

Hoofdstuk 1 – Situering van de genetica

8000 v. Chr.	domesticatie huisdieren en cultivatie planten
4000 v. Chr.	rotstekeningen met stambomen van paarden
800 v. Chr.	kruisbestuiving dadelplanten (Assyriërs)
500-300 v. Chr.	pan-Genesis (Griekse filosofen), pangenen = partikels die door bloed van weefsels naar voortplantingscellen worden getransporteerd
19 ^e eeuw	evolutie theorieën Lamarck: kenmerken verworven tijdens leven kunnen doorgegeven worden naar volgende generatie
1859	Darwin: natuurlijke selectie basis evolutie
1865	Mendel: theorie voor overerving obv. kruisingsexperimenten
1888	Roux: chromosoom
eind 19 ^e eeuw	eugenetica: maatschappelijke beweging olv. Galton → poging menselijke ras te verbeteren dmv. artificiële selectie
1900	Bateson introduceerde term "genetica" (van "Genesis", het ontstaan)
1909	"gen" (Johansson)
1953	structuur DNA (Watson en Crick)
1956	karyotype humaan genoom: 46 chromosomen (Tjio en Levan)
1959	beschrijving eerste chromosoomfouten
heritabiliteit =	rol van genetische factoren bij ziektebeelden waar omgeving ook grote rol speelt
1991	Human genome project
genotype =	genetische samenstelling dier, plant, mens
fenotype =	uitzicht dier, plant, mens; bepaald door genotype + omgeving
genetische drift =	genetische veranderingen
industriële melanisme =	evenwicht tussen 2 vormen bepaald door omgeving (vervuiling)

Hoofdstuk 2 – Wetten van Mendel

monohybride kruising = kruisingen met planten die verschillen in 1 kenmerk

Eerste wet (segregatie wet): allelen splitsen en segregeren willekeurig

dihybride kruising = ouderparen verschillen in 2 kenmerken

Tweede wet (onafhankelijke segregatie): paren van allelen segregeren onafhankelijk

afwijkingen op de wetten:

- codominantie = beide allelen komen tot uiting in het fenotype van de heterozygoot (bv. AB)
- onvolledige/partiële dominantie = heterozygoot vertoont intermediair fenotype (rood+wit → roze)
- letale genen = individuen homozygoot voor allel niet leefbaar
- multipele allelie = meer dan 2 allelen voor een bepaald kenmerk
- penetrantie = eigenschap komt niet naar voor in fenotype, terwijl dit volgens genotype wel verwacht werd (verminderde penetrantie)
- epistasie = allel doet werking andere (hypostatische) allel teniet

dominantie	9+3 : 3 : 1
wederkerige dominantie	9+3+3 : 1
recessieve = cryptomerie	9 : 3 : 3+1
wederkerige recessieve	9 : 3+3+1

Hoofdstuk 3 – Koppeling, recombinatie en de constructie van genetische kaarten

genen op chromosomen → koppeling → worden niet meer onafhankelijk doorgegeven

- recombinatie = gevolg van crossover = uitwisseling fragmenten bij chiasma
- crossover komt vaker voor bij kenmerken die ver van elkaar liggen
 - → berekenen genetische afstand tussen kenmerken in centiMorgans (1 cM ≈ 1%)
 - → genetische afstand tussen twee niet-gekoppelde kenmerken is 50 cM
 - → lineair verband tot 20 cM (20%), daarna voorkomen dubbele crossover

Hoofdstuk 4 – Verschillende overervingswijzen

Legenda stamboom:

Symbol	Betekenis
cirkel	normale vrouw
vierkant	normale man
verbonden door horizontale lijn	<i>mating</i>
I, II	ouders, kinderen
maar 1 ouder aangegeven	partners eigenschappen van geen significante betekenis
verbonden door dubbele horizontale lijn	consanguiniteit
kinderen één startlijn	twee-eiige tweeling
" + nog horizontale lijn	eeneiige tweeling
cijfers in vakjes	aantal kinderen van een geslacht
gevulde vakjes	aangetast individu
half gevulde vakjes	autosomaal heterozygoot recessief (drager)
stip in cirkel	drager XR-eigenschap
diagonale lijn door vakje	dood
enkel stip ipv vakje	geaborteerd of dood geboren

monogonische overervingswijzen = afwijkingen in 1 gen

(oligogene kenmerken = geassocieerd met enkele genen

polygene kenmerken = geassocieerd met vele genen

= complexe/multifactoriële kenmerken, want vaak kunnen omgevingsfactoren ze beïnvloeden)

- autosomaal dominante overerving
 1. verticale transmissie
 2. even vaak bij ♂ als ♀
 3. aangetast individu heeft aangetaste ouder(s)
 4. 50% herhalingsrisico als 1 v/d ouders aangetast
 5. vader→zoon komt voor
- autosomaal recessieve overerving
 1. horizontale transmissie
 2. even vaak ♂ als ♀
 3. vaak consanguiniteit
 4. herhalingsrisico 25%
- X-gebonden recessieve overerving
 1. alleen bij ♂
 2. vaak generaties overgeslagen
 3. nooit vader→zoon
 4. zonen van vrouwelijke drager 50% aantasting, dochters 0%
 5. (soms schijnbaar vader→zoon)
- X-gebonden dominante overerving
 1. 2x zo vaak ♀ als ♂
 2. geen generaties overgeslagen
 3. vader→zoon niet waargenomen

- Y-gebonden overerving
 1. alleen bij ♂
 2. geen generaties overgeslagen
 3. enkel vader → zoon
- mitochondriale overerving
 1. enkel moeder → kind
 2. ernst kenmerken varieert sterk ← heteroplasmie, vnl. weefsels die ATP-afhankelijk zijn
voor figuren zie cursus

Factoren die overervingpatronen compliceren:

- nieuwe mutaties (kan daarna autosomaal dominant worden)
- kiemlijnmosaïcisme = individu mozaïek voor mutatie (vnl. bij somatische mutaties)
- verminderde penetrantie (wel genetische afwijking, geen symptomen) en fenokopieën (zelfde ziekte, andere genetische oorzaak)
- leeftijdsafhankelijke penetrantie (presymptomatische test mogelijk als mutatie gekend)
- genomische imprinting = als alleen paternale/maternale gen tot expressie komt, uitgewist bij vorming gameten, nieuwe aangebracht
- anticipatie en repeatverlenging = erger worden van generatie op generatie

Hoofdstuk 5 – Veranderingen in erfelijk materiaal

- mutaties = veranderingen in genetische informatie, geassocieerd met erfelijke ziektebeelden/kenmerken
- polymorfisme = variatie met redelijke frequentie (>1% van de populatie), niet direct geassocieerd met een ziektebeeld
- oorzaken mutaties:
 - spontaan tijdens replicatie (bv. C → T door methylatie en deaminatie, frequent want methylatie heeft "normale" functie)
 - geïnduceerd door mutagene stoffen (bv. baseanalogen: op plaats 5 in uracil is een Br geplaatst = 5-bromo-uracil) (bv. ethidium-bromide: gaat zich nestelen in DNA-streng → afstand tussen basenparen groter → mogelijk extra paar toegevoegd)
 - geïnduceerd door ioniserende straling (bv. UV-licht: vorming pyrimidine dimeren)
- DNA-herstelmechanisme: herstelt 99,9% van de gemaakte fouten
 - endonuclease: knipt in 1 streng van het DNA
 - exonuclease: breekt het DNA in 1 streng af tussen knippen
 - DNA polymerase: vult tweede streng aan op basis van eerste streng
 - DNA ligase: herstelt breekpunt tussen nieuwe en oude stuk DNA
 - = "nucleotide excision repair"
 - achttal genen bij betrokken → mutaties in deze genen → opstapeling mutaties
- kiemlijnmutatie = mutatie in geslachtscellen, worden doorgegeven aan volgende generatie
- somatische mutatie = mutatie in 1 cel tijdens ontwikkeling → in gedeelte cellen volwassen individu → mozaïcisme (als ook geslachtscellen drager mutatie → gedraagt zich verder als kiemlijnmutatie)
- cytogenetica = tak van de genetica die chromosomen bestudeert
- maken karyotype:
 - cellen gekweekt (alleen WBC, want RBC geen kern)
 - colchiazine toegevoegd: verhindert vorming spoeldraden → celdeling kan niet verder → blijven in metafase (meest gecondenseerde vorm)
 - cellen laten opzwellen, op dekglasje verspreiden, kleuren, foto nemen, verwerken
- centromeer: splitst chromosoom in lange (Q) arm en korte (P) arm: metacentrisch (P=Q), submetacentrisch (P<Q), acrocentrisch (P (satelliet op stalk) << Q)
- telomeren: aan uiteinden
- bandenpatroon: Q-, G-, R-banding
- cellen in profase/prometafase gehouden → minder gecondenseerd → hogere resolutie

- euploïd = cellen die een veelvoud van normale set chromosomen bevatten
 - monoploïd (bv. darren)
 - diploïd (normaal)
 - triploïd, tetraploïd (van elk chromosoom 4) = polyploïd
- aneuploïd = cellen die geen meervoud van normale set chromosomen bevatten
 - monosomie (van 1 chromosoom ontbreekt een kopij)
 - polysomie (extra chromosomen): trisomie, tetrasomie (1 chromosoom in 3 resp. 4voud)
 - trisomie 21 = Down syndroom
 - trisomie 18 = Edwards syndroom
 - trisomie 13 = Patau syndroom
 - trisomie 16 = meest frequent, maar nooit voldragen zwangerschap
 - XXY = Klinefelter syndroom
 - XXXY
 - XO = Turner syndroom
 - XXX

} bijna altijd levensvatbaar,
5% voldragen zwangerschap

♂ fenotype, onderontwikkeld ♂ gedrag

} bij dieren vaak per toeval ontdekt

 - ontstaan door nondisjunctie (= niet scheiden chromosomen)
- chromosomale herrangschikkingen
 - translocatie: chromosoomfragmenten tussen niet-homologe chromosomen uitgewisseld
 - gebalanceerd: geen DNA erbij/eraf → minieme klinische verschijnselen (als toch aanwezig: meestal door breekpunten → genen kunnen afbreken), grote risico's voor nageslacht
 - Robertsonian: fusie van 2 acrocentrische chromosomen
 - deletie: verlies chromosoomfragmenten (pas zichtbare gevolgen als >1.000.000 basenparen ontbreken)
 - duplicatie: verdubbeling chromosoomfragment → partiële trisomie
 - insertie: fragment tussen basenparen geplaatst
 - inversie: 2 chromosoombreuken → ontbrekende fragment omgekeerd teruggeplaatst
- sequentievariaties:
 - single copy DNA: eenmalig voorkomend stuk
 - dispersed repetitie DNA: stuk dat vaker voorkomt
 - satellite DNA: kleine stukjes DNA die na elkaar herhaald worden en vaker voorkomen
 - intron: stuk DNA dat bij transcriptie wordt verwijderd
 - exon: stuk DNA dat bij transcriptie behouden blijft en bij translatie wordt gelezen
 - stille mutatie: geen effect op AZ-frequentie, bv. in niet coderende sequenties, in repetitieve sequentie, in derde codonpositie van een coderende sequentie (GUU→GUC, beide Val)
 - missende mutatie: aminozuursubstitutie → volledig deficiënt eiwit/geen effect (afh. v. eigenschappen AZ)
 - transitie: purine→purine (G→A) of pyrimidine→pyrimidine (U→C)
 - transversie: uitwisseling tussen beide groepen A-T→G-C → 1 AZ veranderd
 - nonsense mutatie: ipv. voor een AZ wordt er voor een stopcodon gecodeerd → deficiënt eiwit, bv. A-T→C-G → UAA = stopcodon
 - leesraamverschuiving: insertie/deletie 1/2 basenparen → totaal afw. AZ-codering, vroegtijdige beëindiging translatie (ws stopcodon ingebouwd), als insertie/deletie 3 basenparen → 1 AZ meer/minder → geen verschuiving
 - splice site mutatie: thv. intron-exon overgang, voorkomt correcte uitsplitsing → mogelijke "insertie" nucleotiden → leesraamverschuiving
 - readthrough mutatie: stopcodon vervangen door coderend triplet, bv. TAA (stop) → TTA (Leu)

Hoofdstuk 6 – Verband overervingswijzen en type van mutaties

- "gain of function"-mutatie: meestal door missende mutatie, autosomaal dominant, ook: translocatie → fusie-eiwit (vaak bij tumoren)
- "loss of function"-mutatie: herrangschikkingen (microdeleties: contiguous gene syndrome), nonsense mutatie, leesraamverschuiving, splice site mutatie, recessief/dominant → haploinsufficiëntie: 1 intacte kopij gen onvoldoende)

- inactivatie 1 X-chromosoom bij ♀ = Lyonisatie → mozaïcisme, XIC-regio (X-inactivatie center) van beide chromosomen naast elkaar:
 1. counting van aantal X-chromosomen
 2. als 2 → kiezen
 3. initiatie inactivatie thv. XIC
- 3 transcripten zonder open leesraam: geen coderende sequenties:
 - XIST = X-inactivation specific transcript, 8 exonen, 15.000 basenparen
 - TSIX = antisense XIST (naam = omgekeerde), 40.000 basenparen
 - XITE = X-inactivation intergenic transcription element, 20-30.000 basenparen van XIST verwijderd
 - TSIX & XITE: telling en kiezen (1&2), expressieregulatie van XIST → regelt 3) → methylatie (onderdrukt expressie)
 - XIST mRNA: bedekking geïnactiveerde X-chromosoom → boosters (L1 repetitieve sequenties), 15% genen “ontsnappen” geheel/gedeeltelijk aan inactivatie → efficiëntie afh. v. afstand tot boosters (?)
 - 2 pseudo-autosomale regio's X-chromosoom: ook op Y-chromosoom, niet geïnactiveerd → expressie voor genen identiek bij ♂ en ♀, draagster X-gebonden aandoening heeft in helft cellen nog expressie van intact gen

Hoofdstuk 7 – Basistechnieken van de gentechnologie

recombinant DNA: introduceren vreemd DNA fragment in vector die een geschikte gastheercel zal toelaten het fragment te vermenigvuldigen

- isoleren klein fragment
- cloneren

1^e fase = aanmaak recombinant DNA

- restrictie-enzymen = endonucleasen
 - knippen DNA in fragmenten: positie sequentieafhankelijk (palindroomsequentie) → reproduceerbaar
 - kleverige of “blunt” uiteinden
- DNA-ligase: plakken fragmenten

2^e fase = reproductie recombinant DNA

- gastheer: bacteriën (vnl. E coli's, kleine fragmenten), gisten: YAC's (yeast artificial chromosomes, grote fragmenten)
- vectoren bij bacteriën:
 - plasmiden: komt voor in bacteriën → kunnen resistentie veroorzaken, repliceren autonoom → per cel kunnen tot enkele 10-tallen identieke voorkomen, banken aanmaken:
 - genomisch: initieel DNA gefragmenteerd in DNA
 - cDNA: uit mRNA → alleen genen die tot expressie komen (mRNA moet eerst worden gekopieerd (copy) worden tot DNA)
 - virussen (bv. bacteriofaag λ): injecteren DNA in bacteriën, 2 cycli: lytische (productie fagen (→ reproductie)), lysogene (replicatie geïnfecteerde cel), maken plaques in bacterietapijt (= plekken waar geen bacteriën meer zitten)

scheiding fragmenten dmv. gelelectroforese = naar grootte

- agarose (100-1.000.000 basenparen)/polyacrylamide (10-300 basenparen)
- ethidiumbromide = mutagene stoffen → verhoogt mutatiesnelheid, licht op bij UV-licht

“Southern blotting” = transfer DNA fragmenten uit gelmatrix op een membraan (nylon/nitrocellulose), DNA strengen gedenuatureerd (enkelstrenging) gebonden aan membraan

hybridisatie = “probe” (= sonde) toegevoegd → bindt selectief aan DNA fragmenten (stukje wordt dubbelstrenging) op sequentie die we willen hebben

- vooraf gemerkt: radioactief (→ autoradiogram), fluorescent
- werkt ook met plaques

PCR = polymerase chain reaction

1. denaturatie DNA (94°C)
 2. aanhechting oligonucleotiden (primers) op beide DNA strengen (55-60°C)
 3. aanmaak complementaire strengen door DNA polymerase
- 30x cyclus = miljoenen kopieën

dideoxysequencing

- dideoxynucleotide (ddA, ddT, ddC, ddG, ddN) => OH-groep vervangen voor H-molecule
- ketenverlenging stopt als ddN ingebouwd → volgorde nucleotiden bepalen

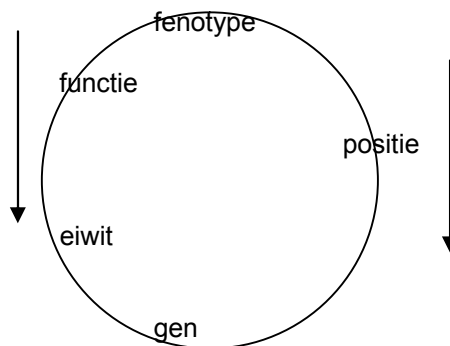
microarrays = DNA chips, onderzoeken genen op mutaties, farmacogenetics = “the study of the genetic modifications of variable human respons to pharmacological agents”

Hoofdstuk 8 – Identificatie van genen

monogeen ziektebeeld = veroorzaakt door mutaties in één gen
→ polygeen, multifactorieel, complex

functionele klonering

symptomen
→ deficiënt eiwit
→ gen



positionele klonering
(zie onder figuur)

1) lokalisatie ziektegen op genoom met koppelingsanalyse

cosegregatie = het samen overerven ziekte – gen.

merkers: polymorfismen = varianten waarvan 2/meer vormen (allelen) binnen een populatie voorkomen

- eiwit-polymorfismen
- DNA-polymorfismen
 - restrictie fragment lengte polymorfismen (RFLP's): slechts twee-allelisch → vaak niet informatief
 - variabel number of tandem repeats (VNTR): opeenvolgende herhalingen wv. aantal variabel kan zijn
 - microsatellietmerkers: tandem herhalingen van zeer korte sequenties
 - dinucleotiden (CA)
 - tri-, tetranucleotiden
 - aantal herhalingen hoog polymorf

PCR-amplificatie

koppelingsanalyse: cosegregatie (gekoppeld) of onafhankelijke overerving (?)

LOD (log of the odds): $\log(P(\text{echte koppeling})/P(\text{toevallig}))$, >3 ($\log 1000/1$) → bewijs voor koppeling, <-2 ($\log 1/200$) → exclusie van koppeling → genomische zoektocht → afscannen per chromosoom voor LOD >3

2) identificatie ziektegen uit kandidaatregio

sleutelrecombinanten = recombinanten die afbakening kandidaatregio mogelijk maken
contig:

```
--|-----|--
merker1      merker 2
--|-|-|-|-|-|-|-|-|-|
  A  B  C  D  E  F  G  H
```

→ regio afgebakend mbv. sleutelrecombinanten

→ elk stukje vertegenwoordigd

identificatie geëxprimeerde sequenties (genen)

- beschikbaarheid genomische sequenties species
- als niet beschikbaar → bekijken homologe regio andere species
- indien nodig: conservatie sequentie via zoo-blot, aanwezigheid in cDNA banken, Northern blot analyse

mutatieanalyse kan ziektegen eenduidig aanwijzen

- expressie gen in relevante weefsel
- functie gecodeerde eiwit

homozygositeitsmapping = zoeken naar specifieke chromosomale regio's die hetzelfde zijn bij alle aangetaste individuen

3) moleculaire en functionele karakterisatie gen

Voorgaan vooral voor monogame ziektebeelden met Mendeliaans overervingpatroon!

Polygenische aandoeningen: berekenen heritabiliteit (H^2 , in %) = bijdrage genetische factoren aan een kenmerk, obv. concordantie en discordantie bij tweelingen.

Associatiestudies: met grote groep (geïsoleerde) patiënten en controles

→ koppelingsanalyse families

- vergelijken allelfrequenties:

A: A 0,6

a 0,4

B: B 0,7

b 0,3

$AB = 0,6 * 0,7 \rightarrow$ normaal "linkage equilibrium" tussen allel en ziekte

$AB > 0,6 * 0,7 \rightarrow$ "linkage disequilibrium": preferentiële associatie tussen allel en ziekte

QTL = quantitative trait loci = genetische varianten die bijdragen tot mogelijk commercieel belangrijk kenmerk, → meerdere genen betrokken → Gauss-curve.