om macromoleculen te transportereren. Deze zijn namelijk vaak te groot om via normale transportmoleculen vervoerd te worden. Dit proces werkt door de vorming van vesikels waardoor het transport door het cilmembraan mogelijk wordt. We spreken van endocytose (figuur 60a) waarbij we een molecule of partikels naar binnen bewegen, of van exocytose (figuur 60b) waarbij moleculen of partikels naar buiten bewegen.



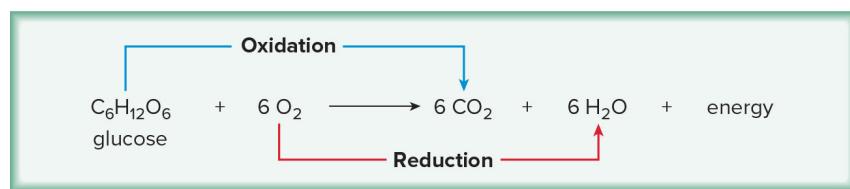
Figuur 60: Bulktransport

6 Energie voor cellen

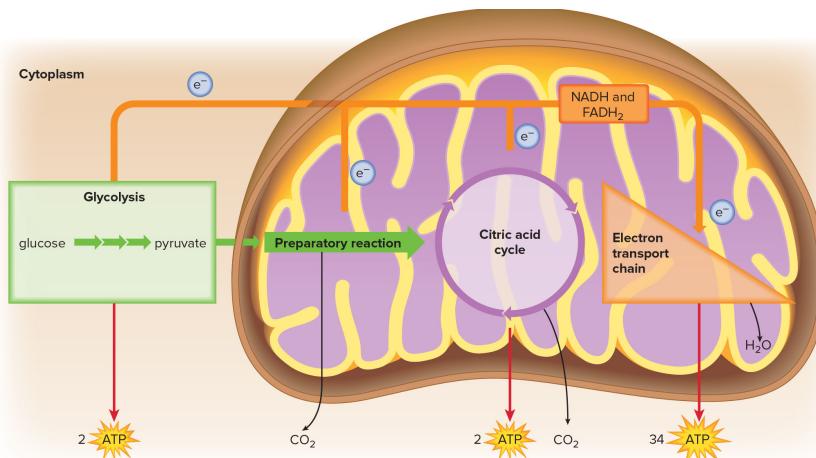
6.1 Cellulaire respiratie

Cellulaire respiratie is het proces om ATP moleculen te produceren. Dit gebeurt in de mitochondriën door glucose te oxideren tot CO_2 en H_2O . De zuurstof die nodig is om dit alles tot een goed einde te brengen, wordt geleverd door onze ademhaling. Vanuit een zuiver biochemisch standpunt is dit het omgekeerde van fotosynthese.

De afbraak van glucose gebeurt stapsgewijs zoals beschreven in sectie 5.3 (zie figuur 61). De energie die vrij komt wordt gebruikt om ATP mee te produceren. De aanwezige co-enzymes (niet-proteïne moleculen die enzymwerking ondersteunen) worden gereduceerd ($+H^+$) zoals bijvoorbeeld $NAD^+ \rightarrow NADH$.

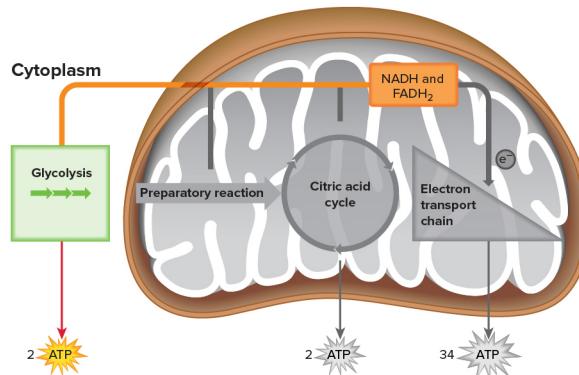


Figuur 61: Oxidatie suiker



Figuur 62: ATP productie

6.2 Buiten de mitochondriën: glycolyse

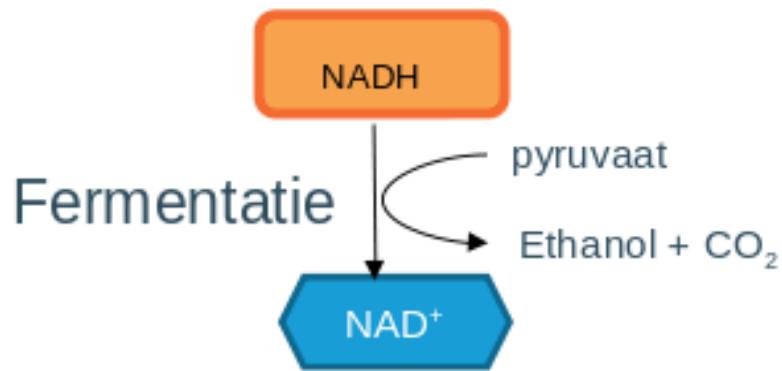


Figuur 63: Glycolyse

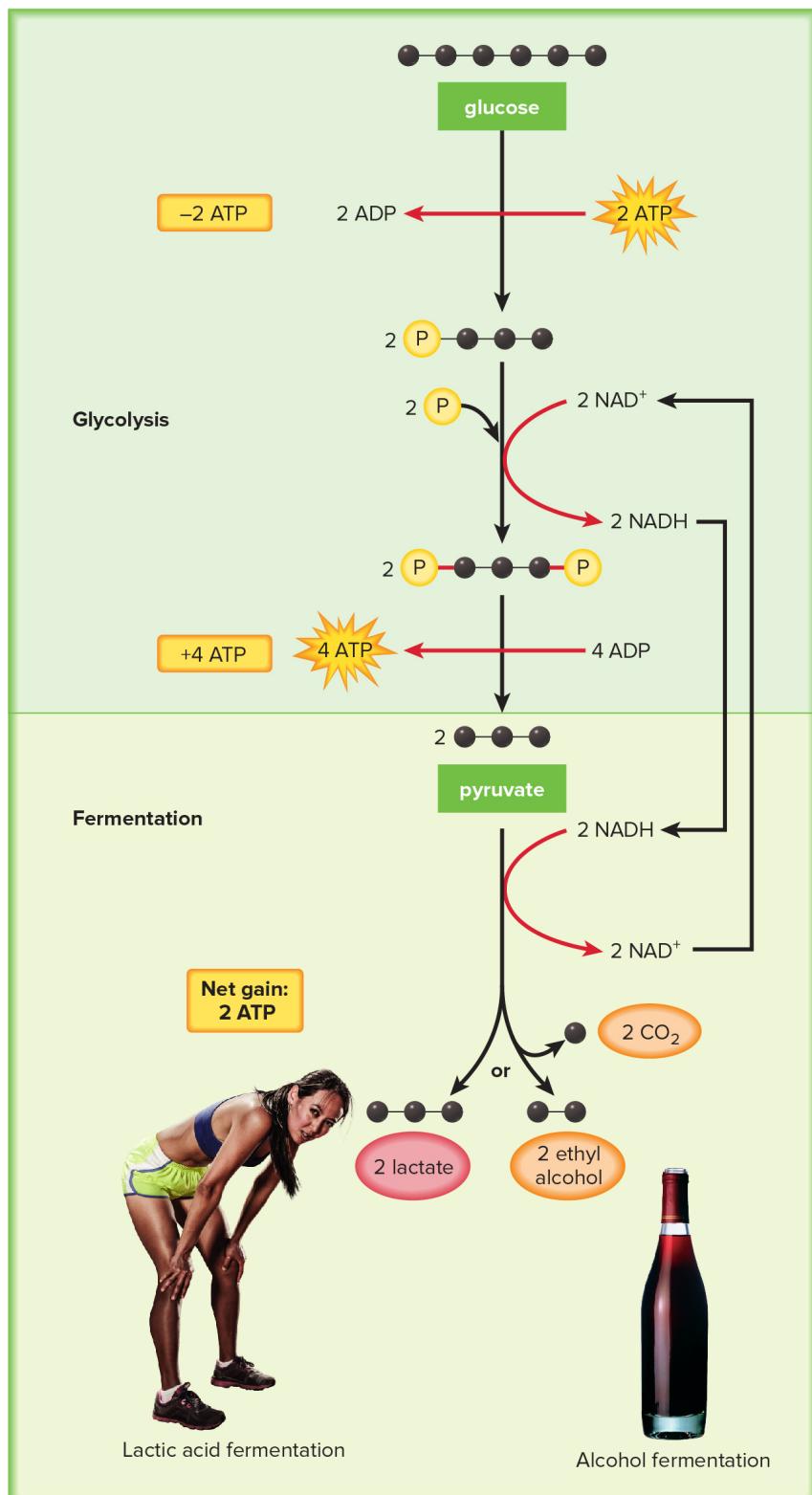
Glycolyse gebeurt vooral in eukaryote cellen. Het proces vindt plaats in het cytoplasma van de cel. Hierbij wordt glucose afgebroken tot twee moleculen pyruvaat. Hierbij komt ATP en NADH vrij. zie figuur 63.

6.3 Buiten de mitochondriën: fermentatie

Fermentatie is een anaeroob proces, dit wil zeggen dat er geen zuurstof wordt gebruikt bij het de productie van energie moleculen (zie figuur 64). Afhankelijk van de cel waarin fermentatie plaats vindt, zullen de reactie producten verschillen. In de mens zullen we vooral pyruvaat omzetten naar lactaat/melkzuur, maar gisten kunnen pyruvaat omzetten naar ethanol en CO_2 .



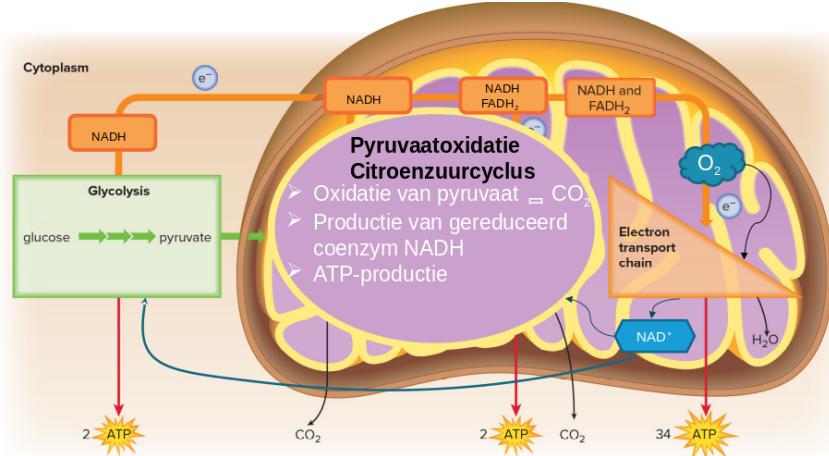
Figuur 64: Fermentatie



Figuur 65: Het volledige energie productie proces buiten de mitochondriën

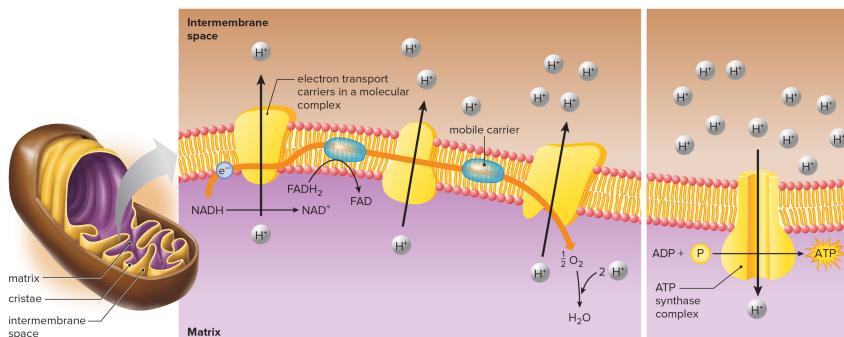
6.4 In de mitochondriën

Binnen de mitochondriën vindt de pyruvaatoxidatie en citroenzuurcyclus plaats. De productie van ATP loopt aan de hand van het schema in figuur 66.



Figuur 66: Mitochondriën energieproductie

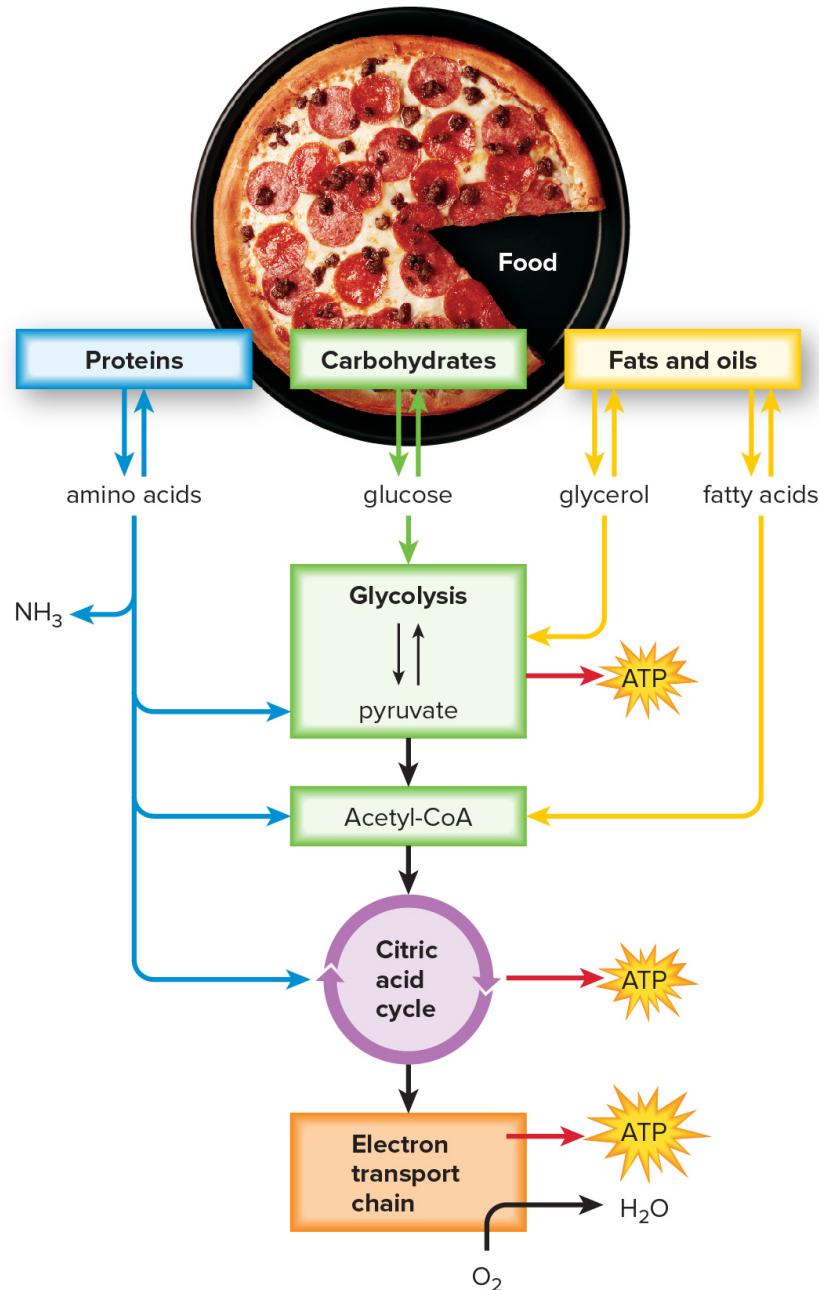
De elektronentransportketen ETC binnen de mitochondriën volgt het schema uit figuur 67. Hierbij stelt de oranje pijl de ‘flow’ van elektronen aan via ‘carriers’ in de ETC. H⁺ ionen accumuleren in de intermembraanruimte van het mitochondrium, deze gradiënt wordt gebruikt in het ATP-synthasecomplex om ATP aan te maken.



Figuur 67: Elektronentransportketen

6.5 Metabolisme van voeding

Cellen gebruiken ook andere energiebronnen zoals proteïnen en vetten. Dit proces loopt volgens het schema in figuur 68.



Figuur 68: Energie in voeding

7 Constructie-biotechnologie

7.1 Wat is constructie-biotechnologie

Bouw-biotechnologie is een interdisciplinair gebied met toepassingen van milieu- en industriële microbiologie en biotechnologie in de geo-technische en civiele techniek. In dit hoofdstuk zullen we ons focussen op beton.

7.2 Beton

De samenstelling van beton is als volgt:

- Cement
 - tricalciumsilicaat ($3CaO \cdot SiO_2$)
 - dicalciumsilicaat ($2CaO \cdot SiO_2$)
 - tricalciumaluminaat ($3CaO \cdot Al_2O_3$)
 - tetra-calciumaluminofierriet ($4CaO \cdot Al_2O_3Fe_2O_3$)
- Water
- Aggregaat: Zand / grind - vermalen steen

Als men dit initieel mengt, vormt er een soort amorf gel. Als deze substantie uit hard, krijgen we beton. Afhankelijk van de onderlinge percentuele aanwezigheid van de verschillende ingrediënten, krijgen we beton voor specifieke toepassingen.

Omdat beton zo frequent gebruikt wordt als bouw materiaal, is het essentieel dat we de faal-karakteristieken goed in kaart brengen. In dit hoofdstuk focussen we vooral op het kraak gedrag van beton. We kiezen hier bewust om kraken omdat het de belangrijkste reden voor het falen van beton is, daarnaast bestaan er al enkele technieken om dit gedrag te vermijden dankzij biotechnologie.

7.2.1 Scheuren herstellen in beton

Als men een scheur opmerkt in een constructie gemaakt uit beton, is het aangeraden om deze onmiddellijk op te vullen. Idealiter is er geen tussenkomst nodig van een persoon om dit op te merken, maar wordt de scheur zonder meer op zichzelf hersteld. Voor we het kunnen hebben over biologische oplossingen bespreken we kort even de niet-biologische methoden.

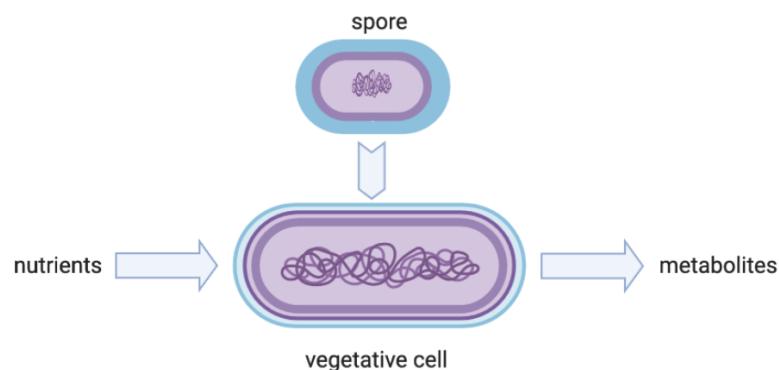
Het autogeen proces gebruikt enkel de originele componenten van het materiaal om aan zelf-herstelling te doen. Dit wordt mede mogelijk gemaakt door de specifieke chemische samenstelling van het beton. Onder gunstige toestanden (temperatuur, ...) kan dit proces zelfs versneld worden. Een autonoom proces werkt met (niet-biologische) additieven om het herstel mogelijk te maken. Er worden twee verschillende componenten gebruikt: een omhulsel (ureum-formaldehyde, glas, silica) en een opvulmiddel (calciumnitraat, epoxyresin ...).

7.2.2 Biologisch zelf-herstellend beton

Een biologisch proces om het zelf-herstel van beton mogelijk te maken is het ‘autonom’ proces. Het lijkt sterk op de autonome aanpak uit de niet-biologische technieken, met als verschil dat de additieven dit maal van biologische aard zijn.

De organismen die verantwoordelijk zijn voor het opvullen van de scheuren moeten voldoen aan bepaalde vereisten om zo de stabiliteit van het beton op lange termijn te garanderen. De organismen moeten namelijk levend kunnen blijven in extreem uitdagende omstandigheden. Daarbij mogen ze enkel actief worden als er een scheur aanwezig is. Tot slot moeten ze moleculen produceren die het herstel bevorderen.

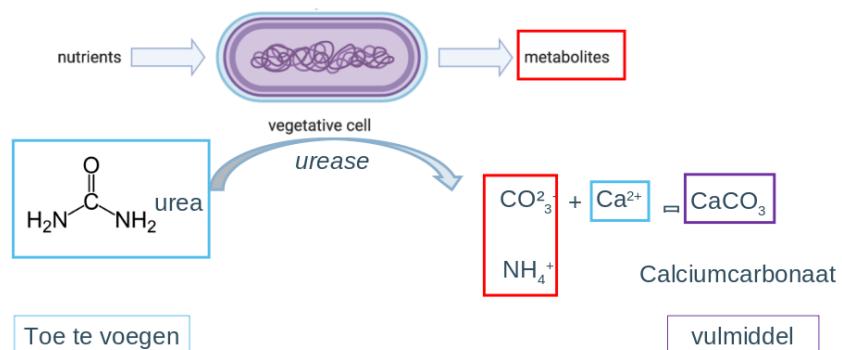
De eerste vooropgestelde voorwaarde is om levend te blijven in de extreme omgeving waarin het organisme terecht zal komen. Beton is namelijk een basische omgeving ($\pm pH 13$), heeft een relatief lage temperatuur en kent weinig tot geen aanwezigheid van nutriënten. Hierdoor kiezen we een spore uit als micro-organisme (zie figuur 69). Een spore is namelijk een staat waarin een bacterie zich kan bevinden, we kunnen deze staat vergelijken met een soort ‘winterslaap’. Er is geen detecteerbaar metabolisme, de cel is extreem resistent en kan jaren overleven in deze staat.



Figuur 69: Spore

Deze spore kan dan terugkeren naar een vegetatieve (normale) staat als er een scheur optreedt. Dit kan door het contact met zuurstof of water geïnitieerd worden.

We eisen ook dat de bacterie stoffen aan maakt die het herstel van de scheur bevorderd. Hierbij maakt het niet uit of de metabolieten van de cel direct gebruikt worden om de scheur te vullen, of dat geproduceerde enzymen het vullen van de scheur vooruit helpt (Zie figuur 70).



Figuur 70: Biologisch herstellen van een scheur

8 Witte biotechnologie: case biobrandstoffen

8.1 Wat is witte biotechnologie

Witte biotechnologie is industriële biotechnologie. Het is de aanwending van hernieuwbare grondstoffen of biomassa voor duurzame productie van chemicaliën, biomaterialen en biobrandstoffen met behulp van micro-organismen en/of enzymen. We combineren dit vaak ook met duurzame processen, waarbij we het energieverbruik en de afvalproductie tot een minimum beperken.

8.1.1 Fermentatie en bioconversie

Witte biotechnologie is gebaseerd op twee technieken: fermentatie en biokatalyse/bioconversie. Bij fermentatietechnologie gebruiken we micro-organismen zoals gisten of schimmels om producten te produceren onder gecontroleerde omstandigheden. Biokatalyse betekent dat we processen zullen katalyseren met enzymen. Opnieuw zorgen we ervoor dat de omstandigheden onder controle zijn.

8.1.2 Biomassa

Er bestaan veel verschillende definities van biomassa. In deze case gebruiken we de volgende: ‘De biologisch afbreekbare fractie van producten, afvalstoffen en residuen van de landbouw (met inbegrip van plantaardige en dierlijke stoffen), de bosbouw en aanverwante bedrijfstakken, alsmede de biologisch afbreekbare fractie van industrieel en huishoudelijk afval’. We gebruiken deze biomassa om verschillende producten mee te maken. In deze case zullen we het hebben over biobrandstoffen.

8.2 Biobrandstoffen

In 2006 werd de huidige versie van biobrandstof op de markt gebracht. Deze brandstof is bio-ethanol afgeleid van cellulosehoudende biomassa. Dit is een enorme stap vooruit tegenover de voorganger die gemaakt werd uit suiker- en zetmeelhoudende biomassa. Dit had een potentieel voedingstekort als gevolg.

8.2.1 Bio-ethanol van lignocellulose

Bio-ethanol kent enkele voordeelen tegenover aardolie. Het heeft een hoger octaangetal wat zorgt voor een betere verbranding in de motor. Het is ook een koolstofneutrale hernieuwbare brandstof, het heeft dus een gunstige invloed op het klimaat. We kunnen bio-ethanol ook toe voegen aan benzine, dit zorgt voor een schonere verbranding met minder uitstoot van broeikasgassen.

8.2.1.1 Lignocellulose

Lingocellulose is biomassa die hoofdzakelijk bestaat uit cellulose, hemicellulose en lignine. Afhankelijk van de originele grondstof kunnen deze drie componenten in verschillende verhoudingen aanwezig zijn. Het is dus belangrijk om rekening te houden met de origine van de gebruikte biomassa.

Cellulose is een onvertakt lineair polymeer opgebouwd uit D-glucose eenheden met β -1,4 verbindingen. We vinden deze moleculen vooral in de planten-celwand samengepakt in microfibrillen die onderling gestabiliseerd worden door waterstofbruggen. Het heeft een kristallijne structuur die oplosbaarheid in water onmogelijk maakt. We associëren dit molecuul ook vaak met hemicellulose en lignine.

Hemicellulose is een vertakt heteroogeen polysacharide bestaande uit C_5 en C_6 suikers. De hoofdketen is gemaakt uit β -1,4 gebonden D-xylose eenheden, de zij-ketens daarentegen worden uit verschillende types suiker opgebouwd (D-xylose, L-arabinose, D-galactose, D-mannose + uronzuren). De vertakkingsmate van deze amorfse structuur is sterk afhankelijk van de originele grondstof.

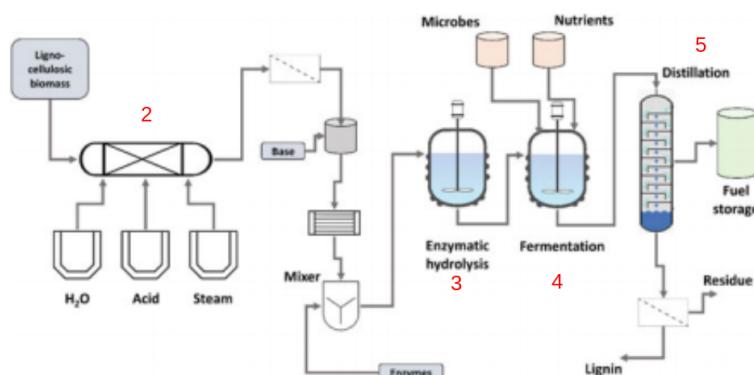
Lignine is een aromatisch en een sterk bio-polymeer, dat covalent gebonden is aan hemicellulose. Het is een belangrijk molecuul om de rigiditeit van een planten-celwand te garanderen. Lignine is opgebouwd uit p-hydroxyfenylpropan-eenheden. Het is resistent tegen chemische en enzymatische afbraak; biologische afbraak gebeurt vaak door schimmels. Door deze resistentie is het aangeraden om geen hoge concentratie Lignine te hebben in biomassa die men wil gebruiken voor de productie van biobrandstof.

8.2.1.2 Productie

De productie van bio-ethanol verloopt in vijf stappen:

1. Vermalen van plantenmateriaal (Reductie deeltjesgrootte)
2. Voorbehandeling (Waarbij cellulose en eventueel hemicellulose worden vrijgesteld)
3. Hydrolyse (Afbraak van carbohydraatpolymeren tot monomere suikers)
4. Fermentatie (Suikers worden door micro-organismen omgezet in ethanol)
5. Opzuivering (Destilleren van de bekomen ethanol)

We kunnen dit als volgt schematisch voorstellen:



Production of ethanol from lignocellulosic biomass feedstock. A simplified scheme

Figuur 71: Productie van bio-ethanol

8.2.1.3 Voorbehandeling

De doelstelling van de voorbehandeling is om de cellulose beter toegankelijk te maken voor de daaropvolgende hydrolysestap. De materialen die men hiervoor gebruikt zijn van groot belang voor de hoeveelheid afval alsook de kosten van deze stap.

8.2.1.4 Hydrolyse

De doelstelling van de hydrolyse is de conversie van hemicellulose en cellulose in monomere suikers. Dit kan doorgaan door middel van zuur of enzymen. Vaak zal men kiezen voor een enzymatische hydrolyse omdat het bij lagere temperaturen en druk kan, er bijna geen afbraak producten gevormd worden, er geen extra chemicaliën nodig zijn, er geen nood is aan recuperatie en neutralisatie, en er meestal een hogere glucose opbrengst is door de lagere vorming van toxiche producten.

8.2.1.5 Fermentatie

De doelstelling van de fermentatie is om voor de conversie van hexose en pentose naar ethanol te zorgen. Dit gebeurt door middel van bacteriën, gisten of schimmels onder anaerobe omstandigheden. De theoretische opbrengst hierbij is ongeveer een halve kilogram ethanol per kilogram suiker.

De micro-organismen die men gebruikt voor deze stap moeten voldoen aan volgende voorwaarden om een degelijke efficiëntie te bereiken:

- Breed substraatgebruik
- Hoge ethanolopbrengst en productiviteit
- Tolerant voor hoge glucose- en ethanolconcentraties
- Tolerant voor inhibitoren
- Tolerant voor lage pH

Er zijn twee voornaamste technieken om de fermentatie toe te passen:

Fermentation process	Features and advantages	Limitations
Simultaneous saccharification and fermentation	Low costs Higher ethanol yields due to removal of end product inhibition of saccharification step	Difference in optimum temperature conditions of enzyme for hydrolysis and fermentation.
Separate hydrolysis and fermentation	Reduces the number of reactors required Each step can be processed at its optimal operating conditions Separate steps minimize interaction between the steps	End product inhibition minimizes the yield of ethanol. Chance of contamination due to long period process

Figuur 72: Fermentatie technieken

8.2.1.6 Opzuiveren

Het doel van de opzuivering is om de bio-ethanol af te zuiveren van alle andere aanwezige componenten. Dit gebeurt via destillatie.

8.2.2 Productie van biodiesel

We richten ons hier op het omzetten van plantaardige oliën in een mengsel van methylesters door verestering van de triglyceriden met laag-moleculaire alcoholen (veelal methanol). De trans-verestering genereert een product met vergelijkbare fysicochemische eigenschappen als conventionele diesel.

Het proces kan beschreven worden als een base-gekatalyseerde reactie met natrium- of kalium-hydroxide. Dit heeft als voordelen dat er geen hoge temperatuur of druk nodig is, en dat de vrijstelling van glycerol in de reactie een potentieel verkoopbaar bijproduct genereert. Om deze reactie te optimaliseren kunnen we kijken naar de temperatuur, reactietijd, molaire verhouding olie/alcohol en het type katalysator.

9 Proteïnen

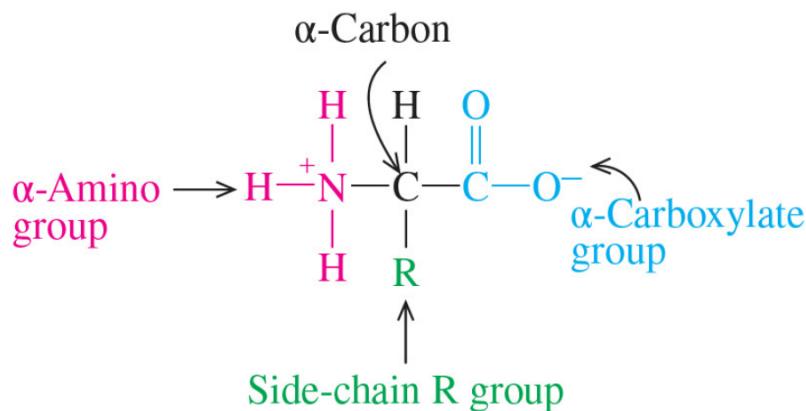
9.1 Inleiding

Eiwitten worden overal gebruikt in ons lichaam. De toepassingen kunnen variëren van structurele doelen tot biologische katalyse met enzymen. Deze grote variatie is te danken aan de grote diversiteit in (3D-)structuur bij proteïnen.

9.2 Aminozuren

9.2.1 Structuur en eigenschappen

In deze sectie hebben we het voornamelijk over de structuur van α -aminozuren. Ze bestaan uit een carboxylgroep (organisch zuur) en een aminogroep (organische base) gekoppeld aan een C_α atoom. Dit is een chirale koolstof dat voor twee enantiomeren zorgt (behalve bij glycine) (zie sectie 1.3.1). We spreken pas van proteïnogene aminozuren als ze in een L-configuratie voorkomen.



Figuur 73: Structuur aminozuur

De eigenschappen van een aminozuur hangen deels af van de pH van de omgeving. Bij een lage pH zal het aminozuur een kation vormen, bij een hoge pH daarentegen zal het een anion vormen. Tot slot zal er bij een neutrale pH een zwitterion gevormd worden. De grootste impact op de eigenschappen van het aminozuur komt echter van de R-groep die onderaan gebonden is in figuur 73. We onderscheiden hier vier verschillende subgroepen in:

- hydrofoob
- hydrofiel (met polaire R-groepen)
- hydrofiel (met positief geladen R-groepen)
- hydrofiel (met negatief geladen R-groepen)

Het is vooral belangrijk dat men deze subgroepen kan herkennen. Het is niet de bedoeling dat alle namen en structuren uit het hoofd geleerd worden.

9.2.2 Aminozuren in voeding

Aminozuren zijn een uitstekende bron van koolstof, stikstof en zwavel. Eiwitrijke voeding zoals vis, vlees of een goede mix aan groenten zijn dus ideaal om deze stoffen op te nemen. Bovendien bevat de vermelde voeding essentiële aminozuren. Essentiële aminozuren zijn aminozuren die ons lichaam niet zelf kan aanmaken maar wel nodig heeft om correct te functioneren.

9.2.3 Niet-proteïnogene aminozuren

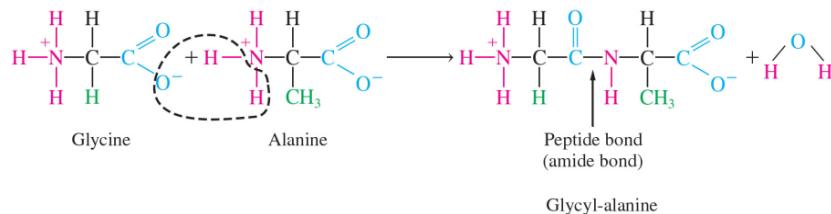
Niet-proteïnogene aminozuren zijn aminozuren die geen deel uitmaken van een proteïne. Voorbeelden hiervan zijn:

- Thyroxine: schildklierhormoon
- γ -aminoboterzuur (GABA): neurotransmitter
- β -Alanine: celwand

9.3 Peptidebinding

9.3.1 Peptiden en Polypeptiden

Peptiden bestaan uit verschillende aminozuren die aan elkaar gekoppeld zijn. Het gaat hierbij om een reactie tussen de carboxylgroep van één aminozuur en de aminogroep van een ander aminozuur, zoals in figuur 74 te zien is. Hierbij verdwijnen de ladingen van de carboxyl- en aminogroep.



Figuur 74: Koppeling van aminozuren

De algemene naamgeving van peptiden is gebaseerd op het aantal gebonden aminozuren:

- Minder dan 20: oligopeptiden
- Tussen 20 en 50: polypeptiden
- Meer dan 50: proteïnen

Tot slot zijn er nog enkel aparte gevallen zoals dipeptiden, bijvoorbeeld glycylalanine. Het is belangrijk wanneer we de chemische structuur willen tekenen, dat we de moleculen oriënteren van het N-uiteinde naar het C-uiteinde.

9.3.2 Chemische en biologische synthese van peptiden

Om peptiden te synthetiseren kunnen we gebruik maken van 2 processen: chemische synthese en biosynthese. Bij chemische synthese laten we twee aminozuren met elkaar reageren op een gecontroleerde manier. De controle op dit proces is echter gelimiteerd, het is namelijk moeilijk om de juiste oriëntatie en volgorde te garanderen. Hierdoor ontstaan veel ongewenste bijproducten. Om dit te vermijden, maken we gebruik van ‘blokken’. Hierbij blokken we bepaalde reactieve groepen door een tijdelijke groep aan te brengen. Na het aanbrengen, kunnen we de aminozuren met elkaar laten reageren om dan tot slot de tijdelijke blokker-groepen te verwijderen. Het hele proces duurt lang, zorgt voor veel afval en is over het algemeen duur. Daarom gebruikt men liever biosynthese.

Bij biosynthese maakt men gebruik van verschillende cellen om de peptiden te produceren. Concreet werken we met een specifieke nucleotide-sequentie (mRNA) die door het ribosoom vertaald wordt in een aminozuur-sequentie. Deze synthese kent zijn oorsprong bij het stikstof uiteinde van een peptide, om zo verder te bouwen tot het eind. Meer informatie over het ribosoom kan men vinden in sectie 10.

9.4 Structuur van proteïnen

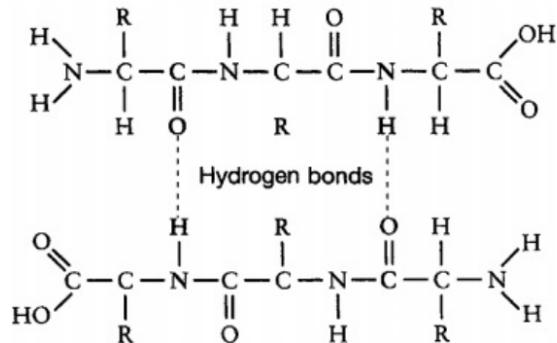
9.4.1 Primaire, secundaire, tertiaire en quaternaire structuur

9.4.1.1 Primaire structuur

Op een moleculair niveau zijn peptiden een lineaire opvolging van aminozuren. Per conventie tekenen we deze keten van stikstof- naar koolstof-uiteinde. Elk van deze aminozuren is verbonden met de volgende door middel van een peptide-binding. We krijgen hierdoor ook een vlakke ruimtelijke structuur. Meer specifiek door de resonantiestructuur en het gedeeltelijk dubbel bindingskarakter van de sp^2 -hybridisatie.

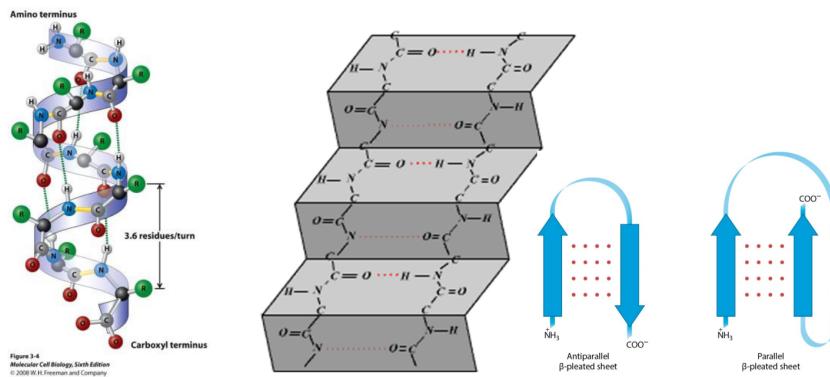
9.4.1.2 Secundaire structuur

De secundaire structuur houdt rekening met de interacties tussen verschillende moleculen. Zo zien we dat door middel van een waterstofbrug tussen amide- en carbongroepen (zie figuur 75) een soort lokale vouw voorkomt in specifieke structuren.



Figuur 75: Secundaire structuur proteïne

We zien deze vouwen voornamelijk terugkomen onder de vorm van een α -helix of een β -sheet. De α -helix vorm zal uitsluitend met zichzelf een waterstofbrug vormen, wat zal leiden tot een vorm zoals te zien is in het linker deel van figuur 76. Een β -sheet daarentegen kan interacties vormen met andere peptiden, maar dit is niet altijd noodzakelijk. Het kan ook voorkomen dat een peptide met zichzelf een β -sheet vormt zoals te zien is op het rechterdeel van figuur 76. We spreken hierbij over antiparallel en parallel.



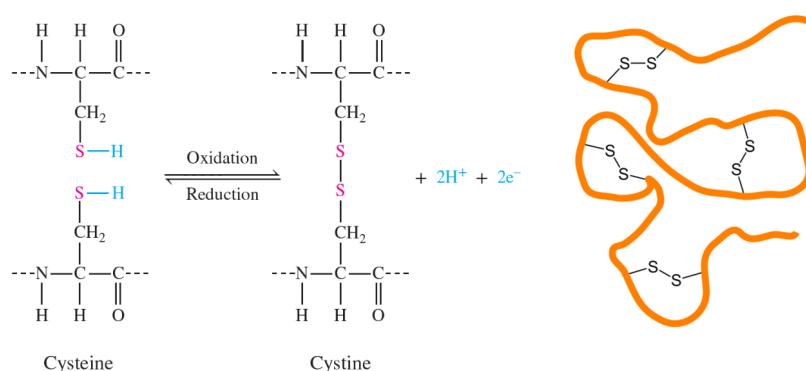
Figuur 76: α -helix (links), β -sheet (midden) en configuratie β -sheet (rechts)

9.4.1.3 Tertiaire structuur

De tertiaire structuur van een proteïne bepaalt over de globale vouwing van de structuur. Dit gedrag kan is afkomstig van de interacties tussen de zij-ketens van aminozuren:

- Van der Waals krachten tussen hydrofobe R-groepen
- H-bruggen tussen polaire R-groepen
- Ionbindingen (lading-lading interacties)
- Covalente bindingen (disulfidebindingen)

Een disulfidebinding ter illustratie:



Figuur 77: Disulfidebinding

9.4.1.4 Quaternaire structuur

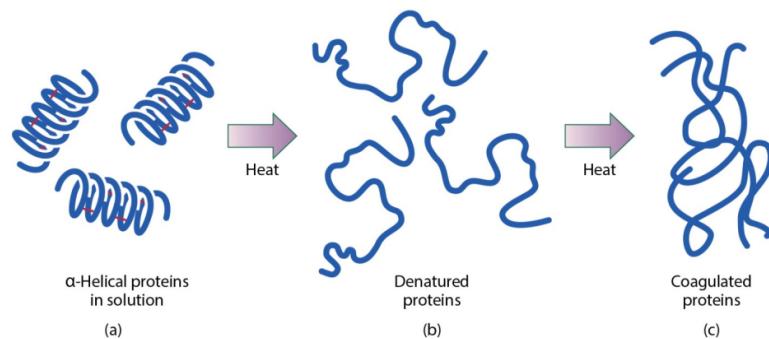
De quaternaire structuur van een proteïne is niet altijd aanwezig, omdat het gaat over de interactie tussen verschillende volwaardige polypeptiden (subeenheden) om samen een groter geheel te vormen. Deze associatie kan ontstaan door interactie tussen de R-groepen van de aanwezige aminozuren. Hemoglobine is een voorbeeld van een eiwit waar de quaternaire structuur wel aanwezig is.

9.4.2 Cofactoren

Cofactoren zijn de niet-proteïne gedeelten die associëren met het proteïne. Dit kan gaan over anorganische cofactoren zoals metaalionen of Fe-S clusters, maar ook om organische cofactoren zoals vitamines of afgeleiden. Deze onderdelen van het proteïne zijn essentieel voor de biologische werking in ons lichaam. Zo heeft hemoglobine een heemgroep (Fe^{II+}) nodig om een binding aan te gaan met O_2 en vervolgens de O_2 doorheen het lichaam te transporteren.

9.4.3 Denaturatie

Denaturatie is het breken van zwakke interacties binnen een proteïne structuur. De secundaire, tertiaire en quaternaire structuur zullen breken, maar de primaire structuur niet. Aangezien de 3D-structuur volledig veranderd, verliest het proteïne zijn mogelijkheid om zijn functie uit te voeren. Vaak zal dit leiden tot de coagulatie (klontervorming) en precipitatie (neerslagvorming) van de eiwitten.



Figuur 78: Denaturatie van proteïnen

We kunnen vaak het denaturatie proces op gang brengen door de temperatuur te verhogen, de pH te wijzigen, interacties met detergenten of solventen, interactie met zware metalen of zelfs mechanische spanning aan te brengen.

9.5 Voorbeelden en toepassingen

9.5.1 Collageen: voorbeeld van structuurproteïne

Collageen heeft een belangrijke structuurfunctie in binnen onze huid, bindweefsel, kraakbeen, . . . Het bestaat uit een trippel helix van drie eiwitten. Enkele belangrijke aminozuren in collageen zijn:

Glycine: klein genoeg om in triple helix te passen; H-bruggen tussen ketens

Hydroxyproline en hydroxylysine: covalente bindingen die aangrenzende collageenmoleculen met elkaar verbinden

Verder kent collageen toepassingen in de geneeskunde zoals kunsthuid en toepassingen in de keuken zoals gelatine.

9.5.2 Antistoffen

Antistoffen zijn complexe moleculen die enkel biologisch gesynthetiseerd kan worden. Het zijn stoffen die gebruikt worden binnen ons lichaam om bepaalde cellen te herkennen. In het dagelijkse leven gebruiken we ook technologieën die gebaseerd zijn hierop: een zwangerschapstest, bloedgroeptest of zelfs een corona sneltest.

9.5.3 Enzymen

Enzymen zijn biologische katalysatoren die specifieke chemische reacties kunnen versnellen. In de industrie kennen we volgende toepassingen:

- Brouw- en fermentatieprocessen
- Afbraakenzymen (bijv. proteases, amylases, lipases,...) in reinigingsproducten en contactlensvloeistoffen
- Afbraak van cellulose door cellulase- enzymen ⇒ productie van bio-ethanol
- Verbetering van de voedselkwaliteit (bijv. kaasproductie)

9.5.4 Bio-batterijen

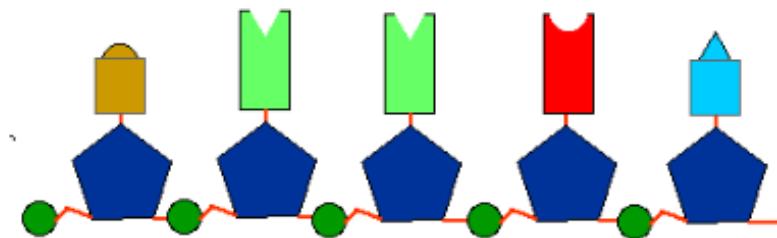
We kennen twee soorten bio-batterijen:

- Enzymatische biobatterij (vb. Glucose bio-batterij)
- Biobrandstofcel (“Microbial Fuel Cell”): oxidatie van organische componenten door microorganismen genereert electronen

10 DNA biologie

10.1 Functie van DNA en RNA

DNA en RNA zijn allebei opgebouwd uit lineaire ketens van nucleotiden. Concreet betekend dit dat er een ruggengraat aanwezig is van suiker en fosfaat om de structuur te ondersteunen. Het specifieke suikermolecuul verschilt wel voor DNA en RNA, respectievelijk worden ze gemaakt met desoxyribose en ribose. Verder hangt er aan elk suikermolecuul een stikstofhoudende base die kan variëren: Adenine (A), Guanine (G), Cytosine (C), Thymine (T) bij DNA / Uracil (U) bij RNA.



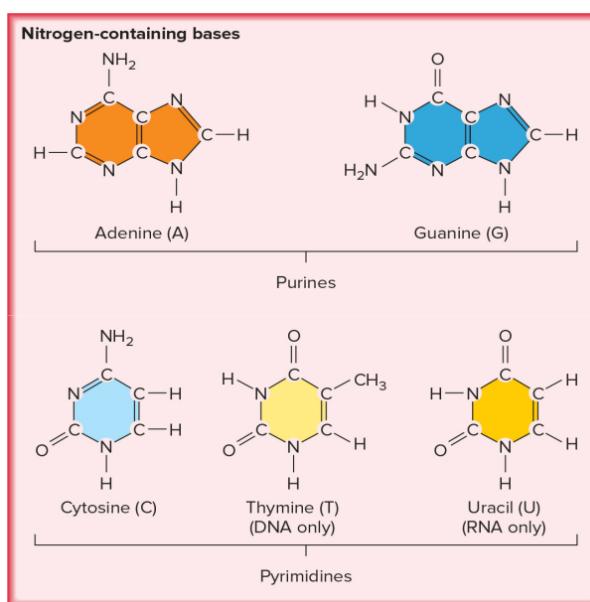
Figuur 79: De structuur van DNA en RNA

Iedere groep van minimaal één fosfaat groep, suikermolecule en stikstofbase heet een nucleotide. Dit zijn de bouwblokken waaruit een DNA of RNA streng wordt opgebouwd.

10.1.1 Structuur nucleotiden

10.1.1.1 Structuur van stikstofbasen

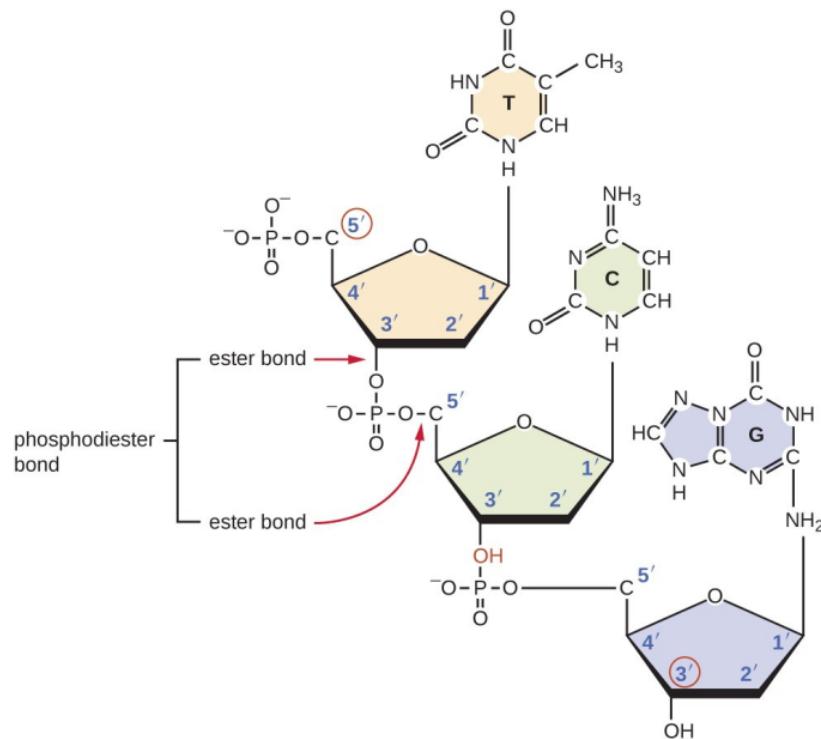
We maken een onderscheid tussen Pyrimidines (Y) en Purines (R). Het duidelijkste verschil tussen beide is dat pyrimidines slechts één koolstofring hebben terwijl purines er twee hebben, zoals te zien is op figuur 80.



Figuur 80: Verschil tussen Pyrimidines en Purines

10.1.1.2 Phosphodiëster binding

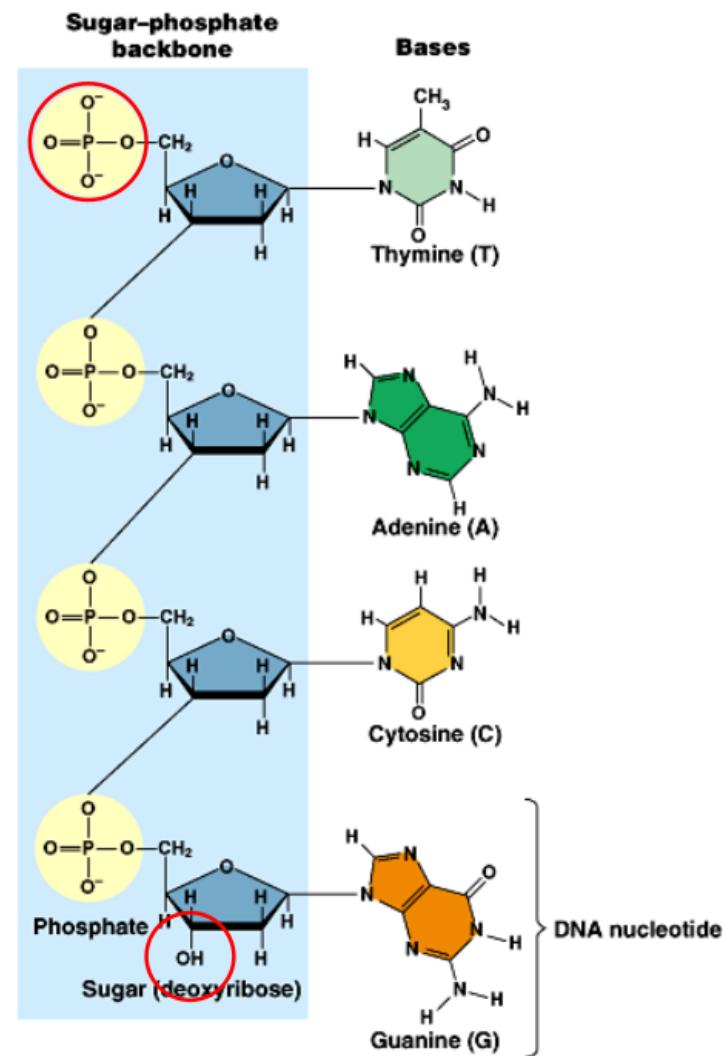
Op figuur 81 is de structuur van een phosphodiëster binding te zien. Dit is de binding die alle nucleotiden met elkaar verbindt.



Figuur 81: Phosphodiëster binding

10.1.2 Primaire, secundaire en tertiaire/quaternaire structuur

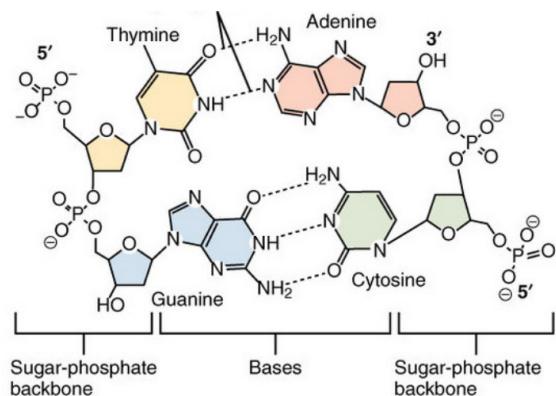
10.1.2.1 primaire structuur nucleïnezuren



Figuur 82: Primaire structuur nucleïnezuren

We zien in figuur 82 dat een nucleïnezuur gewoon een opvolging is van verschillende nucleotiden. De verbinding tussen deze nucleotiden bestaat uit een phosphodiëster binding. We merken ook op dat dit specifiek streng georiënteerd is volgens 5'P-3'OH.

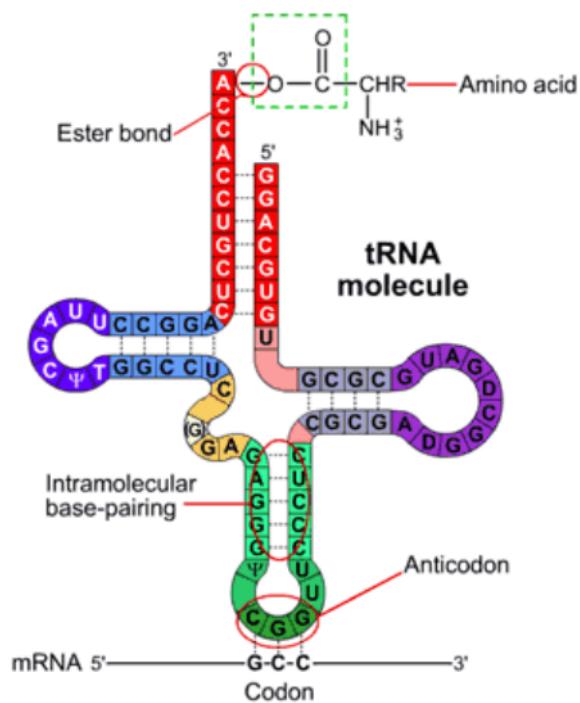
10.1.2.2 Secundaire structuur DNA



Figuur 83: Secundaire structuur DNA

Bij DNA zullen we altijd twee anti-parallele strengen vinden met complementaire nucleotiden (A&T en G&C). Deze voorwaarden zijn noodzakelijk om de waterstof bruggen te kunnen vormen tussen beide strengen. Uiteindelijk leidt dit tot de typische dubbele helix structuur van DNA.

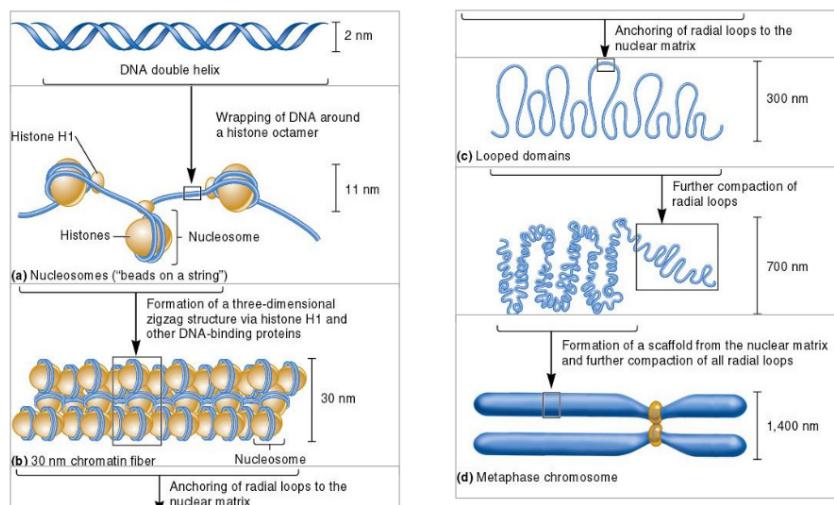
10.1.2.3 Secundaire structuur RNA



Figuur 84: Secundaire structuur RNA

Bij RNA zien we vaak slechts één streng. We kennen verschillende types van RNA, bijvoorbeeld tRNA (figuur 84). We zien hier net zoals bij DNA ook de anti-parallele oriëntatie op plaatsen waar waterstofbruggen gevormd worden. Deze basen-paring is meestal intramoleculair bij RNA.

10.1.2.4 Tertiaire/quaternaire structuur DNA



Figuur 85: Tertiaire structuur DNA

Een volledig streng DNA kan tot twee meter lang zijn. Op zichzelf past het dus niet in een cel of celkern. Door de streng sterk op te vouwen, kunnen we de omvang van het DNA sterk verminderen. Het volledige proces is visueel weergegeven op figuur 85. De individuele stappen zijn:

- Het DNA wordt twee maal rond histonen gewonden
- De histonen worden op een ordentelijke manier gestapeld
- De keten gestapelde histonen wordt opgevouwen tot ‘looped domains’
- Deze looped domains worden verder samen gedrukt tot chromosomen

Het chromosoom is de finale vorm van de vouwing. Deze structuur is groot genoeg om met een microscoop waar te nemen.

10.1.3 Functie van DNA en RNA

10.1.3.1 Functie van DNA

- Genetische informatie dragen
- Genetische informatie overdragen naar toekomstige generaties
- Wijzigingen in DNA maken evolutie mogelijk

10.1.3.2 Functie van RNA

- Overschrijven van genetische informatie in celkern en transport naar cytoplasma voor synthese van proteïnes door ribosomen (messenger RNA of mRNA)
- Transport van AAs naar ribosomen (Transfer RNA of tRNA)
- Structurele functie (vb. ribosomaal RNA of rRNA)
- Katalytische functie (ribozymes)
- Regulatorische functie (vb. siRNA, microRNA)
- Drager van genetische informatie (RNA viruses)

10.2 Genexpressie

10.2.1 Centraal dogma

In deze cursus zullen we ons beperken tot de basis van het centraal dogma. Het stelt dat informatie overgedragen kan worden van DNA naar een eiwit, maar niet andersom. Bij deze overdracht gaat informatie van DNA via RNA naar een eiwit (zie figuur 86). Het is ook mogelijk dat informatie van DNA naar DNA wordt overgegeven, dit heet replicatie.

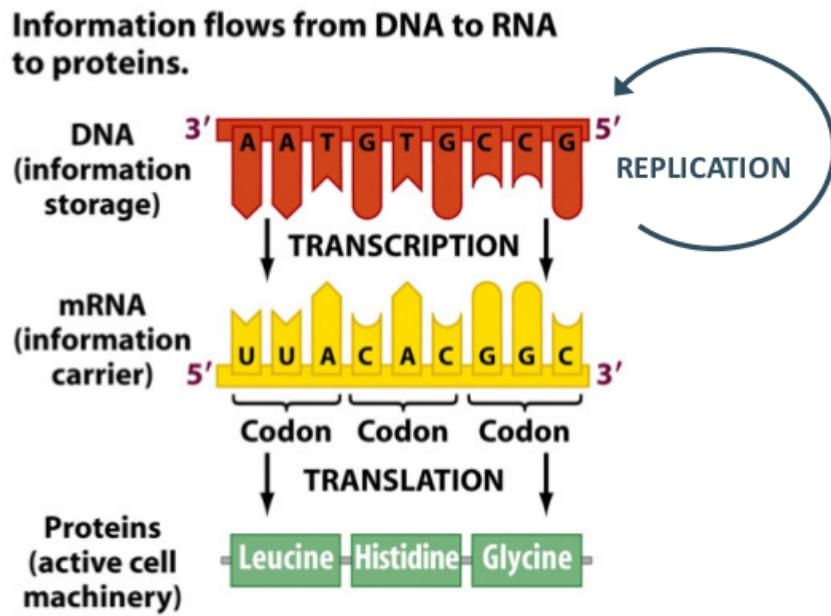


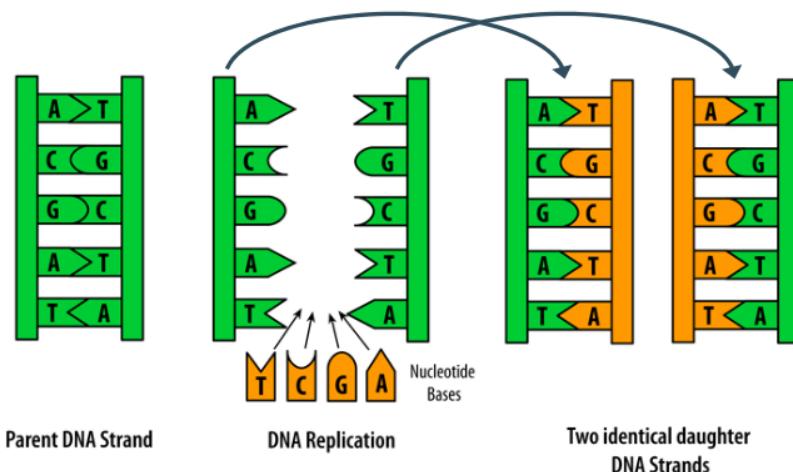
Figure 15-10a Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Figuur 86: Centraal dogma

10.2.2 DNA replicatie

DNA replicatie komt vooral voor tijdens de celdeeling om genetische informatie te kopiëren. Het proces loopt op een semi-conservatieve basis, dit wil zeggen dat de aanmaak van een nieuwe DNA keten gebeurd op basis van complementariteit met de helft van de originele keten zoals geïllustreerd is op figuur 87.

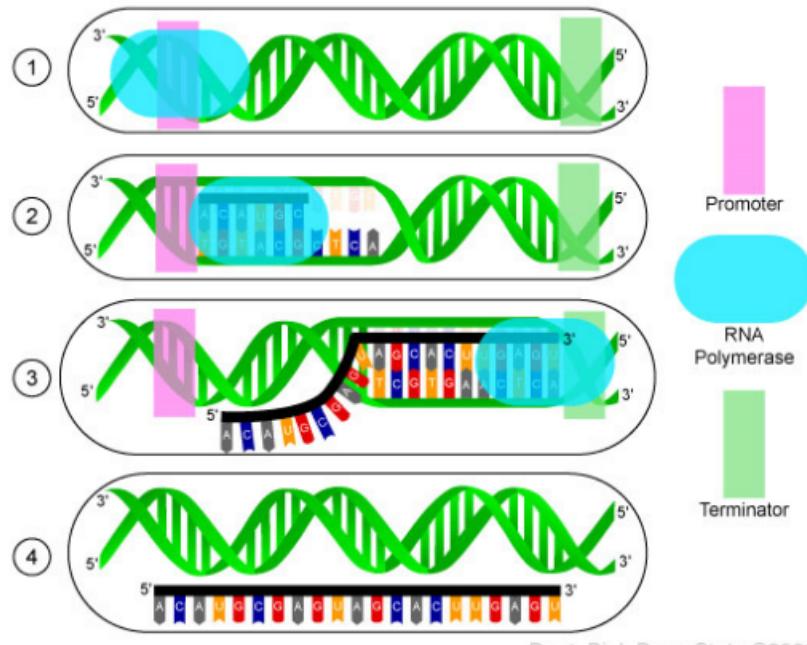


Figuur 87: DNA replicatie

Concreet wordt een DNA streng eerst in zijn twee originele strengen opgesplitst (denaturatie). Zo zijn er twee ketens om als template/mal te gebruiken voor de nieuwe strengen. Na de splitsing zal het enzym DNA Polymerase nieuwe nucleotiden toevoegen zodat er opnieuw een dubbele helix gevormd kan worden uit één keten. Hierbij merken we nog op dat DNA Polymerase enkel zorgt voor de verlenging van een keten. We hebben dus ook een startpositie (primer) nodig om het proces op een correcte manier te beginnen.

10.2.3 Transcriptie en mRNA processing

Transcriptie is het proces waarbij genetische informatie van DNA wordt omgezet naar mRNA. Dit bevat dan alle informatie die noodzakelijk is voor de volgorde van de aminozuren bij de proteïnesynthese. Om transcriptie te verwezenlijken, wordt een lokaal deel van het DNA ontwonden zodat het enzym RNA Polymerase een kopie kan maken door een complementair streng RNA op te bouwen. Zoals op figuur 88 te zien is, zijn er ook promotors en terminators aanwezig. Deze geven informatie over de regio en lengte die een transcriptie moet ondergaan.



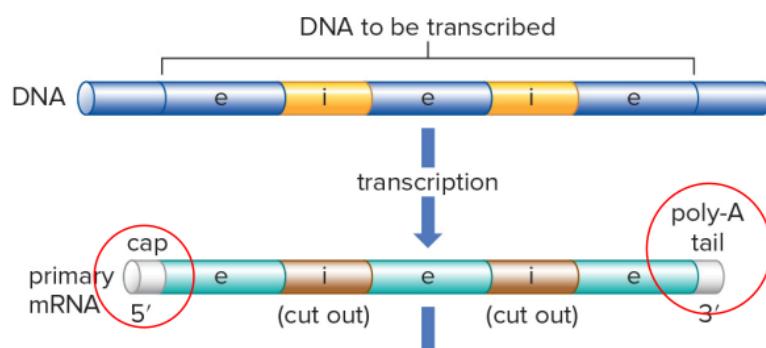
Dept. Biol. Penn State ©2002

Figuur 88: Transcriptie

10.2.3.1 mRNA processing

mRNA processing is een extra stap die doorgaat in de nucleus van eukaryoten voor het transport naar het cytoplasma. We zien drie belangrijke stappen:

1. Aanhechting gemodificeerd G aan 5' uiteinde ("Capping")
2. Aanhechting Poly-A staart aan 3' uiteinde
3. Uitsplitsen van niet-coderende regio's (intronen) uit prematuur mRNA en koppelen van coderende regio's (exonen) ("Splicing")



Figuur 89: mRNA processing

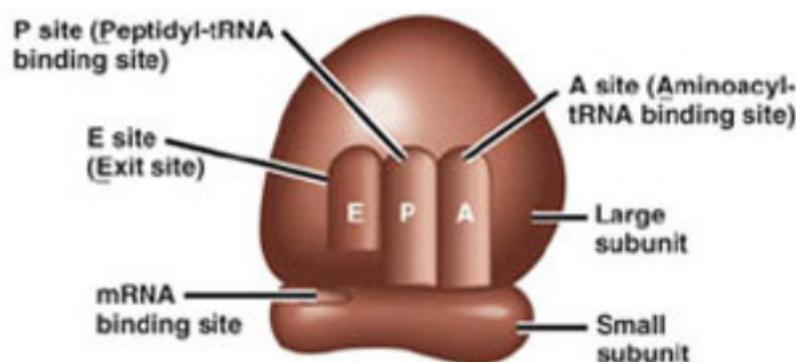
10.2.4 Translatie

Translatie is het proces waarbij de informatie van het mRNA wordt omgezet naar een aminozuuropeenvolging in het ribosoom. Op het mRNA staan namelijk groepen van drie nucleotiden (codon), die elks staan voor ander aminozuur of start/stop groep. Specifieke transfer RNA moleculen (tRNA) hebben een anticodon dat kan binden met het juiste codon om het correcte aminozuur af te leveren. Figuur 90 toont de correlatie tussen het codon en het vereiste aminozuur.

Second base						
		U	C	A	G	
5'	U	UUU Phenyl-alanine UUC UCC UUA UUG	UCU Serine UCC UCA UCG	UAU Tyrosine UAC	UGU Cysteine UGC	
	C	CUU Leucine CUC CCC CUA CUG	CCU Proline CCC CCA CCG	CAU Histidine CAC CAA CAG	CGU Arginine CGC CGA CGG	
	A	AUU Isoleucine AUC AAC AUA AUG Methionine start codon	ACU Threonine ACC ACA ACG	AAU Asparagine AAC AAA AAG Lysine	AGU Serine AGC AGA AGG Arginine	
	G	GUU Valine GUC GUA GUG	GCU Alanine GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid GAC GAA Glutamic acid GAG	GGU Glycine GGC GGA GGG	
						3'
						Third base
						U C A G

Figuur 90: Codon tabel

De eigenlijke translatie gebeurt in het ribosoom. Deze bestaat namelijk uit twee subeenheden opgebouwd uit diverse proteïnen en rRNA moleculen (groot en klein zoals in figuur 91). Het biedt een bindingsplaats voor het mRNA en twee holtes voor de binding van het aminozuur tRNA (P site (tRNA met groeiende peptide keten) en A site (voor tRNA dat nieuw AZ aanbrengt)). Tot slot is er ook nog een E site, hier verlaat de gebruikte tRNA moleculen het ribosoom.

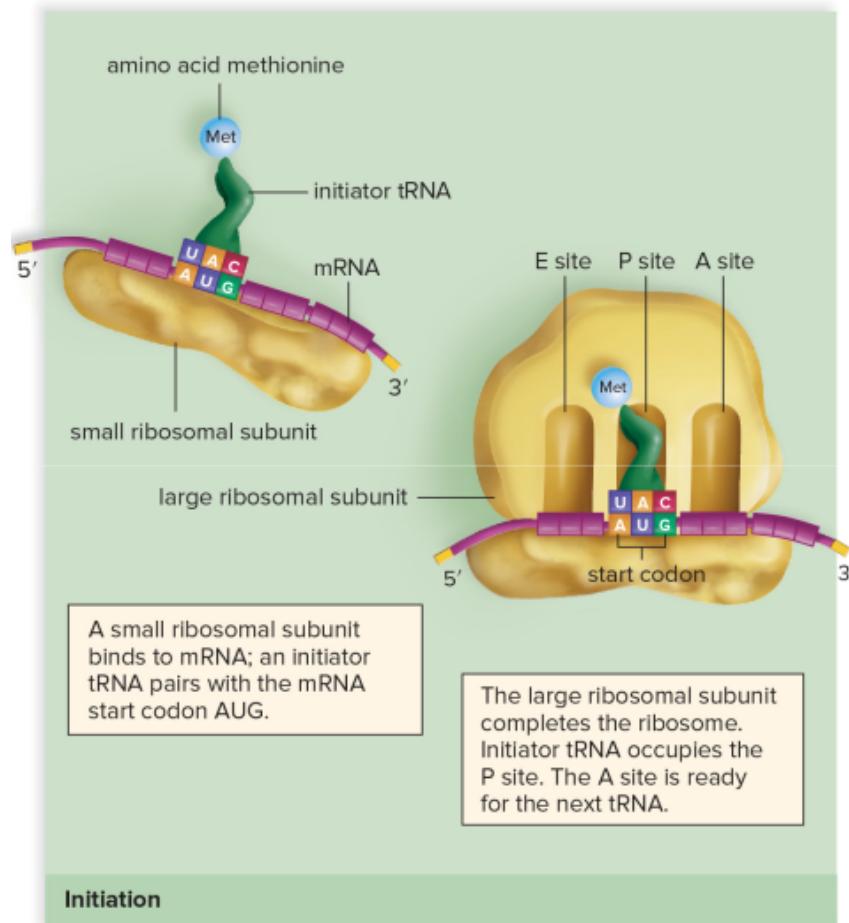


Figuur 91: Werking ribosoom

Translatie bestaat uit drie stappen: initiatie, elongatie en terminatie.

10.2.4.1 Initiatie

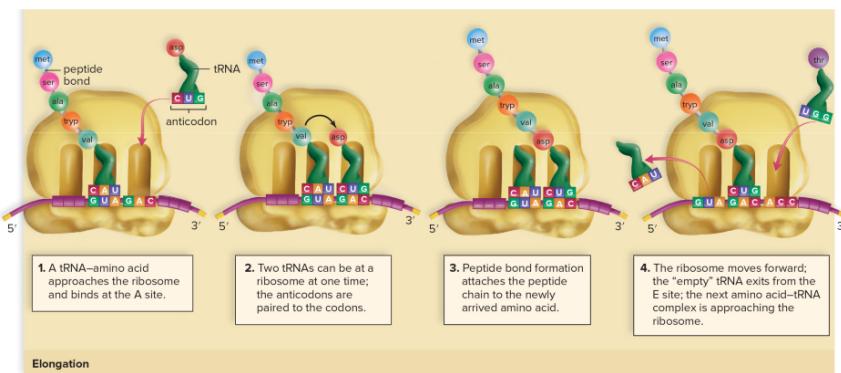
- Associatie van kleine ribosoom subeenheid met mRNA en “initiator tRNA” met eerste AZ van de peptideketen in de P-site
- Associatie met grote subeenheid



Figuur 92: Initiatie translatie

10.2.4.2 Elongatie

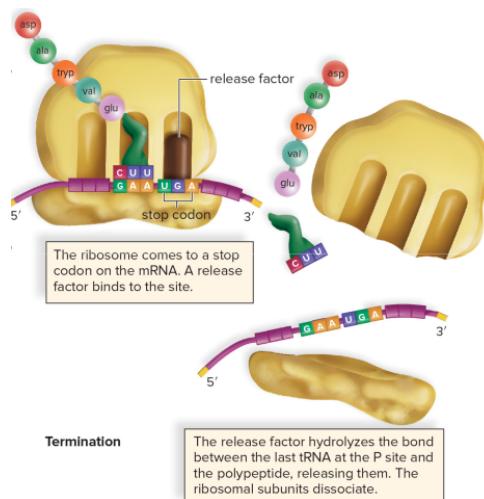
- Nieuw AZ-tRNA bindt in A site op basis van complementariteit tussen codon (mRNA) en anticodon (tRNA)
- Vorming peptidebinding en translocatie ribosoom naar volgend codon
- “Leeg tRNA” verlaat ribosoomcomplex via E-site



Figuur 93: Elongatie translatie

10.2.4.3 Terminatie

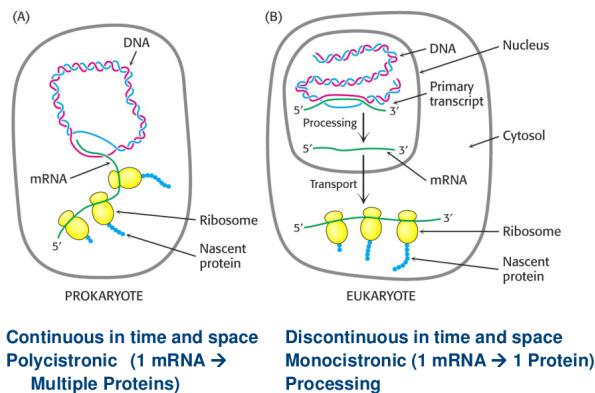
- Stopcodon in A site
- Geen overeenkomstig tRNA voor stopcodons maar wel binding van “Release Factoren”
- Release Factoren binden A site en catalyseren hydrolyse van binding tussen peptide en laatste tRNA
- Ribosoomsubeenheden dissociëren



Figuur 94: Terminatie translatie

10.2.5 Verschillen tussen Prokaryote en Eukaryote cellen

Er zijn enkele nuances als men spreekt over genexpressie bij prokaryote en eukaryote cellen. Zoals in figuur 95 te zien is, komen de essentiële stappen grosso modo overeen in beide celtypes. Het verschil zit in de locatie waar de stappen uitgevoerd worden. Bij de eukaryote cellen zien we duidelijk dat de transcriptie en processing stappen in de celkern gebeuren, de translatie stap vindt pas plaats nadat het mRNA streng buiten de celkern getransporteerd is. Omdat er bij een prokaryote cel geen celkern aanwezig is, gebeuren alle stappen in het cytoplasma.



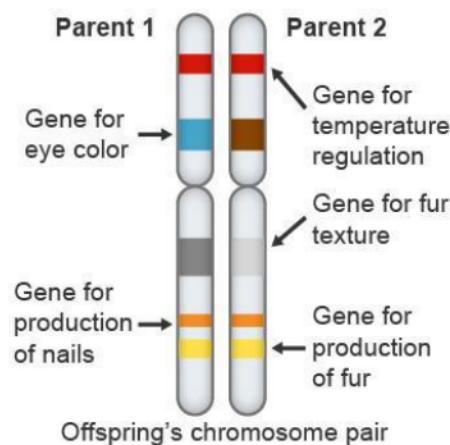
Figuur 95: Verschil prokaryote en eukaryote cellen.

10.3 Regulatie van genexpressie

10.3.1 Enkele definities

10.3.1.1 Gen

Een gen is een eenheid van genetische informatie. Concreet is een gen een DNA regio die zorgt voor de transcriptie in een functionele RNA streng. Alle informatie die nodig is voor de individuele eigenschappen van een persoon staat op een gen gecodeerd. Dit gaat van simpele eigenschappen zoals de bloedgroep of het kleur van de ogen tot informatie die noodzakelijk is voor celdeling. Omdat een gen gemaakt is uit DNA bevindt het zich uiteraard ook op een chromosoom zoals te zien is in figuur 96.



Figuur 96: Chromosomen paar

10.3.1.2 Allel

Een allele is één van de (moleculaire) varianten van een gen. We hebben typisch twee gelijkaardige allelen, één van elke ouder. We onderscheiden drie types:

- Homozygoot: zelfde allele aanwezig op beide chromosomen
- Heterozygoot: beide chromosomen bevatten verschillende allelen
- Dominant allele: allele dat tot uiting komt en de overhand heeft op het recessief allele

Om de definitie wat minder abstract te maken kunnen we kijken naar een kort voorbeeld: Het gen dat codeert voor de bloedgroep komt in drie varianten voor (A, B en O). Om te bepalen welke van de drie tot expressie moet komen, kijken we naar de twee allelen aanwezig op het chromosoom (zie op figuur 96 het linker en rechter deel van een chromosoom). Als er een A en B allele gecodeerd staan, zal de bloedgroep AB tot expressie komen. Indien er twee maal O aanwezig is zal de bloedgroep O tot expressie komen.

10.3.1.3 Genexpressie

Genexpressie is het proces waarbij de informatie in een gen effectief aanleiding geeft tot de vorming van een functioneel product.

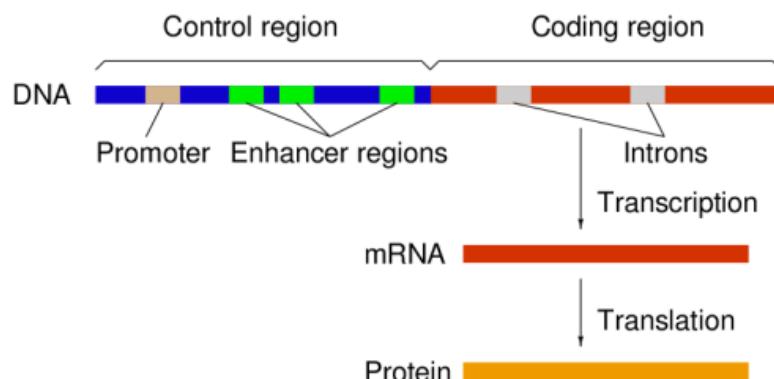
10.3.2 Belangrijke factoren in regulatie genexpressie

Op het DNA zijn er twee belangrijke regio's om transcriptie te reguleren (zie ook figuur 97):

Promotor: regulatorische regio in het DNA die bepaalt hoe goed RNA Polymerase aanhecht, waar transcriptie start en hoeveel transcriptie er zal plaatsvinden

Terminator: regulatorische regio in het DNA die bepaalt waar het RNA Polymerase stopt met transcriptie

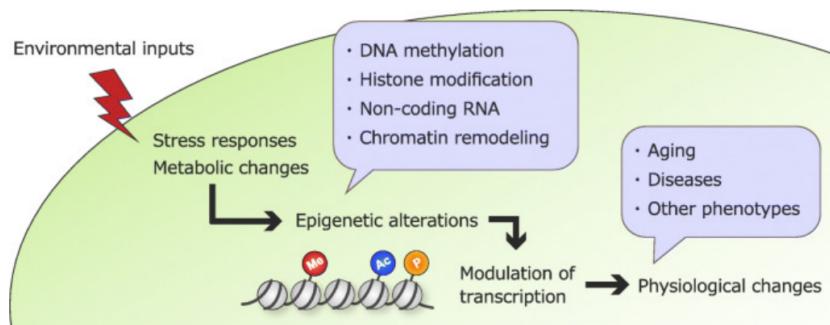
Verder zijn er ook regulatorische proteïnes nodig bij de genexpressie. Het zijn proteïnes die transcriptie van een bepaald gen induceren (activator proteïne) of inhiberen (repressor proteïne).



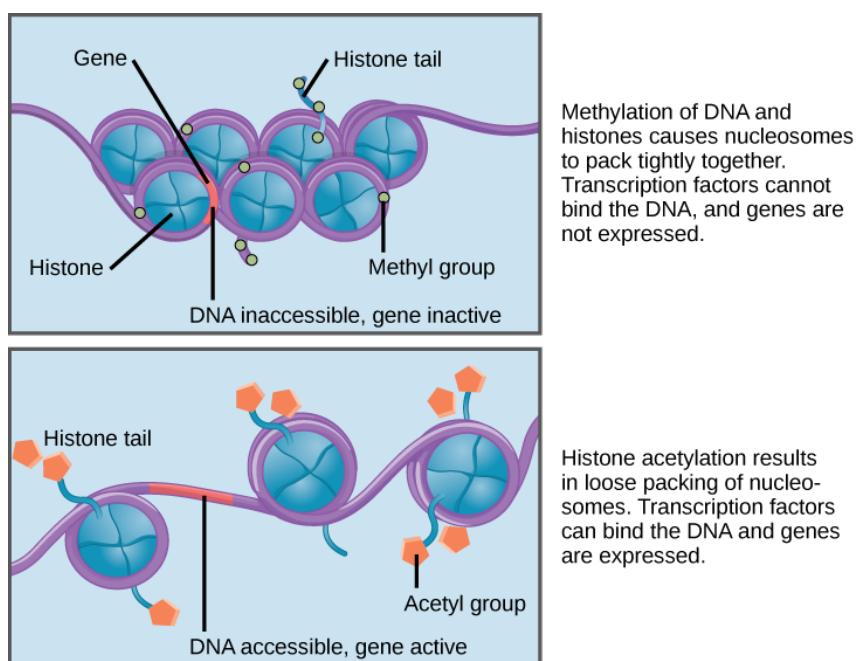
Figuur 97: Belangrijke regio's in het DNA

10.3.2.1 Epigenetische regulatie

Epigenetische regulatie verwijst naar de veranderingen in genexpressie veroorzaakt door een verandering in omgevingsfactoren. Het zijn dus veranderingen die niet te wijten zijn aan het wijzigen van de DNA sequentie. ‘DNA methylatie’ en ‘histon modificatie’ spelen hierin een belangrijke rol, zoals te zien is in figuur 98. Deze concepten worden verder verduidelijkt in figuur 99.



Figuur 98: Epigenetische regulatie

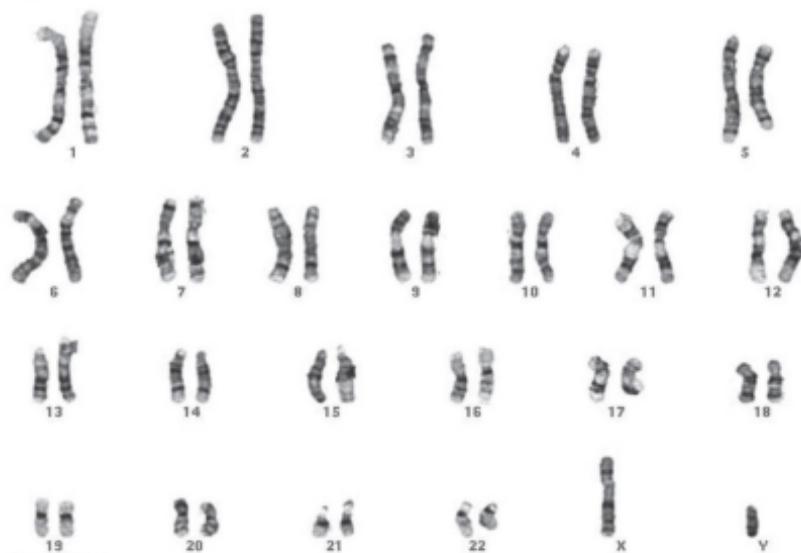


Figuur 99: DNA methylatie en histon modificatie

10.4 Voorbeelden en Toepassingen

10.4.1 Menselijk genoom

Het menselijk genoom bestaat uit twee kopijen van 22 verschillende chromosomen en twee geslachtschromosomen (XX of XY). Dit geeft een totaal van 46 chromosomen oftewel $6 \cdot 10^9$ nucleotiden met daarin ongeveer 20 000 proteïne-coderende genen. We hebben elk gen in tweevoud: één exemplaar van elke ouder.



Figuur 100: Menselijk genoom

10.4.2 Bepaling van microbiële contaminatie met ATP metingen

- Aanwezigheid van ATP duidt op aanwezigheid van micro-organismen
- Meting mbv enzym luciferase en lichtgevend substraat (luciferin)
- Controle voor CIP (“Cleaning in Place”)

10.4.3 Gebruik van DNA voor data-opslag

- Voordelen
 - DNA is zeer stabiel
 - Lage energiekost
 - Hoge densiteit van informatie
- Beperkingen
 - Momenteel enkel voor data-opslag op lange termijn

Door high-throughput sequencing kan men het snel uitlezen van DNA mogelijk maken. In combinatie met chemische DNA synthese voor het schrijven van informatie, kan DNA de toekomst van data-opslag worden.

11 Recombinant DNA and genomics

11.1 Recombinant DNA technologie

11.1.1 Inleiding

Recombinante-DNA-technologie is het samenvoegen van DNA-moleculen van twee verschillende soorten. De gerecombineerde DNA-molecule wordt in een gastheerorganisme ingebracht om nieuwe genetische combinaties te produceren die van waarde zijn voor de wetenschap, de geneeskunde, de landbouw en de industrie. Recombinante DNA-technologie is voornamelijk gebaseerd op twee andere technologieën: klonen en DNA-sequencing.

Enkele definities die vaak terug keren:

Recombinant DNA: Bevat DNA van verschillende bronnen

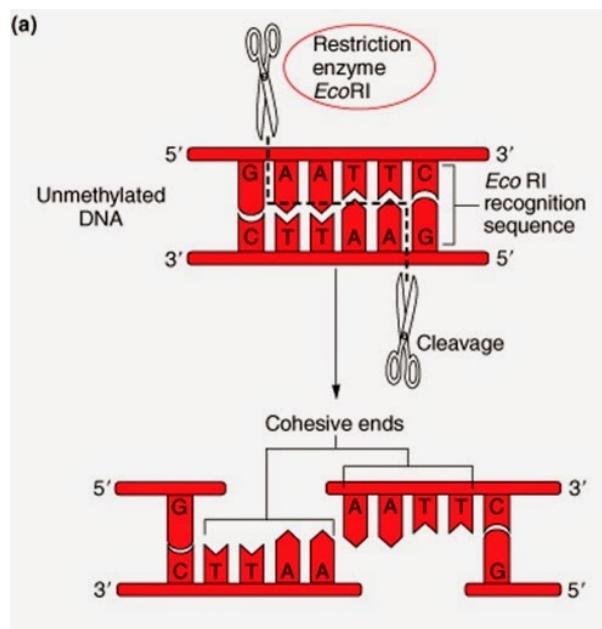
Genetisch gemodificeerd organisme (GGO): Organisme met gemodificeerd genoom, meestal door recombinante DNA-technologie (bv. mutatie of additie van een specifiek gen)

Transgeen organisme: GGO dat één of meer genen van een ander organisme heeft verkregen

11.1.2 Belangrijke tools in recombinante DNA-technologie

11.1.2.1 Restrictie-enzymen (moleculaire schaar)

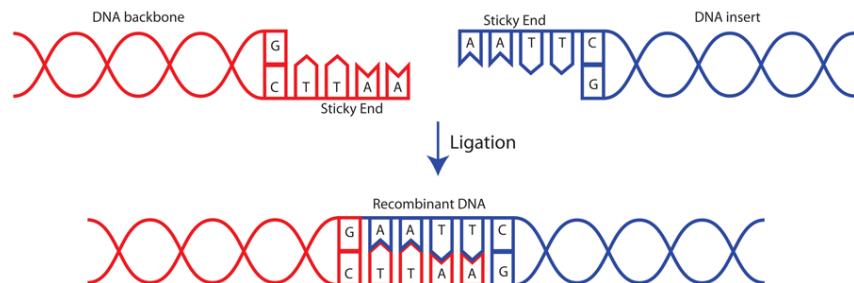
Restrictie-enzymen zijn enzymen die een specifieke DNA-sequentie herkennen om vervolgens het DNA op die plaatsen te 'knippen'. Het enzym breekt hierbij de fosfodiësterbindingen tussen twee aangrenzende nucleotiden. Een voorbeeld van dit soort enzymen is EcoRI: het herkent de sequentie 5' – GAATTTC – 3' en knipt hierbij tussen de G en A. Deze knip zal leiden tot een 'sticky' of 'cohesive' uiteindes zoals in figuur 101.



Figuur 101: Werking EcoRI

11.1.2.2 DNA ligase (moleculaire ‘lijm’)

DNA ligase is een enzym die de fosfodiësterbinding tussen twee opeenvolgende nucleotiden herstelt. Het enzym kan zijn werk efficiënter doen als er ‘sticky ends’ aanwezig zijn op beide DNA strengen. De werking is te zien op figuur 102.

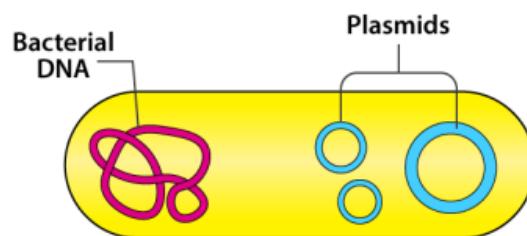


Figuur 102: Werking DNA ligase

11.1.3 DNA-vectoren

Een DNA-vector is een DNA-molecule dat wordt gebruikt als vehikel om genetisch materiaal naar een cel te transporteren, waar het dan repliceert en/of specifieke plasmide genen tot expressie brengt.

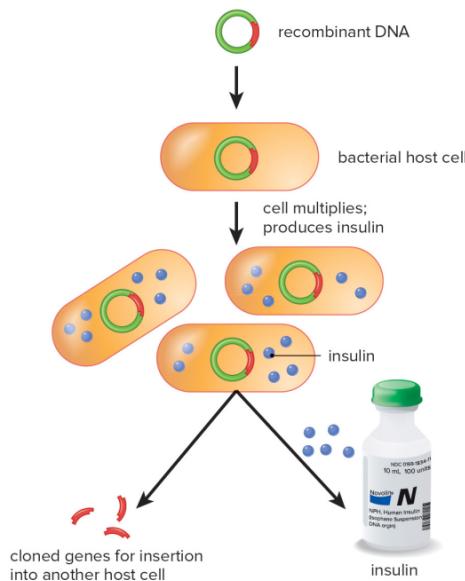
Plasmiden zijn kleine cirkeelvormige stukjes DNA die voornamelijk in bacteriën worden aangetroffen (zie figuur 103). Het DNA is extrachromosomaal (niet in een chromosoom verwerkt) van natuur en kan dus onafhankelijk van het chromosoom repliceren.



Figuur 103: Plasmiden

11.1.4 Moleculair klonen

Bij moleculair klonen modifieren we plasmiden om ze een nieuwe ‘instructieset’ te geven door gebruik te maken van restrictie-enzymen en DNA ligase. Door dit op een correcte manier in te planten bij een bacterie, kunnen we ervoor zorgen dat zijn klonen ook het gemodificeerde plasmide bevat. Zo kunnen we er bijvoorbeeld voor zorgen dat het plasmide de instructies bevat om insuline aan te maken.



Figuur 104: Moleculair Klonen

11.2 DNA analyse

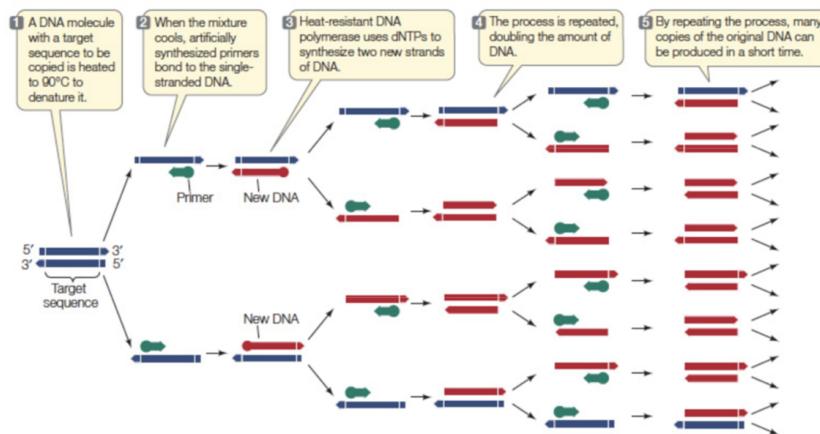
11.2.1 Scheiding van DNA-fragmenten met gelelektroforese

Gelelektroforese is een techniek om molecuLEN met een verschillende grote te scheiden. Specifiek voor DNA zal het staaL geladen worden in een (agarose) gel om vervolgens in een elektrisch veld geplaatst te worden. Het DNA staaL zal dan migreren naar de positieve pool. Door de toevoeging van een fluoriserende stof kunnen we de beweging van het staaL visualiseren. Aan de hand van een referentie kan de grote van het DNA staaL bepaald worden.

11.2.2 PCR

PCR oftewel ‘Polymerase Chain Reaction’ is een snelle, goedkope en eenvoudige methode voor exponentiële vermeerdering van identieke kopieën van een specifiek DNA-fragment die ontwikkeld werd in de jaren 80. Deze techniek heeft een hoge gevoeligheid, waardoor er slechts weinig DNA nodig is om het proces te starten.

Het proces werkt door ongeveer 25 tot 35 cycli te vervolledigen in een thermocycler. Elk van deze cycli bestaat uit drie verschillende stappen: denaturatie, annealing en elongatie. Bij de denaturatie zal de temperatuur opgedreven worden tot ongeveer 95°C , waardoor de secundaire structuur van DNA zal verbreken waardoor we de enkelstrengige ketens overhouden. Hierna zal de temperatuur teruggebracht worden tot ongeveer 55 à 65°C om de annealing stap in te zetten. Het doel is om de aanhechting van de primers (staretermoleculen) aan het doelwit DNA (op basis van complementariteit) te bevorderen. De laatste stap in de cyclus trekt de temperatuur omhoog tot 70 à 75°C . Hierbij zal de polymerisatie plaats vinden. De schematische weergave van dit proces is te zien op figuur 105.



Figuur 105: PCR

Om te weten of het PCR proces tot een eind is gekomen kunnen we twee methoden gebruiken:

Eindpunctdetectie: het PCR-product wordt geanalyseerd met behulp van agarose gelelektroforese op aan- of afwezigheid van een PCR-fragment en dus van doelwit DNA in staal

Real-time detectie: kwantitatieve PCR (qPCR) op basis van fluorescerend signaal dat toeneemt met toenemende hoeveelheden vermenigvuldigd DNA

11.3 Toepassingen van PCR

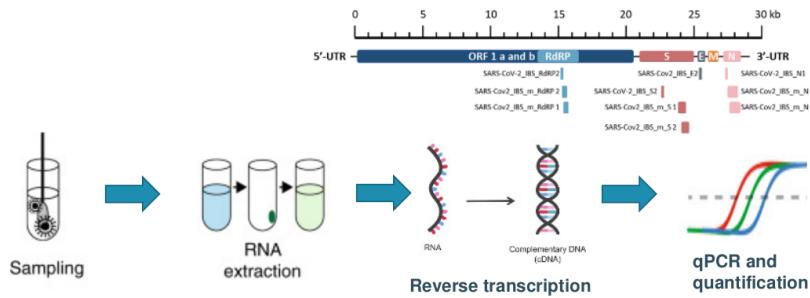
11.3.1 Detectie en kwantificering van micro-organismen

Gebruik maken van PCR bij micro-organismen brengt enkele voordelen met zich mee:

- DNA-gebaseerde detectie is gevoeliger en sneller dan traditionele kweekmethoden
- Alleen doelwit-DNA van specifieke bacteriën wordt versterkt en gedetecteerd (geen doelwit DNA - geen PCR-product)
- Voorbeeld: detectie van E. coli O104 tijdens EHEC-crisis in 2011: amplificatie van DNA uniek voor deze stam

Een recent voorbeeld waarbij PCR wordt gebruikt, is om SARS-CoV-2 te detecteren. Het proces verloopt in vier stappen (zie ook figuur 106):

1. Selectie specifieke doelgen- en primerbindingsplaatsen
2. Bemonstering en RNA-extractie
3. Virale RNA omgezet in cDNA (reverse transcriptase)
4. qPCR voor detectie en kwantificering



Figuur 106: SARS-CoV-2 detectie

11.3.2 DNA Fingerprinting

DNA fingerprinting oftewel 'genetic fingerprinting' is de term waarmee we verwijzen naar het feit dat het DNA van ieder levend organisme uniek is. We kunnen met andere woorden onderscheid maken tussen verschillende individuen, gebaseerd op discriminerende DNA-regio's (specifieke nucleotidesequenties). Amplificatie van deze specifieke regio('s) gebeurd met PCR: variatie tussen organismen merken we op op basis van aan/afwezigheid of lengte van het PCR-fragment met behulp van agarose gelelektroforese. Specifiek wordt er gezocht naar 'Short Tandem Repeats' STRs: herhalingen van korte motieven waarvan het aantal herhalingen verschilt van persoon tot persoon. DNA fingerprinting wordt ondermeer gebruikt bij forensisch onderzoek en het bepalen van biologische ouders.

11.3.3 Detectie voedselfraude

Om allerhande problemen zoals verdunning, etiketlabel-fraude... tegen te gaan, kan men gebruik maken van PCR om de specifieke samenstelling van voedsel te bepalen. Hierbij wordt DNA-fingerprinting toegepast om bepaalde targets te vinden. Deze technieken maken het ook mogelijk om de concentratie te bepalen, zodat de waarden op het etiket bevestigd kunnen worden.

11.4 Sequencing en genomics

DNA sequencing wil zeggen dat we de volgorde van nucleotiden in een genoom gaan bepalen. Deze inzichten zijn belangrijk omdat ze informatie bevatten over codering, aminozuur sequenties en regulatie van genexpressie. Hiermee kunnen we traceren welke nucleotiden en genen verantwoordelijk zijn voor bijvoorbeeld genetische aandoeningen.

11.4.1 Methodes voor DNA sequenering

11.4.1.1 Eerste generatie sequeneringstechnologieën (Sanger-sequencing)

- Leeslengte ("read length"): ~1000 baseparen (bp)
- Aantal fragmenten gesequeneerd per run ("number of reads"): ~100

11.4.1.2 Tweede generatie sequeneringstechnologieën (Illumina-sequencing)

- Read length: ~250 bp
- Zeer hoge doorvoer: ~ 10^9 sequenties per uitvoering

11.4.1.3 Derde generatie sequeneringstechnologieën (Single molecule sequencing)

- Ultralange read length (+ 10 kbp)
- Doorvoer: ~500 000 (PacBio)
- Lagere nauwkeurigheid

11.4.2 Genomics

Genomics draait om het bepalen van de nucleotide sequentie in het hele genoom van een organisme om de structuur, functie en evolutie te bestuderen. Hierbij speelt genoomassemblage (reconstructie van oorspronkelijke genoom met miljoenen korte DNA-sequenties) ook een belangrijke rol.

11.4.2.1 Genome annotation

- Annotatie is een proces dat een functie toewijst aan specifieke DNA regio's. Coderende en regulatorische sequenties worden geïdentificeerd, evenals mobiele genetische elementen of repetitieve sequenties.
- Screening op eiwitcoderende genen obv specifieke kenmerken (vb. promoter regio of een open leesraam ("Open reading frame"; ORF)
- ORF begint met het startcodon (ATG) en eindigt met een stopcodon (TAA, TAG of TGA)
- Databases doorzoeken om gelijkenis met goed gekarakteriseerde genen te vinden ⇒ BLAST

11.4.2.2 Comparative genomics

Comparative genomics kijkt naar de verschillen tussen individuen op genoomniveau. Het relateert deze verschillen op genetisch niveau aan verandering in de fenotypes. Hierbij kijkt men vaak naar 'single nucleotide polymorphisms' of SNPs. Het zijn wijzigingen van één nucleotide op een bepaalde locatie. Hierbij wordt gekeken naar coderende en niet-coderende regio's. Als men hetzelfde aminozuur aantreft, spreekt men van een 'synonymous substitutie', bij een verandering wordt dit een 'nonsynonymous substitution'. **Wat is een indel?**

- Insertie of deletie (verwijdering)
- Wild type: CTAGTATCG
- mutant: CTATGTA _ CG

Copy number variation (CNV)

- Aantal kopijen van genen kan variëren tussen individuen
- Soms geassocieerd met ziekten (bijv. autismespectrumstoornissen en schizofrenie)

11.4.3 Metagenomics

Metagenomics gaat over het sequeneren van al het DNA in een monster om microbiële gemeenschappen te kunnen karakteriseren: welke microben zijn aanwezig in een monster, relatieve abundantie, welke functionele genen zijn aanwezig... Dit soort studies zijn belangrijk om bijvoorbeeld het belang van de microbiële gemeenschap in het darmstelsel van de mens te begrijpen.

11.5 Introductie tot bio-informatica

11.5.1 Omics technologieën

Er bestaan vier soorten omics technologieën binnen de bio-informatica:

1. (meta)Genomics:

- Studie van het genoom van een organisme (gemeenschap)
- Bepaling van de genoomsequentie en analyse van SNP's, Indels,...
- Sequenceringstechnieken met hoge doorvoer (2GS en 3GS)

2. (meta)Transcriptomics:

- Studie van de genexpressie in een organisme (gemeenschap)
- Studie genexpressie (regulatie); Nuttige informatie voor annotatie van de genen (het toewijzen van functies aan genen/sequenties)
- RNAseq

3. Proteomics:

- Studie van de eiwitten geproduceerd in een organisme
- Bepaling van de structuur en functie van proteïnen

4. Metabolomics:

- Studie van het metaboloom, d.w.z. alle metabolieten gesynthetiseerd in een biologisch systeem

Deze technologieën leiden tot een exponentieel groeiende doorvoer van data. Men heeft behoefte aan diepgaande analyses van deze data die ervoor kunnen zorgen dat er patronen zichtbaar worden. Hierbij komen enkele zaken kijken zoals de collectie en opslag van de data, verder ook het archiveren en delen van resultaten zodat andere onderzoekers zonder problemen kunnen zoeken door oude experimentele data om potentieel te hergebruiken.

Bio-informatica is dus een interdisciplinair vakgebied dat methoden en softwaretools ontwikkelt en implementeert om biologische data beter te begrijpen. Deze softwaretools zijn niet gelimiteerd tot enkel data-analyse, zo worden er ook vaak modellen opgesteld, simulaties gemaakt en algoritmes geschreven om biologische systemen beter te beschrijven.

11.5.2 Gebruik van bio-informatica in toegepast onderzoek

11.5.2.1 Case 1: Impact van waterbehandeling

In industriële plantenkwekerijen is het verplicht om water te hergebruiken. Omdat dit water in aanraking is gekomen met alle planten en de bodem waarin ze groeien, is er een kans dat er ziekteverwekkende microbiële gemeenschappen aanwezig zijn. Om dit tegen te gaan, wordt het water gefilterd en ontsmet. Hiervoor bestaan twee technieken: peroxide behandeling en hypochloriet behandeling. Het doel van deze casestudy is om te kijken welke behandeling het doeltreffendst is. Men doet dit door stalen te nemen van het water voor én na de behandeling. Vervolgens zal men een illumina sequencing proces uitvoeren om een bio-informatica analyse te kunnen maken van miljoenen DNA sequenties.

11.5.2.2 Case 2: Studie om wortelziekte aan te pakken

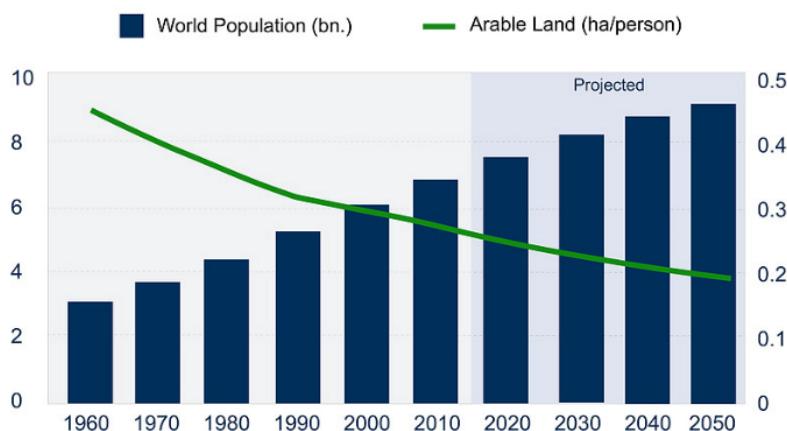
Door de 'rhizogenic acrobacteria' kunnen planten de gekke wortelziekte krijgen. Concreet zullen de planten hierdoor een extreme hoeveelheid wortels aanmaken waardoor het medium waarin ze gekweekt worden minder doordringbaar wordt. Dit leidt tot grote verliezen in opbrengst van tomaat, paprika, ... De bacteriën die deze ziekte veroorzaakten, werden geïdentificeerd waardoor men het werkingsmechanisme kon ontrafelen met comparative genomics. Met de uitslagen van deze analyse, kan men een oplossing vinden om de ziekte te bestrijden.

12 Cases in agricultural biotechnology

12.1 Inleiding

12.1.1 Opwarming van de aarde en klimaat verandering

Door veranderingen in het klimaat zien we een impact op onze capaciteit om voedsel te verzekeren. Dit heeft te maken met veranderingen op het vlak van natuur en ecosysteem, maar ook met veranderingen in de fysieke omgeving. Figuur 107 toont aan hoe er in de komende jaren minder bewerkbaar land beschikbaar zal zijn om een toenemende populatie te voeden. We moeten dus zorgen dat we efficiënter kunnen gaan met de beschikbare middelen. De ‘European Green Deal’ streeft ernaar om dit mogelijk te maken, door in te zetten op biotechnologie en de daaruit ontstane technologieën zoals biobrandstof, bio-gebaseerde (bouw)materialen en groene biotechnologie. Verder moeten we ook overschakelen naar een circulaire economie waarbij het hergebruiken van afval een belangrijke rol speelt.



Figuur 107: Bewerkbaar land (ha/persoon) vs. populatie (in miljarden)

12.2 Wat is biotechnologie precies?

Volgens het VN-Verdrag inzake biologische diversiteit is de definitie van biotechnologie: “Elke technologische toepassing die biologische systemen, levende organismen of derivaten daarvan gebruikt om producten of processen voor specifiek gebruik te maken of te wijzigen”. We kunnen verder onderscheiden in twee disciplines: traditionele- en moderne-biotechnologie.

12.2.1 Traditionele biotechnologie

Bij traditionele biotechnologie zullen we ons vooral focussen op het kweken, fokken en verdelen van organismen. Deze organismen kunnen we dan gebruiken bij een specifiek proces of productie van een specifiek product. Zo gebruiken we organismen al bij de veredeling van gewassen, fermentatieprocessen en de productie van penicilline. Deze tak van de biotechnologie bestaat al honderden jaren, zo is het brouwen van bier een proces dat al eeuwen bestaat.

12.2.2 Moderne biotechnologie

Moderne biotechnologie is een relatief nieuwe tak van de biotechnologie. We gaan hierbij vooral aanpassingen maken aan het DNA van organismen om zo eigenschappen aan te passen, of zelfs nieuwe eigenschappen te introduceren.

Verder kennen we nog twee takken van de biotechnologie, deze vloeien wel voort uit de traditionele en moderne-biotechnologie:

Landbouwbiotechnologie: Een reeks instrumenten, waaronder traditionele veredelingstechnieken, die levende organismen of delen van organismen veranderen om producten te maken of te wijzigen (planten/dieren/micro-organismen te verbeteren/wijzigen) voor specifiek landbouwgebruik.

Groene Biotechnologie: Groene biotechnologie wordt gedefinieerd als de toepassing van planten en andere fotosynthetische organismen met als doel landbouwgewassen OF industriële processen te verbeteren om industrieel nuttige producten te produceren in diverse sectoren zoals detergentia, papier, biobrandstoffen, textiel, farmaceutische stoffen enz.

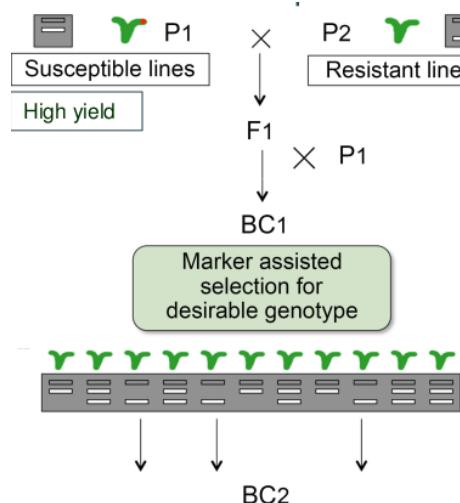
12.3 Biotechnologie & duurzame voedselproductie

12.3.1 Traditionele veredeling van gewassen of dieren

Als deel van de traditionele biotechnologie zijn we al eeuwen actief gewassen en dieren aan het veredelen. Zo is maïs al reeds 10 000 jaar geleden gedomesticeerd door het selectief veredelen van een gras genaamd teosine. Ook Belgisch witblauw is een rund variant waarbij een natuurlijke mutatie in het myostatine gen voor een overmatige spierproductie zorgt. Belangrijk om hierbij te vermelden is dat al deze mutaties natuurlijk zijn omdat ze het resultaat zijn van natuurlijke evolutie. Dit wil zeggen dat er een grote hoeveelheid tijd nodig is om een degelijk resultaat te bereiken, het betekend ook dat er technisch gezien niet genetisch gemanipuleerd is. Dit laatste is vooral belangrijk vanuit een ethisch standpunt.

12.3.2 “Marker-assisted breeding”

Bij marker-assisted breeding zullen we het veredeling proces proberen te versnellen door DNA analyses te maken. We beginnen met de identificatie van genetische varianten geassocieerd met specifieke eigenschappen of die zich in de omgeving van deze allelen bevinden. Daarna zullen we verschillende organismen met elkaar kruisen om de gewilde eigenschappen over te laten erven (zie figuur 108). Omdat we weten welke secties van het DNA overeenkomen met een eigenschap is het niet nodig om te wachten tot een nakomeling volwassen is om de resultaten te verkrijgen. Door een simpele DNA analyse te maken van het jong organisme kunnen we kijken of de gewilde secties DNA correct zijn overgekomen. Het voordeel van deze aanpak is natuurlijk dat het hele proces snel gaat. We noemen dit ook wel genoomgebaseerde veredeling.



Figuur 108: Marker assisted breeding

12.3.3 In vitro cultivatie van biomassa

Moderne biotechnologie maakt het ook mogelijk om het kweken van dieren overbodig te maken. Zo bewees professor Mark Post in 2013 dat het mogelijk is om hamburgers te maken in het labo. Deze hamburger bestond uit ongeveer 20 000 spiervezels die gecultiveerd werden vanuit stamcellen. In 2020 stond in Singapore voor het eerst kippenvlees te koop dat gekweekt werd in een bioreactor.

12.4 Biotech gewassen

Biotech gewassen zijn gewassen die genetisch gemodificeerd zijn om de kwaliteit te verbeteren. Hierbij proberen we optimaal gebruik te maken van de genenpools in de natuurlijk of commercieel voorkomende cultivars. Dit proces is opnieuw sneller dan marker-assisted breeding.

12.4.1 Verbeterde kwaliteitskenmerken van planten

Het doel van Biotech gewassen is om verhoogde opbrengsten op te leveren met de teelt van gewassen in zwaardere klimatologische omstandigheden. We streven ook om verbeterde nutritionele eigenschappen te verkrijgen met een lagere CO_2 uitstoot en waterverbruik. Voorbeelden hiervan zijn gewassen die natuurlijk insect resistant zijn:

- Minder schade aan gewassen
- Aanzienlijke vermindering van chemische bestrijdingsmiddelen
- Minder milieu-impact

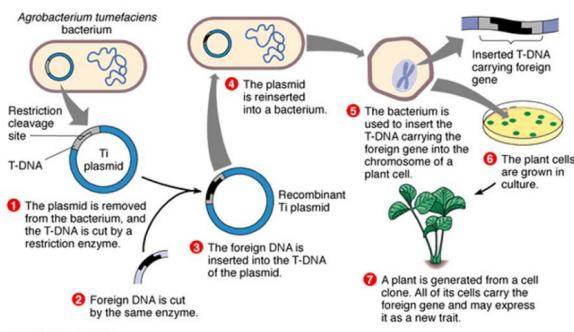
12.4.2 Methoden

Om de genetische modificatie zelf toe te passen, kennen we twee methoden: Agrobacterium-gemedieerde gentransfer en biolistics.

12.4.2.1 Agrobacterium-gemedieerde gentransfer

- *Agrobacterium tumefaciens*: een bodembacterie die een deel van het eigen DNA (T-DNA) overdraagt naar de plant
- Expressie van T-DNA genen in de plant veroorzaakt kroongalziekte
- T-DNA integreert in een chromosoom van de plantencel
- T-DNA van *A. tumefaciens* kan worden gewijzigd om genen van belang over te dragen aan plantencellen

Schematisch wordt dit proces weergegeven in figuur 109:



Figuur 109: Agrobacterium tumefaciens-gemedieerde gentransfer

12.4.2.2

12.4.2.2 Biolistics

- Gebruik van ‘gene gun’ om kleine inerte partikels gecoat met DNA in plantencel te schieten
- Gericht op de kern of chloroplast: DNA wordt geïntegreerd in plantenchromosoom of chloroplast-DNA
- Gebruik selectiemerkers om genetisch getransformeerde cellen te onderscheiden (meestal herbicide-resistantiegen)
- Techniek is nuttig bij planten die resistent zijn tegen Agrobacterium of tegen genetisch gemodificeerde celorganellen

12.4.3 Voorbeelden

12.4.3.1 Bt gewassen

- Bacillus thuringiensis (Bt) is een bacterie die een proteïne produceert dat schadelijke insecten en hun larven doodt
- Reeds meer dan 50 jaar gebruikt als een natuurlijk bestrijdingsmiddel
- Bacterieel Bt-gen ingebracht in het plantgenoom (hoe?): Bacterieel proteïne (Bt-toxine) wordt tot expressie gebracht in plant ⇒ toxicus voor (sommige) insecten
- Voordelen
 - Verminderde opbrengstverliezen
 - Reductie van chemische bestrijdings- middelen ⇒ gezonder voor landbouwer

12.4.3.2 Gouden Rijst

Bij gouden rijst kijken we niet meer naar de natuurlijke verdediging van de plant, maar naar de nutritionele waarde. We weten dat er in veel derdewereldlanden een vlotte toegang is tot rijst. Rijst is een goede koolstof bron, maar bevat minder vitamines. Het doel van gouden rijst is om een hogere concentratie vitamine A te verkrijgen tegenover normale rijst. Dit is geen makkelijk proces. Er zijn hiervoor namelijk meerdere enzymen nodig die weinig tot niet voor komen in rijst. Hierdoor moet men meerdere genen aanpassen of invoegen.

12.4.3.3 “Biopharming”

Eén veld van een transgenen gewas kan een grote hoeveelheid commercieel waardevolle en extraheerbare eiwitten produceren. Met biopharming proberen we genetisch gemodificeerde planten als eiwitfabrieken gebruiken:

- Fytochemicaliën
- Recombinante enzymen
- ‘Moleculaire landbouw’ van planten die fytochemicaliën produceren die nuttig zijn in geneeskunde:
 - Antilichamen
 - Vaccins (Goedkope eetbare vaccins die geen koeling nodig hebben)
 - Groeifactoren
 - Hormonen
 - ...

12.4.4 Gezondheids- en milieurisico's

- Tegenstanders vrezen de effecten van vreemde genen, stukjes DNA die niet van nature in planten voorkomen:
 - Allergische reacties
 - Antibioticaresistentiegenen kunnen zich verspreiden naar ziekteverwekkende bacteriën bij mensen
 - Oorzaak kanker
 - Tot op heden heeft de wetenschap geen van deze bezorgdheden ondubbelzinnig kunnen aantonen
- Bezorgdheden met betrekking tot milieu en ecologie:
 - Genen voor resistentie tegen plagen of herbiciden kunnen zich verspreiden naar onkruidgewassen
 - Weinig experts voorspellen dit maar verdere studies zijn nodig
 - Afname van de biodiversiteit
- Oligopolie van enkele Agrofood-bedrijven

12.5 Biocontrole organismen

12.5.1 Gebruik van micro-organismen als biomeststoffen

Men kan gebruik maken van micro-organismen om bemesting te bevorderen in een symbiotisch proces. Dit heeft enkele voordelen tegenover traditionele bemesting:

- Goedkoper
- Beter voor het klimaat aangezien er minder stikstofhoudende meststoffen nodig zijn

Er zijn nog andere voorbeelden gegeven, maar deze zijn minder belangrijk.

12.6 Andere biotechnologische voorbeelden die bijdragen aan duurzaamheid

12.6.1 Productie van biobrandstoffen

De belangrijkste concepten staan vermeld in sectie 8. Veel van deze stappen kunnen wel gedaan worden met micro-organismen die specifiek gemodificeerd zijn voor dit doeleinde. Enkele voorbeelden van het gebruik van agricultural biotechnology om brandstof te maken zijn:

- Plantaardige oliën voor de productie van biodiesel
- Gebruik van ‘tuinafval’ voor de productie van bio-ethanol door gebruik te maken van fermentatieprocessen

12.6.2 Grijze Biotechnologie

Grijze Biotechnologie verwijst naar milieutoepassingen en is gericht op het behoud van de biodiversiteit en het gebruik van micro-organismen en/of planten om verschillende verontreinigende stoffen zoals zware metalen en koolwaterstoffen te isoleren en te verwijderen.

12.6.2.1 Bioremediatie

Bij bioremediatie maken we gebruik van levende organismen om gevaarlijke chemische verbindingen in het milieu af te breken, degraderen tot minder gevaarlijke stoffen of op te slaan. Door de genetische modificatie van bepaalde micro-organismen kunnen we unieke metabolische reacties ontwikkelen om synthetische chemicaliën af te breken. Een voorbeeld hiervan is fytoveremediatie: het gebruik van planten om chemicaliën in de bodem, het water en de lucht op te ruimen en/of op te slaan.

12.6.2.2 Clean up strategies

We kennen twee verschillende soorten strategieën om bioremediatie toe te passen: ex situ bioremediatie en insitu bioremediatie.

Ex situ bioremediatie: Hierbij gaan we de bovenste laag van een verontreinigde bodem af schrapen en vervoeren naar een andere locatie om de behandeling uit te voeren. Omdat het proces op deze manier in een gecontroleerde omgeving kan gebeuren, zal alles veel sneller en effectiever kunnen verlopen.

Insitu bioremediatie: Hierbij gaan we geen grond verplaatsen. We zullen de micro-organismen op de site zelf laten inwerken op het medium. Omdat er geen verplaatsing nodig is, kan dit proces gebruikt worden om grotere verontreinigde gebieden te behandelen. Het is bovendien ook goedkoper dan het ex situ proces. We vermelden hier wel bij dat deze strategie doorgaans langer duurt en minder effectief is.

Veel succes met het examen! Robbe & Jonathan ♡