**Examenvragen**

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7580/

1) sommige kankers zijn erfelijk, door welke genen zijn dit en hoe kan je die vinden.

**- oncogenen**: zorgen normaal voor groei van cel, bij tumoren zijn deze abnormaal geactiveerd (gain of function mutatie). Ze zijn dominant dus 1 gemuteerd allel is voldoende voor abnormaal fenotype.

- **tumor supressorgenen**: onderdrukken processen die leiden tot ontwikkelen tumoren zoals celcyclus stoppen, apoptose, DNA-repair,… deze genen zijn recessief, beide allelen moeten dus uitgeschakeld worden voor abnormaal fenotype zich voordoet.

Tumor supressorgenen geven aanleiding tot erfelijke kankers. Beide allelen moeten uitgeschakeld worden door mutatie of deletie waardoor het meestal pas op late leeftijd voorkomt. Bij familiale kankers is 1 allel al gemuteerd waardoor nog maar 1 mutatie nodig is voor een abnormaal fenotype.

Gen vinden**: LOH**. Genomische deleties kunnen opgespoord worden door LOH. Indien een individu heterozygoot is voor een bepaalde merker kan deze in een tumorcel als homozygoot voorkomen indien een deletie is opgetreden.

**Kwantitatieve studie transcriptoom**: geeft beeld van verstoorde signaalwegen. Dit noemt men het expressie profiel. Hiervoor bestaan 2 belangrijke technieken. **SAGE** (serial analysis of genome expression) is gebaseerd op sequentiebepaling van cDNAs. mRNA wordt uit weefsel geissoleert en via RT naar cDNA omgezet. Dit is een weergave van de mature transcripten van de cel. door 2 restrictieenzymen wordt op gerichte wijze een fragment (9-12bp🡪tag) afgezonderd. Deze worden aan elkaar geligeerd in lange concatemeren. Door hiervan de sequentie te bepalen bekomen we efficiënt de sequentie van een groot aantal tags en hun frequentie. Voor elke tag kan dan overeenkomstig cDNA en gen bepaald worden via databanken. **Micro-array - DNA-chips**: Micro-arrays worden gemaakt door DNA fragmenten te spotten op een substraat. Meestal wordt hier een microscoop draagglaasje gebruikt. Voor de analyse van expressieprofielen komen deze fragmenten overeen met een deel van een transcript. mRNA uit een weefsel of cellijn wordt omgezet in cDNA en fluorescent gemerkt. Dat cDNA kan op de arrays gehybridiseerd worden. Is er voor een gen mRNA aanwezig, dan zal er een fluorescent signaal ontstaan op de spot die het overeenkomstig DNA fragment bevat. De sterkte van het signaal is een maat voor de hoeveelheid cDNA, of voor het expressieniveau van het gen. Meestal wordt deze meting genormaliseerd. Het cDNA van de het te onderzoeken staal wordt in één kleur gemerkt, het cDNA van een referentiestaal in een tweede kleur. Na hybridisatie wordt voor elke spot de verhouding tussen beide kleuren gemeten. Op deze wijze wordt bepaald of het transcriptieniveau van een specifiek gen in het staal hoger of lager is dan zijn expressie in de referentie. Het DNA dat gebruikt wordt voor het maken van de arrays kan bereid worden door PCR op cDNA klonen. Er bestaan collecties met tienduizenden gekarakteriseerde humane cDNAs. Of het DNA kan in situ op een substraat gesynthetiseerd worden (DNA chips).

Op basis van expressieprofielen kan men een kanker in groepen indelen ahv prognose.

3) hoe maak je een transgene muis met verhoogde expressie bepaald gen. Hoe maak je een transgeen dier met een gen-KO in een specifiek weefsel. (iets met cre-LoxP systeem) welke moeilijkheden kunnen voorkomen?.

**Transgenese** kan via pronucleus injectie, nadeel dit volledig willekeurig gebeurt waardoor in sommige cellen wel, andere geen expressie is. Het kan ook via ES cellen. ES cellen vertonen homologe recombinatie. De introductie van rDNA kan op gericht wijze in het genoom worden ingebracht door homologe sequenties te gebruikten. Er zijn 2 basisstrategieën voor homologe recombinatie: een eerste is **insertievectoren**, deze worden in het genoom ingebracht via reciproque recombinatie waardoor transgen op gerichte wijze in doelwit locus wordt gebracht. Deze methode wordt meestal gebruikt voor KO gen. Een andere is **vervangingsvectoren**, dit is voor een doelwitsequentie te vervangen door een andere, gewijzigde sequentie. Dit dient voor subtiele veranderingen aan te brengen. Het rDNA bevat ook een positieve merker die het toelaat cellen te selecteren die het DNA juist hebben ingebouwd en een negatieve merker die cellen laat afsterven die dit niet hebben gedaan.

**Site specifieke recombinatie** is een vorm van genetische recombinatie waarbij DNA-keten uitwisseling gebeurt tss segmenten met beperkte graad van homologe sequenties. Hierbij worden site specifieke recombinasen (enzymen) gebruikt die de DNA-helix op specifieke plaats knippen, de 2 helices uitwisselen en DNA-keten weer ligeren. 1 van de meest gebruikte recombinasen is het cre recombinase dat de loxP sequentie recombineert (cre-lox systeem). Als er dan in het DNA 2 recombinatiesequenties (zoals loxP) aanwezig zijn (in zelfde orientatie) dan zal de expressie van het overeenkomstig recombinase (cre) resulteren in de verwijdering van de sequenties die geflankeerd worden door de recombinatie sequenties.

Dit heeft 2 toepassingen:

**Generatie transgene muizen** met gerichte mutaties met minimale storing van het genoom. Normale homologe recombinatie resulteert in de integratie van rDNA, samen met een merker voor positieve selectie. Door in het construct de selectiemerker te flankeren door loxP sequenties, kan in de ES kloon die het construct door homologe recombinatie heeft ingebouwd, na selectie de selectiemerker worden verwijderd door een tweede transfectie met een expressieconstruct voor het cre recombinase.

Nog een toepassing is **conditionele gen-KO**. Een bepaald gen kan nodig zijn voor ontwikkeling waardoor men het niet kan verwijderen in ES. Bij conditionele gen-KO wordt een gen op gecontroleerde wijze in een specifiek weefsel geïnactiveerd. Bij deze experimenten zijn 2 stammen nodig. In een eerste stam worden er in het gen 2 loxP-sequenties geïnduceerd die het essentieel deel van het gen flankeren maar normale expressie niet verstoren. Dit gebeurt door een combinatie van homologe recombinatie en site specifieke recombinatie in ES-cellen. een tweede muizenstam wordt gegenereerd waarin door trangenese een construct is gebracht dat het cre recombinatie tot expressie brengt. Dit construct wordt aangedreven door weefselspecifieke promotor en in die muizen komt het cre recombinase enkel tot expressie in het weefsel waar die promotor actief is. Door beide muizenstammen te kruisen bekomt men muizen waar het cre recombinase het doelwitgen specifiek inactiveert in weefsels of cellen waar het tot expressie komt.

5) voor een salamander wil men een fysische kaart maken. Hoe zou je dat doen?

Fysische kaart = catalogus met exacte positie van elk gen of elke locus.
D. i. met andere woorden de volgorde en onderlinge afstand van ORF's (open reading frames).
bvb Factor VIII: chromosoom x, lange arm, positie 28 (Xq28)
<->
Genetische kaart = associatie tussen polymorfismes/mutaties en het voorkomen van een bepaalde aandoening of kenmerk, bestudeerd vanuit het fenotype. Met andere woorden, de FUNCTIE van de in de fysische kaart beschreven genen.
bvb. gestoorde functie van Factor VIII kan hemofilie A opleveren of nog: het gen dat hemofilie A veroorzaakt ligt op Xq28.

Iets belangrijk bij de systematische contructie fysische kaarten is het gebruik van gestandaariseerde geordende bibliotheken. Dit zijn bibs waarvan elke individuele kloon gegroeid en bewaard wordt in een well van een microtiterplaat. fysische kaart maken. Constructie komt overeen met isoleren van een verzameling genomische klonen die samen het volledige gebied als inserts bevatten. Een verzameling overlappende genomische klonen (inserts overlappen) is een contig. Fysische kaart is dus af als wij over contig gebied bezitten. gemiddelde lengte inserts van genomische bib wordt bepaald door het vector-gastheersysteem dat men gebruikt voor aanmaak bib. (PAC, BAC, YAC zijn belangrijkst) dit bepaald de grootte van de individuele klonen en dus de resolutie.

Een STS (sequence tagged sites) wordt gebruikt voor het aanmaken 2 unieke primers voor PCR om de locus te dupliceren. STS’en zijn universele fysische merkers voor een genoom. De aanwezigheid kan bepaald worden door PCR. Zien we een product van correcte grootte dan is STS aanwezig in insert anders afwezig. Inserts van overlappende klonen moeten zelfde STS bevatten. Dit vormt de basis voor bouwen contigs.

We hebben dus 2 merkers (meestal STS) die gebied flankeren. Deze STS’s worden gebruikt om genomische klonen te identificeren die deze merkers bevatten. In een recursief proces gebruiken we nu die klonen om nieuwe STS te ontwerpen die gebruikt worden om nieuwe klonen te isoleren waarvan inserts met originele klonen overlappen. Meestal bepalen we de sequentie van de uiteinden van de inserts om de STS te ontwikkelen. Na enkele stappen hebben we contig volledig gebied.

6) hoe kan je structurele chromosoom afwijkingen zoeken, en wat kunnen deze veranderingen ons leren bij patiënten met een aandoening? Hoe komt het dat structurele afwijkingen aanleiding kunnen geven tot constitutionele (aangeboren) aandoeningen? Hoe kunnen structurele afwijkingen verklaard worden?

**- karyotypering**: dit is een kaart van alle chromosomen. Deze bekomen we in verschillende stappen. 1ste: omdat chromosomen als gecondenseerde structuren enkel zo voorkomen tijdens de celdeling kunnen we een kaart enkel opstellen bij delende cellen (vb WBC).

2de: om een grotere proportie delende cellen te bekomen moeten deze worden gesynchroniseerd. Dit doen we door toevoegen methotrexaat aan het cultuurmedium. Dit is een inhibitor van dihydrofolaatreductase nodig voor synthese DNA. Cellen accumuleren dus op G1/S punt. Deze blokkering kunnen we opheffen door wegwassen van enzyme en toevoegen thimidine waardoor celdeling verder gaat.

3de: de celdeling moet gestopt worden bij de profase/prometafase. Hier komt het DNA als chromosomen voor. Aan het medium wordt colchemid toegevoegd. Dit depolymeriseert microtubuli en bindt aan tubuline.

4de: de celkernen worden onderworpen aan hypotone shock, de chromosomen worden gefixeerd met azijzuur/methanol en uitgespreid op microscoopglaasje.

5de: identificatie chromosomen is mogelijk na kleuringen die een specifiek bandenpatroon genereren op de chromosomen. Meestal gebruikt met G-banding.

**- FISH: (fluorescente in situ hybridisatie)** men maakt DNA-sondes die fluorescent zijn gemaakt. Hierdoor kan de aan- afwezigheid van een bepaalde sequentie bepaald worden. FISH detecteert translocaties en inversies. Men kan verschillende fluorochromen gebruiken waardoor verschillende sondes in combinatie gebruikt kunnen worden. Er zijn verschillende soorten sondes. Unieke sequenties die specifieke sequenties detecteren. Dit kunnen cDNA-fragmenten of genomische klonen zijn. Bij genomische klonen kan de aanwezigheid van repititief DNA interfereren met detectie unieke sequenties. Sondes moeten een bepaalde min. Lengte hebben en meestal gebruikt men PAC/BAC. Repetitieve sondes bevatten een DNA herhaling. Een alu-herhaling kleurt hele genoom, telomeer herhaling kleurt telomeren maar de belangrijkste zijn die de centromeerregio van 1 specifiek chromosoom kleuren. Chromosome paints kleuren volledig chromosoom of belangrijk deel.

**CGH (comparative genome hybridization)** Is een FISH-techniek die amplificaties (en deleties) in het genoom kan opsporen hierbij word het DNA van een tumorcel fluorescent gemerkt en controle genomisch DNA met een 2de kleur gemerkt. Equimolaire hoeveelheden van beide probes worden gemengd en op metafase van een normale cel gehybridiseert. Voor sequenties die met een normaal kopie aantal voorkomen zullen beide fluorescente signalen even sterk zijn. Indien niet zal er een verschil zijn.

**De structurele chromosoomafwijkingen verklaren**: zijn het gevolg van breuken en herrangschikking. Indien breuk (2) aan 1 zijde centromeer een deel wordt niet meer teruggezet leidt dit tot deletie. Inversie gebeurt door breuk aan 1 zijde centromeer dat dan omgekeerd weer wordt ingebouwd of door breuken aan verschillende zijde centromeer dat omgekeerd wordt ingebouwd. Dit zorgt voor centromeer op andere plaats. Er kan ook een ringchromosoom gevormd worden door breuken aan beide zijde centromeer waarna uiteinden aan elkaar hechten. Translocatie kan op 2 manieren gebeuren. Bij reciproque gebeurt er een breuk in 2 chromosomen waarna deel wordt uitgewisselt. Mogelijk komt hierdoor op 1 chromosoom 2 centromeren en op 1 geen. Dit is onstabiel in mitose. Robersoniaanse: 2 lange armen acrocentrische chromosomen (centromeer dicht bij uiteinde) versmelten en klein deel gaat verloren in mitose (bevat geen genen)

**Aanleiding tot aangeboren aandoeningen**: indien deze chromosoomafwijkingen in de kiemlijn gebeuren kan die leiden tot een aandoening. (zie schema)

Wat leren veranderingen ons bij een patiënt met aandoening: veranderingen kunnen leiden tot inactivering of overexpressie bepaalde genen. Dit kan lijden tot vele kankers.

7) Welke testen doe je om een microdeletie op te sporen bij een tumor? => CGH, FISH, LoH

Zie vorige

8) Welke experimenten doe je om de genen te identificeren die bijdragen tot een complexe, multifactoriele ziekte? Waar moet je vooral op letten? principe en hoe komt het (die 5dinge: causaal verband, LD, epigenetisch, populatie stratificate, type 1 fout)

Complexe ziekten worden veroorzaakt door verschillende genen en omgevingsfactoren. Er zijn dus multiple loci die elk een kleine bijdrage leveren aan fenotype. Genen die hieraan bijdragen noemt men suscibiliteitsgenen of risicofactoren. Kwantitatieve kenmerken zijn altijd multifactorieel, genen die hieraan bijdragen noemt men QTLs (quantitative trait loci).

Koppelingsanalyse is hier te moeilijk, men zou dit wel kunnen doen voor grote families waar kenmerk praktisch mendeliaans wordt overgeërfd of door enkel rekening te houden met zieke leden van familie. Een mogelijke valstrik is genetische heterogeniteit.

Voor complexe kenmerken gebruikt men liever niet-parametrische methodes. Deze vertrekken van de stelling dat individuen die het fenotype delen voor relevante loci dezelfde allelen vertonen. Zo’n onderzoek kan op 2 niveaus gebeuren. Op families, hier analyseert men het genoom van broers en zussen die kenmerk delen (**sib-pair analyse).** Zij bezitten dezelfde allelen voor die loci. Concreet onderzoekt men voor welke regio’s van het genoom er allelen zijn die frequenter voorkomen bij sibs met kenmerk dan verwacht.

**Associatiestudies:** onderzoek op vlak van populaties. Bij associatie-studies wordt voor elke locus onderzocht of er allelen zijn die frequenter voorkomen bij individuen die het kenmerk vertonen dan bij de algemene populatie. Er zijn binnen deze context twee mogelijk relevante verklaringen voor associatie: (i) er is **een causaal verband** tussen allel en kenmerk, (ii) ‘**linkage disequilibrium’**. Er kan een causaal verband zijn tussen allel *A1* en een fenotype als *A1* invloed heeft op het functioneren van zijn genproduct en als dat product een rol speelt in een biologisch proces dat betrokken is bij het kenmerk. Als er een causaal verband is, dan verwachten wij dat in alle populaties voor dat kenmerk associatie met *A* gevonden wordt. Daarbij mogen wij niet uit het oog verliezen dat de aanwezigheid van allel *A* bij een individu noch voldoende, noch noodzakelijk is voor de expressie van het fenotype. Het gaat hier immers om een multifactorieel kenmerk. Daarom gebruiken wij in dit verband de term ‘risicofactor’. Een tweede oorzaak voor het vinden van associatie tussen een allel en een fenotype is ‘linkage disequilibrium’. Veronderstellen wij dat een locus *X* een risicofactor is voor astma, dat voor *X* verschillende allelen mogelijk zijn (*X1, X2* of *X3)* en dat het allel *X1* een verhoogd risico oplevert voor astma (causaal verband). *X* ligt op het genoom in een regio waar ook de locus *A* voorkomt*. A* is polymorf met als mogelijk allelen *A1, A2* … en de genetische afstand tussen *A* en *X* is zeer klein. Indien er linkage disequilibrium bestaat tussen A en X, dan zal er een haplotype (bvb *A2-X1)* frequenter voorkomen dan de andere mogelijk haplotypes met *X1.* Een associatiestudie kan dan *A2* identificeren als een risicofactor. Linkage disequilibrium veronderstelt een gemeenschappelijke voorouder waar het haplotype ontstaan is. Een positieve associatie die te wijten is aan linkage disequilibrium kan dus een andere allel (bvb *A1)* als risicofactor identificeren in een verschillende populatie (waar het *A1-X*1 haplotype zou voorkomen). Men moet rekening houden met de **epigenetische kenmerken**: overerfbare veranderingen in genfunctie zonder veranderingen in de DNA sequentie. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan DNA methylatie en RNA interference. Deze processen spelen een belangrijke rol bij de fenotypische ontwikkeling en overerving. Een belangrijke valkuil voor associatiestudies is **stratificatie van de populatie**. Stratificatie betekent dat de populatie bestaat uit genetisch verschillende subgroepen. Het is dan mogelijk dat bij toeval allel *A1* en een fenotype frequenter voorkomen in één groep van de populatie. Zo kan men deze onterecht aan elkaar koppelen.

*Associatie – koppelingsanalyse*

Bij veel toepassingen is het onderscheid tussen associatie en koppeling belangrijk. Associatie meet het verband tussen één allel en een fenotype. Het allel *E4* van het *APOE* gen is een risicofactor voor de ziekte van Alzheimer. Alle personen die homozygoot zijn voor het E4 allel hebben een verhoogd risico voor alzheimer. Koppelingsanalyse meet het verband tussen twee loci. De locus voor mucoviscidose *(CF*, ‘cystic fibrosis’) is gekoppeld aan de RFLP locus *pJ3.11*. De verschillende allelen van *pJ3.11* vertonen echter geen associatie met *CF.* Koppelingsanalyse bestudeert individuen in familieverband. Door het beperkt aantal meioses dat per familie onderzocht kan worden, kan koppeling gemeten worden voor loci die tot 20cM van elkaar verwijderd zijn. Koppelingsanalyse werkt dus op grote afstand ( 20 mb). Een ‘whole genome scan’ voor een mendeliaans kenmerk vergt de analyse van 300 merkers, één merker alle 10 cM. Associatiestudies analyseren genotypes van individuen in een populatie. Linkage disequilibrium, dat verantwoordelijk is voor veel associaties, veronderstelt dat bepaald haplotypes bewaard blijven in de populatie. Bij elke generatie kan er recombinatie optreden, linkage disequilibrium blijft dus alleen meetbaar als de merkers zeer dicht bij elkaar liggen (< 10 - 100 kb). Een ‘whole genome scan’ voor associatie met een bepaald fenotype vergt dus de analyse van 10 tot 100 duizend merkers.

**Single nucleotide polymorphisms (SNP’s)**

De genetische dissectie van multifactoriële eigenschappen vereist een zeer hoge densiteit aan genetische merkers. Er zijn onvoldoende STR’s hiervoor. Daarvoor kunnen wij sequentieverschillen van één enkele base (single nucleotide polymorphism, SNP) gebruiken (ongeveer 1/700). De info van één SNP is beperkt (meestal zijn er slechts twee allelen), maar dat wordt gecompenseerd door hun grote aantal en door de mogelijkheid om hun detectie te automatiseren. SNP’s worden bepaald op PCR producten : de regio die de SNP bevat wordt geamplificeerd. De nucleotide op de polymorfe positie wordt dan bepaald door sequenering (Sanger, sequentiebepaling op chips), SSCP analyse (single-strand conformational polymorphism analysis’) of methodes die gebaseerd zijn op veranderingen in smelttemperatuur van het PCR fragment veroorzaakt door het sequentieverschil. Het gebruik van SNP’s heeft, naast praktische voordelen, ook potentieel een conceptueel voordeel. STR’s (in het bijzonder de CA-herhalingen) komen niet voor in de open leesramen van coderende sequenties. Het is dus niet waarschijnlijk dat er een causaal verband zal voorkomen tussen een allel van een STR en het fenotype. SNP’s zijn verschillen in één enkele nucleotide. Deze kunnen dus wel voorkomen in de open leesramen van genen. Als dat gevolgen heeft op aminozuurniveau, dan kan de SNP ook functionele (biochemische) effecten hebben. Een causaal verband tussen het genotype en het fenotype is dan mogelijk.

9) je krijgt een stamboom van een familie.

- hoeveel informatieve meioses en recombinaties

-bereken LOD-score
- Welke overerving is het?
- Wie geeft het door?
- Welke experimenten voer je uit om het gen te identificeren die dit veroorzaakt?

**Gen opsporen:**

Via positionele kloning. Dit gebeurt in verschillende stappen.

1. bepalen ruwe positie locus meestal via koppelingsanalyse. Dit definieert een gebied van het genoom geflankeerd door 2 genetische merkers (waarvan we positie kennen), dat de locus bevat. De grootte hiervan wordt bepaald door het aantal informatieve meiosen die we konden onderzoeken. Men gebruikt LOD-score hiervoor.

2. gedetailleerde fysische kaart maken. Zie hierboven

3. transcript kaart: bepalen alle genen in deze regio. Klonering transcripte kan via hybridisatie, exon-trap experimenten. Bepalen waar ongeveer genen, exons liggen: zoo-blots (membranen met DNA verschillende diersoorten indien bij southern hybridisatie signalen gegeven worden van DNA van verschillende species is dit waarschijnlijk een coderend segment). En CpG-eilanden. Ook kunnen we de sequentie bepalen van de contig. Er zijn verschillende algoritmes gemaakt voor het detecteren van coderende sequenties in genomische sequenties, zij kunnen 60-80% van de exonen juist voorspellen. Andere mogelijkheid hierbij is similariteit zoeken tussen de genomische sequentie en gekende coderende sequenties. Hiervoor kan je gegevensbanken raadplegen.
4. prioritiseren voor mutatie analyse: genen moeten juist expressie-patroon en juiste functie hebben (vb kijken naar voorspelde eiwit-domeinen)
5. mutatie analyse, in vitro mutatie herstellen --> aandoening moet verdwijnen; (muis) model mutatie. Mutatie analyse wordt meest gebruikt want is algemeen toepasbaar en laat snelle vergelijking toe. Eerst vermenigvuldigt men gen met PCR en daarna doet men hier mutatie screening op.

Mutatie screening: sequentiebepaling: duur en moeilijk te interpreteren maar detecteert alle veranderingen en mutaties worden volledig gekarakteriseert.

Opm: omstandigheden kunnen leiden to vermoeilijken identificatie en interpretatie. 1ste: onvoorzien locus heterogeniteit: mutaties in verschillende genen kunnen een zelfde fenotype geven. Patiënten hebben mutaties in verschillende genen, als kandidaat gen voor kleine proportie getest wordt zullen vele stalen neg zijn (niet indien enkel families gebruikt worden) 2de: mutationele homogeniteit: in verschillende individuen kan zelfde mutatie voorkomen, onafhankelijk van elkaar verkregen, dit toon gain of function aan. 3de: mutaties zijn niet altijd pathogeen dus men kan zich vergissen. 4de mutaties kunnen moeilijk te vinden zijn in grote genen.
6. identificatie gen

11. Mucoviscidose wordt veroorzaakt door allerlei missense mutaties in het CFTR-gen Je wil een muis knock out maken voor CFTRgen. Welk mechanisme gebruik je hiervoor? Hoe doe je dit orgaanspecifiek? (iets met knock in?) hoe maak je muismodellen die het verband tussen de mutaties in het CFTR en het fenotype laten zien?

Zie 2-3

12. Hoe kan je de hypothese verklaren dat continuë kenmerken bepaald worden door genen en omgevingsfactoren? Hoe kan je nagaan of een continu kenmerk een genetische component heeft?

Continue kenmerken zijn kwantitatieve kenmerken zoals gewicht, lengte, IQ, kracht,. Men kan deze hypothese verklaren doordat bepaalde kenmerken in families meer voorkomen dan in de gewone populatie.

Tweelingstudies voor genetisch component

Associatie zie 8

13. Autisme; waarom niet-mendeliaans? Leg uit met wat voor studies de genetische componenten aangetoond kunnen worden en leg uit hoe we de genen kunnen identificeren.

Er kan geen mendeliaans overervingspatroon worden vastgesteld. De kans om het te krijgen als een familielid het heeft is groter dan in de andere bevolking maar kan niet volgens een patroon worden vastgesteld. Er is geen gen waar men de hele ziekte aan kan wijten.

Tweelingstudies voor bepalen genetisch component, of als kenmerkt vaker voorkomt in 1 familie.

Associatiestudies zie 8

15) Hoe zou je met behulp van tweelingen kunnen aantonen dat een complex kenmerk een genetische component heeft? Hoe zou je dit doen met adoptiestudies?

Eén-eiige tweelingen hebben hetzelfde genotype, twee-eiige delen het slechts evenveel als normale broers en zussen; wanneer één van beide het kenmerk heeft, is de kans bij één-eiige tweelingen dus groter dat de ander het ook heeft.
Wanneer dit klopt --> waarschijnlijk genetische component van kenmerk.
Ook: scheiding van één-eiige tweelingen (detail, niet echt nodig): andere omgeving, zelfde genotype
Adoptiestudies: biologische familie heeft kenmerk en kind ook (adoptiefamilie niet) --> waarschijnlijk genetische component van kenmerk
adoptiefamilie heeft kenmerk en adoptiekind niet --> waarschijnlijk genetische component (want omgeving is dezelfde)
opletten: adoptiegezin lijkt vaak op biologisch gezin --> omgeving deels gelijk

16) persoon met complexe ziekte en mentale retardatie. Welke chromosomale afwijkingen kun je bedenken die hiertoe kunnen leiden? Beschrijf eveneens hoe je ze zou zichtbaar maken

Trisomerie, technieken zie hieerboven.

18) waarom moeilijk susceptibiliteitsgenen te onderzoeken?

Susceptibiliteitsgenen zijn genen die bijdrage leveren aan complexe kenmerken. Deze genen kunnen verschillen in verschillende bevolkingsgroepen wat het moeilijk maakt ze te ontdekken. Een genetische variant die zo een gen is komt ook bij een heel groot deel van de bevolking voor, ook bij niet-zieken. Elk susceptibiliteitsgen heeft dus maar een kleine invloed op de ziekte.

19) Geef het ontstaan en voorkomen van repetitieve sequenties in het menselijk genoom.

Ongeveer 40% van het DNA zijn repetitieve sequenties. Deze coderen niet voor dingen nodig in de cel Er zijn 2 soorten

**- Tandem herhalingen**: Tandem herhalingen worden gevormd door de kop-aan-staart herhaling van een sequentiemotief. Afhankelijk van de lengte van dat motief spreken wij van satelliet DNA, minisatelliet DNA of microsatelliet DNA. **Satelliet DNA** wordt gevormd door de herhaling van een fragment van 5-200 bp. Het precieze sequentiemotief bepaalt de familie van satelliet DNA. Zo spreken wij van α-satelliet DNA, β-satelliet DNA, satelliet 1-2-3 DNA. Satelliet DNA is de voornaamste DNA component van de centromeren. Bij de mens zijn de centromeren enkele mb lang.

**Minisatellieten** (ook gekend als VNTR’s ‘variable number of tandem repeats’) bestaan uit de herhaling van enkele tot enkele tientallen kopieën van een motief van een tiental bp. Minisatellieten komen vooral voor in subtelomere regio’s van de chromosomen, hun lengte varieert van 1 tot 20kb.

**Microsatellieten** (STR’s, ‘simple tandem repeats’ genoemd) bestaan uit herhalingen van een blok van 1-4 bp. Deze herhalingen zijn meestal korter dan 150 bp. Microsatellieten komen verspreid over het gehele genoom voor.

- **Verspreide herhalingen:** Bij verspreide herhalingen (‘interspersed repeats’) zijn de individuele herhalings-units verspreidover het genoom.

**SINEs** (‘short interspersed nuclear element’) hebben een sequentie tot 300 bp. De belangrijkste

familie zijn de *Alu-herhalingen* met een lengte <280 bp en ongeveer 1000 000 kopieën in het menselijk genoom. *Alu* herhalingen komen dus gemiddeld alle 3 kb voor. *Alu* herhalingen hebben de structuur van ‘processed’ pseudo-genen , er wordt aangenomen dat *Alu* herhalingen door retrotranspositie over het genoom verspreid werden.

**LINE’s** (‘long interspersed nuclear elements’)sequentie 4-5kb. De belangrijkste is de *LINE-1* herhaling waarvan er meer dan 100 000 kopieën in het humaan genoom voorkomen. Deze bevat twee potentiële open leesramen, één ervan codeert voor een reverse transcriptase domein. Er is dus een gelijkenis met retrovirussen. In het humaan genoom zijn er enkele *LINE-1* herhalingen die nog actief zijn.

*‘Junk’ DNA, ‘selfish’ DNA:* Omwille van hun eigenschappen hebben verspreide herhalingen een invloed op de stabiliteit vaneen genoom (bvb. door het induceren van homologe recombinatie). Deze sequentie kunnen duseen rol spelen in de evolutie van een genoom. Er wordt aangenomen dat deze sequenties in deindividuele cel of in het organisme geen functionele rol spelen, zij zijn dus eerder een ballast voorhet genoom en worden wel eens ‘junk’ DNA genoemd. Vanuit het standpunt van de evolutieworden deze sequenties eerden als parasieten beschouwd van een genoom (‘Selfish DNA’).Moderne neo-Darwiniaanse theorieën argumenteren dat de eenheid van selectie de DNAsequentie is en niet het organisme. Op deze wijze zou het voorkomen van dit ‘selfish’ DNAevolutionair verklaard kunnen worden.

20) Sommige kenmerken worden bepaald door verschillende genen en omgevingsfactoren. Hoe kan een set genen aanleiding geven tot kenmerken die kwantitatieve verschillen geven tussen individuen (‘continuous characters’ - bijvoorbeeld gewicht)? Hoe kunnen verschillende genen bijdragen tot het onstaan van soms discrete verschillen (‘discontinuous characters’ - bijvoorbeeld ‘open rug’)?

De vooruitgang in de genetica heeft nieuwe mogelijkheden geopend om deze wisselwerking tussen genen en omgeving te bestuderen. Het is duidelijk dat de normale DNA sequentie, de normale samenstelling van het DNA niet bestaat. Het DNA van elke persoon bevat miljoenen varianten. Dit zijn geen genetische fouten, maar wel varianten, waardoor een gen soms iets minder (of iets beter) functioneert. Deze variaties dragen bij tot de grote variatie in normale kenmerken zoals lengte, gewicht, huidskleur, haarkleur, intelligentie, temperament enzovoort. Maar dezelfde varianten kunnen ook een belangrijke rol spelen in het optreden van ziekten en aangeboren aandoeningen, in interactie met de omgeving.

Bijvoorbeeld, het gen *MTHFR* heeft een belangrijke functie in de stofwisseling. In dezelfde processen is ook het vitamine foliumzuur betrokken. Embryo’s die drager zijn van een bepaalde genetische variant in *MTHFR* met een verminderde werking hebben een verhoogde kans op een verstoorde vorming van het centraal zenuwstelsel, met als gevolg een open rug of open schedel. Dit treedt vooral op wanneer het embryo onvoldoende toevoer krijgen van foliumzuur van de moeder. Daarom krijgt elke vrouw de raad om reeds voor de geplande zwangerschap voldoende foliumzuur in te nemen.

Eén bepaalde variatie in het gen *FTO* gaat gepaard met een toename in lichaamsgewicht van ongeveer 3 tot 4 kg, wanneer dit aanwezig is op beide genen. Dit effect ziet men enkel bij personen die te weinig lichaamsbeweging hebben. Bij personen met een normale lichaamsbeweging heeft deze variant geen invloed op het lichaamsgewicht.

**begrippen:**

BLAST algoritme

Er zijn programma’s nodig voor het opsporen van similariteit tussen een sequentie en databanken. Die programma’s aligneren fragmenten van twee sequenties en bepalen de similariteit. Elke nucleotide of elk aminozuur dat in beide sequenties overeenstemt krijgt een positieve score, elke mismatch krijgt een nulscore of een negatieve score. Die scores kunnen bepaald worden aan de hand van biologische gegevens en worden bewaard als matrices. Door het verschuiven van de sequentie en de introductie van ‘gaten’ (‘gaps’) worden de scores gemaximaliseerd, voor deze introductie zijn er ook negatieve scores. De maximale score definieert de optimale alignering en de similariteit. Een statistische analyse geeft dan de significantie van de waarneming.

Polymorfe merkers

Zijn nodig voor de aanmaak van genetische kaarten van de mens. De ontwikkeling van restrictie fragment lengte polymorfismen (RFLP's) waren een eerste stap in de goede richting. De eerste genetische kaarten van de mens waren dan ook op RFLP's gebaseerd. De meest RFLP's zijn echter polymorfismen met slechts twee allelen en hebben dus een relatief lage informativiteit. Bovendien is hun gebruik ook zeer arbeidsintensief zodat snel bleek dat op die wijze geen gedetailleerde en volledige kaarten van het menselijk genoom mogelijk waren.

vector-gastheer systemen:

de gemiddelde lengte van inserts van de genomische klonen bij het maken van contigs wordt bepaald door het vector-gastheersysteem dat gebruikt is voor de aanmaak van de bib. Op dit moment zijn PAC’s (P1-derived artificial chromosomes), BAC’s (bacterial) en YAC’s (yeast) de belangrijkste.

affected sib-pair analyse:

Voor het onderzoeken van het overervingsmodel van complexe aandoeningen kan men gebruik maken van niet-parametrische analyse. Hierbij veronderstelt men dat individuen met hetzelfde fenotype dezelfde allelen op die loci bezitten. Men analyseert dan het genoom van broers of zussen (sibs) van een familie die een complex kenmerk delen (**sib pair analysis**). Deze ‘sibs’ zullen, voor loci die een bijdrage leveren aan dat kenmerk, dezelfde allelen bezitten. Concreet onderzoekt men voor welke regio’s van het genoom er allelen zijn die frequenter voorkomen bij sibs die het kenmerk vertonen dan verwacht. Gebeurt dergelijk onderzoek op het niveau van populaties, dan spreken wij van **associatie**-studies

mitochondriaal DNA

bevat 37 genen (24 RNA en 13 eiwitten) ze hebben meer genen dan dit nodig maar deel wordt door nucleair genoom getranslateerd. Ze hebben in verhouding meer coderend DNA. 2 soorten keten, H-streng en L-streng, de heavy hebben veel purines en ligt aan de buitenkant, de light zijn tegengesteld. Maternele overerving. 44% G-C verhouding (veel G-C=sterkere binding).

Mosaicisme bij transgenese van muizen

De aanwezigheid van verschillende soorten cellen in hetzelfde weefsel. Een deel van die cellen komt van de oorspronkelijke muiscellen en andere van de transgene cellen die ingebracht zijn in de blastocyst. De ene cel kan bv 3 XXX hebben en de andere 2 XX

STS: (sequence tagged site)

Is een korte genomische sequentie (100-500bp) die gebruikt kan worden om 2 unieke primers te ontwerpen om het fragment door middel van PCR te amplificeren. De inhoud van de STS is niet bepaald, het kan een unieke sequentie zijn, een polymorfe (CA)n – herhaling of een andere repetitieve sequentie. (SNP is vb van polymorfe STS)

pseudogenen,

Pseudogenen zijn niet-functionele genen. Zij ontstaan door 2 verschillende processen : de inactivering van gedupliceerde genen en retrotranspositie van mRNAs in het genoom. Het genoom is een dynamische entiteit. Op een evolutionaire tijdschaal gebeuren er herrangschikkingen van het genoom (duplicaties, deleties, translokaties) en accumuleren er puntmutaties. Duplicaties generen bijkomende kopieën van genen, mutaties kunnen dan aanleiding geven tot een homoloog gen of tot het inactiveren van het gen (geen transcript of geen translatie door verlies van het open leesraam). Genen die op die wijze geïnactiveerd zijn conventionele pseudo-genen (‘unprocessed pseudogenes’) (hebben promotor maar na verloop van tijd, mutaties zal expressie stoppen). Uitzonderlijk kan in een eukaryote cel een mRNA door een reverse transcriptase terug overgeschreven worden in een cDNA. Als dit cDNA dan in het genoom ingebouwd wordt ontslaat een pseudo-gen dat een directe kopie is van de mRNA, zonder intronsequenties (‘processed pseudogene’) (geen promotor maar komen tot expressie door op juiste plaats in genoom te ziiten). Dit proces heet retrotranspositie. ‘Processed’ pseudo-genen accumuleren ook mutaties die het ORF onderbreken. Sommige pseudo-genen zijn transcriptioneel actief en geven dus aanleiding tot RNA molecules.(‘expressed pseudogenes). Deze mRNAs worden dan niet meer vertaald in proteïnes.

Variegatie bij transgene muizen,

Indien een transgen via pronucleusinjectie bij muizen wordt ingebracht wordt dit random geintegreert in het genoom. Deze kunnen al dan niet tot expressie komen afhankelijk van hun positie. Chromosomen zijn namelijk op 2 manieren verpakt, als euchromatine die wel wordt afgeschreven of heterochromatine die niet wordt afgeschreven. De precieze grenzen hiervan kunnen van cel tot cel afwisselen waardoor het gen in de ene cel wel en in de andere niet tot uiting komt. Dit is variegatie.

EScellen in de muis,

Embryonale stamcellen, kunnen uit de inner celmass van blastocysten afgezonderd worden. Deze kunnen dan in vitro gekweekt en genetisch gemanipuleert worden. Deze kunnen dan terug in de blastocyst worden gestoken waar ze kunnen uitgroeien tot kiemcellen. ES-cellen worden gebruikt voor gen-targetting (modificatie, uitschakelen bestaand gen).

contig

De constructie van een fysische kaart van een genomische regio komt in de praktijk overeen met het isoleren van een verzameling genomische klonen die samen het volledig gebied als inserts bevatten. Een verzameling overlappende genomische klonen (meer precies : klonen waarvan de inserts overlappen) is een **contig** (van ‘contiguous’).

genomische bank/bib:

een collectie van klonen in faag λ (fragmenten DNA) die representatief is voor het volledige genoom noemen we een genomische bibliotheek

 tandem repeats:

Tandem herhalingen worden gevormd door de kop-aan-staart herhaling van een sequentiemotief.

Afhankelijk van de lengte van dat motief spreken wij van satelliet DNA, minisatelliet DNA of

microsatelliet DNA.

CpG eilanden,

CpG dinucleotiden vormen een signaal voor methylatie van de cytosine door cytosine-DNA

methyltransferases. Oxidatieve deaminatie van 5’-methylcytosines leiden tot de vorming van

thymidine nucleotides die door de DNA repair mechanismen van de cel niet als mutaties herkend

worden. CpG nucleotiden verdwijnen dus gedurende de evolutie uit het genoom, in het humaan

genoom is de frequentie van CpG dinucleotiden ongeveer 20 % van de frequentie die verwacht

kan worden aan de hand van het G+C gehalte van ons genoom (43 %). De CpG dinucleotiden in

ons genoom komen meestal als clusters voor en zijn dan niet gemethyleerd. Deze clusters, **CpG**

**eilanden** genoemd, zijn geassocieerd met de 5’ uiteinden van genen. CpG eilanden kunnen dus

als ‘wegwijzers’ naar gen-regio’s gebruikt worden. De methylatie status van de CpG eilanden is

dan meestal gecorreleerd met de expressie van die genen. CpG eilanden kunnen experimenteel

opgespoord worden door restrictie-analyse met restrictie enzymen die CG sequentie in hun

restrictiesite bevatten.

TDT: (Transmission disequilibrium test)

Is een familie gebasseerde associatie test voor het testen op het voorkomen van genetische linking tussen genetische merkers en een fenotype. Genetische linking detectie kan enkel in het voorkomen van genetische associatie.

Associatie studies:

Bij associatie-studies wordt voor elke locus onderzocht of er allelen zijn die frequenter voorkomen bij individuen die het kenmerk vertonen dan bij de algemene populatie. Er zijn binnen deze context twee mogelijk relevante verklaringen voor associatie: (i) er is een causaal verband tussen allel en kenmerk, (ii) ‘linkage disequilibrium’.

exon trap experiment:

**Exon-trap** experimenten zijn gebaseerd op het natuurlijk transcriptie- en splicingproces in eukaryote cellen. Bij exon-trap experimenten worden de te onderzoeken genomische fragmenten gekloneerd in een intron van een eukaryote transcriptie eenheid die in een plasmide is ingebouwd. Die plasmiden worden vervolgens in een cellijn ingebracht door transfectie. De cellen die een plasmide hebben opgenomen zullen het gen van de eukaryote transcriptie-eenheid afschrijven en omvormen tot een mature mRNA. Als het genomisch fragment dat in de transcriptie eenheid gekloneerd is een exon bevat zal dat exon in de mature mRNA terecht komen. De aanwezigheid van een extra exon in het transcript dat afkomstig is van de plasmide kan dan door PCR bepaald worden.

Anticipatie

bij genetische anticipatie zal de ziekte per generatie ernstiger worden en/of op vroegere leeftijd tot uiting komen. Vb. myotonische dystrofie. Oorzaak: het langer worden van normaal aanwezige instabiele regio’s in of rond een gen. Hoe nog ongekend.

EST (expressed sequence tags):

Zijn sequenties bepaald op het 5’ en het 3’ uiteinde van cDNA klonen. EST’s geven een inzicht in de complexiteit van ons transcriptoom. EST’s bepaald op een cDNA bank gekopieerd van mRNA van één enkel cel type of weefsel geeft ons ook een kwantitatief inzicht in het niveau van expressie van de verschillende genen in dat weefsel (expression profiling). De sequentiegegevens van EST’s zijn aanwezig in de sequentie-gegevensbanken. Net zoals voor genomische klonen het geval is kunnen de adressen van elke cDNA de onderzoeker van de sequentie direct naar de correcte cDNA kloon leiden.

Heritabiliteit

De heritabiliteit van een populatie is de mate waarin een geobserveerd verschil het gevolg is van genetische verschillen. Variatie is het gevolg van genetica, omgeving en kans. Heritabiliteit wordt gemeten door het bepalen van het relatieve aandeel van genetica en omgeving op een fenotype.

 Heritability measures the proportion of the overall variance of a character that is due to genetic differences

X-inactivatie:

Tijdens de vroege ontwikkeling van het vrouwelijke embryo zal in elke cel een van de twee X-chromosomen willekeurig geïnactiveerd worden. Het geïnactiveerde X-chromosoom wordt als heterochromatine verpakt. Op het geïnactiveerde X-chromosoom wordt van het XIST-gen 15 kb transcript gemaakt (functie onduidelijk). Dat gen bevindt zich in het ‘X-inactivation center’ (Xic), de regio op het X-chromosoom die verantwoordelijk is voor de inactivering van één van de twee X-chromosomen in een vrouwelijke cel.

Mitochondriale overerving:

De mitochodrien in een zygote zijn uitsluitend afkomstig van de eicel, het komt dus altijd van de moeder. Indien de moeder hier een afwijking aan heeft zullen alle kinderen dit krijgen.

Gebalanceerde translocatie:

Bij translocatie wordt er DNA van 1 chromosoom naar een ander overgedragen (niet homoloog). Bij gebalanceerde gaat er geen erfelijk materiaal verloren. Er zijn 2 manieren, reciproque recombinatie waarbij beide chromosomen een fragment uitwisselen en robertsoniaans recombinatie waarbij de 2 lange armen van acrocentrische chromosomen (centromeer dicht bij uiteinde) versmelten en het kleine deel verloren gaat (bevat toch geen genen).

penetratie:

de kans dat iemand met een bepaald genotype dat karakter zal uiten.

relatief risico

personen met een bepaalde variant van een allel hebben x keer meer risico op het verkrijgen van een afwijkingen dan mensen met een andere variant.

Genetische merkers:

Een genetische merker is een deel van de DNA-sequentie die kan gebruikt maken voor DNA-testen (forensisch, vaderschap,…) zij bevatten een deel dat constant voorkomt bij iedereen en dus gemakkelijk gevonden kan worden, en een variabel deel waarmee mensen onderscheiden kunnen worden. Elke locus die genetische variabiliteit bezit kan als genetische merker gebruikt worden.

- cDNA bib:

complementary DNA; via reverse transcriptase uit mRNA bekomen, mRNA verschilt per weefsel door verschillende eiwitexpressie. cDNA geen introns --> korter --> vector kan plasmide zijn (want klein stuk te kloneren)
mRNA opzuiveren: mRNA meestal poly(A) --> mbv poly(U) of oligo(T)
cDNA geen restrictie-site --> oligonucleotide linkers met restrictie-site aan weerszijden cDNA
1 plasmide per gastcel --> monoclonaal
alle verschillende delen bij elkaar representeren volledig cDNA waarmee begonnen is

- genetische heterogeneiteit:
1. locus heterogeneiteit: mutaties op verschillende loci leiden tot 1 fenotype. Bv bij complexe pathway: veel genen verantwoordelijk voor eindproduct
2. allelische heterogeneiteit: verschillende mutaties op 1 locus leiden tot 1 fenotype
3. klinische heterogeneiteit: verschillende mutaties op 1 locus leiden tot verschillende fenotypes

- Line-sequenties: long interspersed nuclear element = transposon
3 klassen (LINE-1, 2 en 3). LINE sequentie codeert voor endonuclease/reverse transciptase en RNA bindend proteïne --> autonoom
LINEs transposeren vooral in gen-arm DNA --> lage mutationele last
LINEs kunnen niet-autonome transposons bv SINEs transposeren indien ze geflankeerd worden door dezelfde sequenties (endonuclease moet kunnen knippen).

Linkage disequilibrium: formule (belangrijk!): het meer of minder voorkomen van een bepaald haplotype, van allelen op 2 of meer loci, dan normaal verwacht wordt door random vorming.
pAB > pA.pB => linkage disequilibrium
2 loci met mogelijke allelen voor 1: A en a en voor 2: B en b
Als de kans op AB groter is dan de kans op A vermenigvuldigd met de kans op B, dan is er linkage disequilibrium . het kan dus een idee geven over de afstand tussen 2 loci. Is deze zeer klein kan linkage disequilibrium optreden. Is deze groot dan niet. Ook bij nieuwe allelen kan dit voorkomen omdat er niet voldoende recombinaties zijn gebeurt.

Telomeren

Dit zijn de DNA-sequenties die zich op het uiteinde van een chromosoom bevindt. Zij hebben een beschermende functie. De lagging strand zal bij replicatie niet volledig tot het einde kunnen worden gerepliceerd waardoor een deel van het DNA verloren zou kunnen gaan. Telomeren bevatten geen genen en het kan geen kwaad als hier een deel verloren gaat.