

## Gespierder door gendoping

---

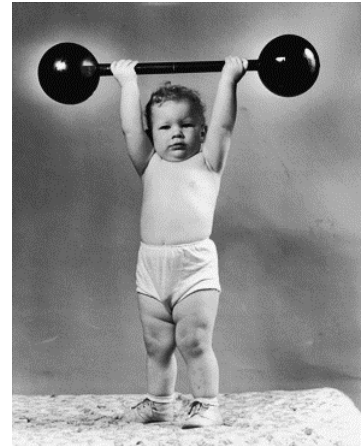
Het overdragen van genetisch materiaal naar menselijke cellen voor de behandeling van ziektes bevindt zich nog in een experimenteel stadium. Deze techniek zou ook gebruikt kunnen worden als gendoping bij sporters. Het is inmiddels al gelukt om muizen door gendoping supergespierd te maken.

Een goede kandidaat voor gendoping is een gemuteerd gen voor myostatine. Myostatine remt de activatie van satellietcellen. Dat zijn cellen in de spieren die kunnen delen en differentiëren naar myoblasten, de voorlopers van spiervezels.

Onder leiding van Dr. Schuelke, kinder-neuroloog bij het UMC te Berlijn, is onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van spiermassa bij kinderen.

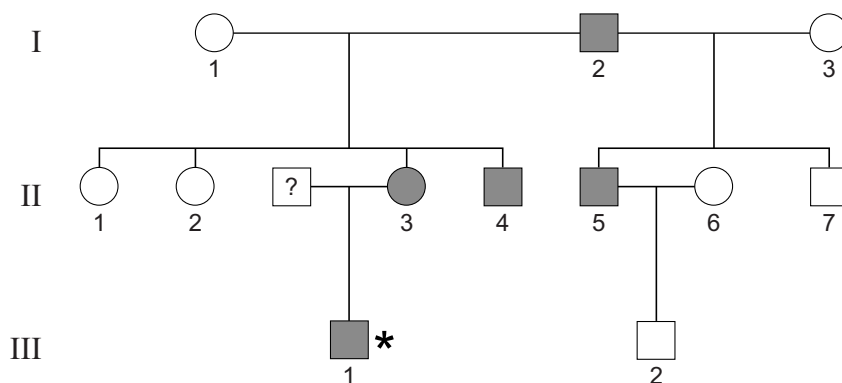
Aan een Duits jongetje met een gemuteerd myostatine-gen is te zien wat het resultaat van deze mutatie is (afbeelding 1).

**afbeelding 1**

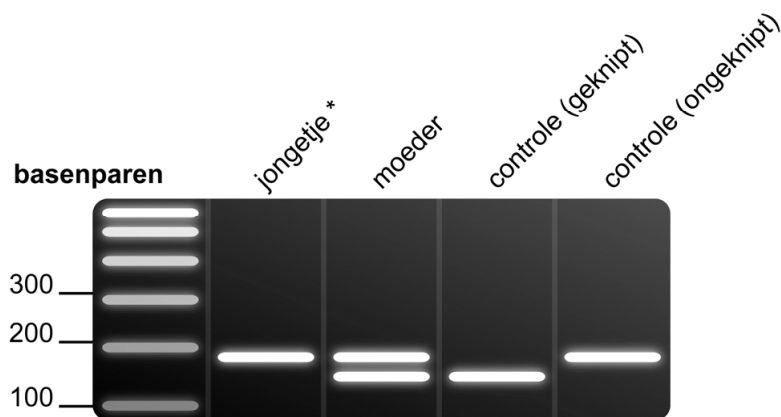


Schuelke onderzocht de familiestamboom van het jongetje (nummer III-1 in afbeelding 2). Zowel de opa van het jongetje als twee ooms waren bijzonder sterk en gespierd. Ook moeder oogde gespierd, maar niet zo gespierd als haar zoon. Over de vader van het jongetje is dit niet bekend. Voor genetisch onderzoek was alleen materiaal van het jongetje en zijn moeder beschikbaar. Van beiden werd een fragment van 166 basenparen van het myostatine-gen vermenigvuldigd met PCR. Een restrictie-enzym werd gebruikt om de mutatie op te sporen. Alleen in het wild-type gen knipt het enzym dit fragment in twee delen: een van 135 bp en een van 31 bp. Het mutantgen wordt door dit restrictie-enzym niet geknipt. Met gel-elektroforese werden de fragmenten op lengte gescheiden. Het resultaat van de elektroforese is weergegeven in afbeelding 3. Kleine fragmenten van 31 bp zijn hierin niet te zien.

**afbeelding 2**



**afbeelding 3**

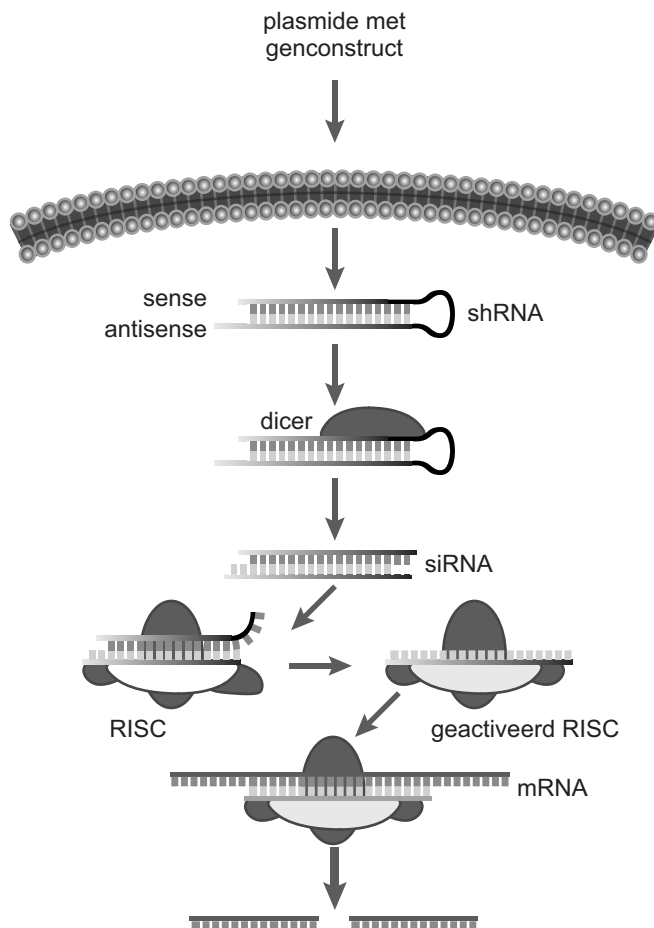


Uit de familiestamboom, gecombineerd met het genetisch onderzoek, is af te leiden hoe gespierdheid als gevolg van een mutant-myostatine-gen overerft.

- 2p 15 Hoe erft de eigenschap over?
- A autosomaal onvolledig dominant
  - B autosomaal recessief
  - C X-chromosomaal onvolledig dominant
  - D X-chromosomaal recessief

In theorie is het mogelijk het myostatine-gen bij een sporter uit te schakelen en hem zo supergespierd te maken. Een manier om het gen 'knock down' te maken, is door RNA-interferentie (RNAi). De expressie van het gen voor myostatine wordt daardoor verminderd. In afbeelding 4 is het proces van RNA-interferentie, waarbij gebruik wordt gemaakt van een plasmidevector, schematisch weergegeven.

**afbeelding 4**



- 1 Via een vector komt een genconstruct in de kern van een cel.
- 2 Op basis hiervan ontstaat mRNA met een 'sense'- en 'antisense'-deel die een haarspeld-RNA (shRNA) vormen.
- 3 Het enzym dicer bewerkt het shRNA tot een stukje interfererend dubbelstrengs RNA (siRNA).
- 4 Dit siRNA bindt aan eiwitcomplex RISC (RNA-induced silencing complex) en wordt enkelstrengs.
- 5 Het antisense-RNA in het geactiveerde RISC bindt aan complementair rijp mRNA, waarna dit wordt gesplitst en vervolgens afgebroken.

Door RNA-interferentie kan de myostatineproductie in satellietcellen verminderen.

Vier processen zijn:

- 1 transcriptie van het genconstruct
- 2 transcriptie van het myostatine-gen
- 3 translatie van het mRNA op basis van het genconstruct
- 4 translatie van het myostatine-mRNA

1p 16 Welk proces wordt door de RNA-interferentie voorkómen, met als gevolg dat de productie van myostatine vermindert?

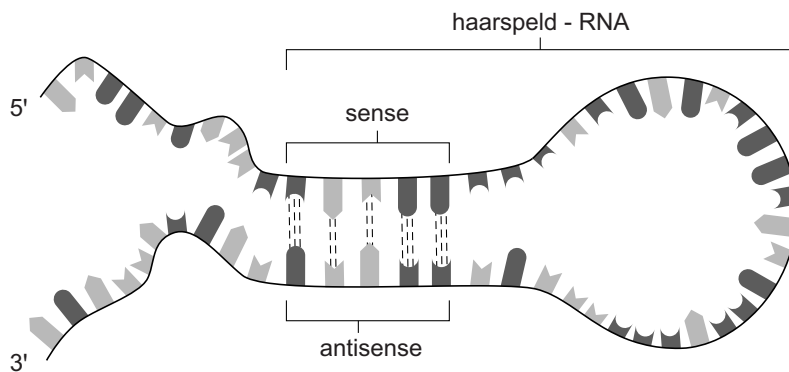
Een groep onderzoekers uit Japan en Indonesië heeft deze manier van gendoping onderzocht bij gezonde muizen. Ze kozen twee fragmenten van het myostatine-gen als potentiële knock-downsequenties (K1 en K2). Van elk fragment werd dubbelstrengs DNA geconstrueerd. Dat werd ingebouwd in een plasmide en – verpakt in liposomen – ingespoten in de beenspieren van muizen.

Voor de constructie van knock-down-DNA-fragmenten van het myostatine-gen zijn delen van exons gebruikt.

- 1p 17 Verklaar waarom het niet zinvol is om hiervoor introndelen van het gen te gebruiken.

Een haarspeld-RNA (shRNA) ontstaat als in het mRNA een sense- en een antisense-sequentie voorkomen (zie afbeelding 5) die complementair zijn.

### afbeelding 5



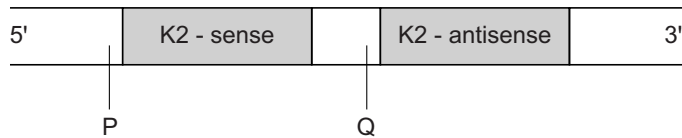
Een deel van de coderende streng van DNA-fragment K2 uit het myostatine-gen dat codeert voor het sense-deel van het shRNA heeft als nucleotidenvolgorde:

5' - AAATACCAGTGCCTTTTTT - 3'

- 2p 18 Wat is de nucleotidenvolgorde van het antisense-deel in de coderende streng van dit K2-genfragment?
- A 5' - UUUAUGGUCACGGAAAAAAA - 3'
- B 5' - UUUUUUCCGUGACCAUAAA - 3'
- C 5' - AAAAAAAGGCACUGGUUUUU - 3'
- D 5' - AAAAAAAGGCACTGGTATTT - 3'
- E 5' - TTTTTTCCGTGACCATAAA - 3'

Naast de sense- en antisense-DNA-sequenties bevinden zich ook promotors in de genconstructen.  
 In afbeelding 6 is de coderende streng van een deel van het genconstruct K2 getekend. Twee plaatsen zijn aangegeven met P en Q.

**afbeelding 6**



2p 19 Wat is de functie van een promotor? En waar in het K2-genconstruct is een promotor aanwezig?

| functie                    | plaats                  |
|----------------------------|-------------------------|
| A start(punt) transcriptie | op plaats P             |
| B start(punt) transcriptie | op plaats P en plaats Q |
| C start(punt) translatie   | op plaats P             |
| D start(punt) translatie   | op plaats P en plaats Q |

De onderzoekers zochten in het bloed van de muizen naar sporen van de gendoping, maar ze vonden niets. In de eerste vier weken na de behandeling kon het genconstruct nog wel in spierweefsel worden aangetoond, daarna niet meer. Om dit type gendoping bij sporters aan te tonen zou dus ten minste elke maand een spierbiopt genomen moeten worden.

Een dergelijke belastende methode zal echter niet worden toegepast. De Nederlandse Dopingautoriteit adviseert om een detectiemethode op basis van 'proteomics'-technieken te ontwikkelen; daarmee wordt regelmatig het eiwitprofiel in een bloedmonster van de sporter bepaald.

2p 20 – Leg uit dat het gevonden eiwitprofiel in het bloedmonster van een sporter wél op 'knock-down' van myostatine zou kunnen wijzen,  
 – maar dat dit nog geen bewijs voor gendoping is.

**Bronvermelding**

Een opsomming van de in dit examen gebruikte bronnen, zoals teksten en afbeeldingen, is te vinden in het bij dit examen behorende correctievoorschrift, dat na afloop van het examen wordt gepubliceerd.