

aantal vragen: 3 [1ABCD, 2ABCDEF, 3ABCDE]

(10pt)

1) Oliemaatschappijen zijn voortdurend bezig de zogenaamde formulering van hun benzine te verbeteren. Zij doen dit door het ontwikkelen van organische hulpstoffen, die ze angstvallig geheim houden voor hun concurrenten. Voordat een bepaalde organische stof gebruikt mag worden ter verbetering van de eigenschappen van benzine, moet deze wettelijk zijn getest op toxiciteit. Een van de protocollen die hoort bij het testproces is het toedienen van de stof aan muizen embryo's en het bepalen van de respons van de embryo's op de stof. De respons wordt onder andere gemeten op transcriptie niveau.

1A) Leg uit in algemene zin waarom je voor een bepaling van het transcriptoom van muizen embryo's zowel 'technical replicate' als 'biological replicate' experimenten moeten worden uitgevoerd? (1 pt)

1B) Leg uit wat in dit specifieke geval de twee tegengestelde overwegingen zijn die een rol spelen in het bepalen van het aantal uit te voeren 'replicate' experimenten. (0.8 pt)

Uiteindelijk wil je een tiental 'biological replicate' experimenten uitvoeren.

1C) Geef aan wat de simpelste experimentele set-up is om de gevolgen van de toxische stof te testen. (0.6 pt)

Met behulp van een t-test kan uiteindelijk bepaald worden welke genen een significant verschil in expressie laten zien. De expressie van deze genen wordt mogelijkwerwijs beïnvloed door de toxische stof

1D) Om te voorkomen dat een feitelijk 'responsive' gen wordt uitgesloten wordt de t-test uitgevoerd op een manier die het aantal vals negatieven minimaliseert. Leg uit hoe je het aantal vals negatieven minimaliseert. (0.6 pt)

2 De bacterie *Bacillus anthracis* is de verwekker van de ziekte miltvuur. Een van de ziekteverschijnselen is een opgezwollen en ontstoken milt (vandaar de naam) en de infectie kan leiden tot de dood. *Bacillus anthracis* is lange tijd een van de voornaamste kandidaat organismen geweest in de biologische oorlogsvoering. In het laboratorium waar je werkt wil men ook onderzoek gaan doen naar *Bacillus anthracis*. De bedoeling van een van de eerste experimenten is de transcriptionele respons van de bacterie te onderzoeken op glucose limitatie. Daartoe worden cellen gegroeid op medium met glucose en wordt RNA sequencing toegepast op een RNA sample van cellen in de exponentiële groeifase en op een RNA sample van cellen die net gestopt zijn met groeien.

2A) Net als vele andere micro-organismen vertoont *Bacillus anthracis* 'diauxic growth'. Teken een groeicurve voor een *Bacillus anthracis* cultuur die op twee koolstofbronnen groeit. Begin de curve op tijdstip 0 in de zogenaamde 'lag fase' en eindig op tijdstip t in de 'stationaire fase' (0.6 pt)



2B) Omdat de interesse in eerste instantie alleen gericht is op verandering op het niveau van 'messenger RNA' wordt het sample eerst ontdaan van ander RNA. Welk RNA wordt verwijderd? Leg uit waarom. (0.6 pt)

2C) Na uitvoering van de meting worden voor een select aantal genen de onderstaande meetwaarden gevonden. Normaliseer de waarden op basis van de meetwaarde van het zogenaamde huishoudgen *pgm* (voor huishoudgenen wordt verondersteld dat de expressie onafhankelijk is van de condities). (0.8 pt)

Gen	exponentieel	Exponentieel genormaliseerd	stationair	Stationair genormaliseerd
<i>amtB</i>	100		1000	
<i>rbsR</i>	50		90	
<i>metA</i>	200		300	
<i>bac1</i>	10		16	
<i>pgm</i>	40		80	

2D) Leg uit waarom de meetwaarden worden genormaliseerd. (0.6 pt)

Na analyse van de meetwaarden blijkt dat de expressie van het gen *amtB*, dat codeert voor een ammonium transport eiwit, significant is toegenomen toen de bacteriën stopten met groeien.

2E) Leg uit waar deze hoge expressie op kan wijzen in relatie met de beoogde limitatie. (0.6 pt)

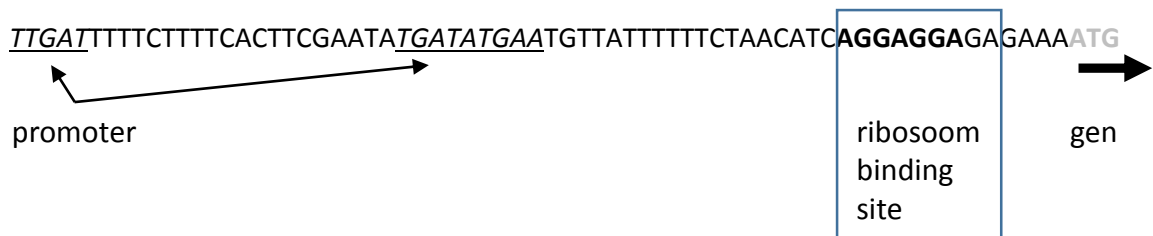
In *Bacillus anthracis* wordt de transcriptie van het *amtB* gen gereguleerd door de transcriptie factor GlnR. Deze transcriptie factor bindt aan het onderstaande motief

GlnR motif (general)



2F) Hieronder is de upstream sequentie voor het *amtB* gen in *Bacillus anthracis* weergegeven met de plaats van de promotor.

- Omcirkel de mogelijke bindingsplaats voor de transcriptie factor GlnR. (0.4 pt)
- Geef aan wat het effect op de expressie is wanneer GlnR bindt aan het DNA. (0.4 pt)



4) Veel neurodegeneratieve aandoeningen (zoals Alzheimer) kunnen pathologisch worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van samengeklonterd eiwit. Omdat gist ook in staat is dit type geklonterd eiwit te maken is er veel onderzoek naar de omstandigheden die invloed hebben in gist op de expressie van de gerelateerde genen. Men hoopt de resultaten vervolgens te kunnen extrapoleren naar de mens.

4A) Geef drie redenen waarom je graag gist zou gebruiken in plaats van de mens om de factoren die van invloed zijn op de expressie van de genen die gerelateerd zijn met deze samenklontering te bestuderen? (0.6 pt)

Om de functionele relatie tussen de verschillende klonter-vomende eiwitten te onderzoeken werd gist gegroeid bij een twintigtal uiteenlopende condities. Vervolgens werd het transcriptoom bepaald met behulp van dual channel micro arrays waarbij voor iedere array de referentie conditie gelijk werd gehouden. De meetwaarden werden gecorrigeerd en genormaliseerd.

4B) Leg uit wat je zou doen om te zoeken naar klonter-vormend eiwit coderende genen die onder bepaalde condities significant van expressie verschillen met de referentie conditie (0.6 pt)

4C) Leg uit hoe je op basis van de gen expressie meetwaarden uit kunt zoeken welke experimentele condities een soortgelijke transcriptionele respons ten gevolge hebben. (0.6 pt)

De gen expressie meetwaarden over alle experimenten werden geanalyseerd met behulp van een zogenaamde ‘Principal Component Analyse’.

4D) Leg uit wat je in een ‘Principal Component Analyse’ doet. (0.4 pt)

4E) Geef in de onderstaande ‘Principal Component Analyse’ aan tussen welke van de aangegeven klontering gerelateerde genen een functionele relatie zou kunnen bestaan. (0.8 pt)

